

鱼类CC趋化因子基因及其系统进化分析

赫崇波, 木云雷, 王志松, 周遵春, 刘卫东

(辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁省应用海洋生物技术开放实验室, 辽宁大116023)

摘要:CC趋化因子(CC Chemokine)是一类能够促进动物体内炎症部位的各种白细胞的补充、激活和黏附的趋化性细胞因子家族,是鱼类天然免疫系统的重要组成部分。趋化因子也是当今国际鱼类分子免疫学研究的热点之一。本研究通过比较基因组学和生物信息学的方法,分析了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)等重要经济鱼类的CC趋化因子基因结构特点和功能,并采用Clustal X的NJ法对所有新的CC趋化因子和先前发表的鱼类趋化因子与其他动物的CC趋化因子进行系统进化分析,建立了3个独特的包含非鱼类CC趋化因子的直向进化同源组。第1个直向进化同源组建立于人的CCL27和CCL28,有丽鱼科(Cichlidae) *Melanochromis auratus* 和 *Paralabidochromis chilotis* 的SCYA101、SCYA101a、大西洋鲑(*Salmo salar*)的CB510320、斑马鱼(*Danio rerio*)的BI839410、虹鳟的CK11、斑点叉尾鲷的BM027974和BM029630;第2个直向进化同源组是以人类CCL20建立的,包括虹鳟的CK8a、CK8b、斑点叉尾鲷的SCYA112和鸡(*Gallus gallus*)AAK84434,其中鸡的序列与人的CCL20最相近(与其他鱼类CC趋化因子相比);第3个直向进化同源组是以鸡的XP-424980和鲢鱼(*Ictalurus furcatus*)的SCYA109建立的。所有其他鱼类CC趋化因子都没有归类到非鱼类CC趋化因子的同源组中。为了进一步分析鱼类CC趋化因子和哺乳类CC趋化因子间的关系,采用Clustal W的非自举检验(Bootstrapping)启发式搜索(heuristic search)比对法对这些CC趋化因子进行归类分析,结果得到7个潜在的直向进化同源组,包括含有4个鱼类CC趋化因子的CCL20直向进化同源组、5个鱼类CC趋化因子的CCL24直向进化同源组、8个鱼类CC趋化因子的CCL22直向进化同源组、4个鱼类CC趋化因子的CCL17直向进化同源组、15个鱼类CC趋化因子的CCL25直向进化同源组、7个鱼类CC趋化因子的CCL27/CCL28和17个鱼类CC趋化因子的CCL19/CCL21直向进化同源组。趋化因子的研究将有助于更好地了解鱼类抗病性与天然免疫性的关系。[中国水产科学,2006,13(1):119-127]

关键词:鱼类;天然免疫;CC趋化因子;基因;系统发生学

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0119-09

动物免疫包括非特异性免疫和特异性免疫两种,非特异性免疫也叫天然免疫,是指一个生物所具有的对病原体和有害异物的基本先天抵抗和防御性。天然免疫对绝大多数的病原体和有害异物具有潜在快速、有力和非特异性免疫反应的特点。鱼类时刻与水接触,其鳞片、皮肤和黏液膜的表面都是抵御病原体侵入的重要物理屏障。当物理屏障被突破后,侵入的病原体将面临一系列可溶性因子包括抗菌肽、蛋白酶、溶解酵素、补体因子和急性蛋白(acute-phase proteins)^[1-2]。在细胞水平,宿主能通过内吞和噬菌作用摄入细胞外的大分子和粒子,与此同时,天然免疫的细胞组分在遇到病原体识别相关

的分子形态(PAMPs)^[3-4]包括脂多糖(LPS)、双链RNA以及由宿主细胞产生的细胞因子时,即被激活。病原微生物的侵入经常引起组织的损伤,产生所谓炎症反应(inflammatory response)的一系列复杂免疫反应。鱼类在进化图谱上代表着仅具有天然免疫系统的动物和主要依赖获得性免疫动物的中间类群。因而,通过鱼类免疫基因的研究,可以获得大量的关于免疫系统的进化、功能和调节方面的信息。非特异性免疫对鱼类尤其重要^[1]。作为一个趋化性细胞因子基因的超大家族,趋化因子是天然免疫至关重要的组成部分,其共同特点是能够刺激感染或损伤部位免疫细胞的补充、激活和黏附^[3-6]。

收稿日期:2005-04-27; 修订日期:2005-07-02。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571410);辽宁省海洋水产科学研究院和国博士科研启动基金项目(2004001)。

作者简介:赫崇波(1961-),男,研究员,博士,硕士生导师,从事水产分子遗传学和功能基因研究。Tel: 0411-81787087, E-mail: hechongbo@hotmail.com

炎症反应是可诱导的天然免疫的一个重要组成部分,往往在感染后1~2 d内就可见感染症状。而趋化因子是炎症反应的中间介质,是结构上相关的多肽(peptides),大多数含有4个保守的半胱氨酸残基(Cysteine residues)。根据这4个保守半胱氨酸残基的排列形式不同^[7-8],趋化因子基因可以分为4个基因亚族:CXC(α),CC(β),C(γ)和CX₃C(δ)^[9]。但是,趋化因子基因核苷酸序列的低保守性,限制了通过PCR方法或杂交为基础的技术进行鱼类趋化因子基因的鉴定研究。随着水产动物基因测序数量的增加,一些动物的趋化因子基因鉴定变得实际可行,公众数据库中不断增长的鱼类趋化因子资料对鱼类的研究将起到信息叠加效应,因为一种鱼类趋化因子的发现和鉴定又有助于与其密切相关鱼类的趋化因子的发现。CC趋化因子(CC Chemokine)是趋化因子家族中的最大一个基因家族。本研究仅对几种鱼类CC趋化因子基因结构及系统进化进行分析。

1 分析方法

1.1 cDNA 序列检索

通过在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的Nucleotide中检索哺乳动物、斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的CC趋化因子基因的cDNA核苷酸序列。

1.2 同源序列检索

用检索到的鱼类趋化因子和哺乳动物CC趋化因子基因序列作为查询序列,在NCBI中的EST Others数据库进行查询检索,并通过tBLASTn检索用于鱼类EST序列的同源性比对。

1.3 归类分析

用Vector NTI软件的Contig Express程序,对检索到的CC趋化因子基因核苷酸序列进行归类。对于那些归类于已经发表的趋化因子中的序列不再进行分析,而选择新的叠连群代表序列和单一新序列做进一步分析。

1.4 进行结构分析

用NCBI中的Blast X和DNASTar分析软件,对CC趋化因子基因序列进行结构分析,查找基因编码区开放阅读框(ORF)和CC趋化因子特有的CC基序(CC motif)。开放阅读框确定后,将基因的核苷酸序列翻译成氨基酸序列。

1.5 系统进化分析

使用Clustal X的NJ法进行直向进化同源归类

分析,采用Clustal W归类法进行准直向进化同源比对分析。

2 结果

2.1 哺乳动物CC趋化因子种类

CC趋化因子,之所以这样命名是因为它的前两个保守半胱氨酸残基的排列,即前两个半胱氨酸之间没有其他氨基酸残基(Cysteine-Cysteine)^[8]。CC趋化因子是单核细胞的趋化介质(与CXC是嗜中性粒细胞的趋化介质相对而言)。一共发现了哺乳动物的30个CC趋化因子,如表1所示。然而,从一种动物鉴定的最大数目趋化因子数目较小。30个趋化因子中,CCL6、CCL9、CCL10和CCL12还没有在人类中发现,即人类中共发现26个趋化因子。在鼠中,CCL3L1、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL18、CCL23和CCL26尚未发现,即鼠类动物中只发现了22个趋化因子。因而,在一种生物发现最多的是人类,26个趋化因子。

根据功能和结构特点,哺乳动物CC趋化因子亚族又分为几个亚组^[6-10]。第1个是致敏性亚组CC趋化因子,是单细胞趋化性蛋白(MCPs),包括CCL1、CCL2、CCL7、CCL8和CCL11,鼠类CCL12、CCL13、CCL24和CCL26^[6],一般来说都是嗜嗜红细胞(Eosinophils)和嗜碱性细胞(Basophils)的有效引诱剂,能够释放组胺。致敏性趋化因子在感染条件下表现出可诱导性表达。第2亚组是前炎症趋化因子,包括CCL3、CCL4(两个都是巨噬细胞感染蛋白MIPs)、CCL5、CCL6和CCL18。此亚组趋化因子也表现为感染条件下的诱导表达,吸引单核细胞、T淋巴细胞和嗜嗜红细胞^[10]。第3亚组是HCC亚组(Haemofiltrate CC chemokines),包括CCL14、CCL15、CCL16和CCL23^[11]。这些趋化因子在炎症反应过程中也起到重要作用,不表现为感染后的诱导表达。第4个亚组是所谓的发育亚组,包括CCL17、CCL22和CCL25。CCL17和CCL22具有相同功能,能够趋化起源于单细胞的树突细胞(Dendritic cells)和被IL-2激活的NK细胞^[11],CCL25能够趋化单核细胞、肾树突细胞、胸腺细胞并且在淋巴循环中起作用。第5个亚组是属于自身平衡(Homeostatic)CC趋化因子,包括CCL19、CCL20和CCL21。它们由淋巴组织持续表达,并引导T细胞和成熟的树突细胞向淋巴组织内特定区域运动。

表1 已鉴定的人类CC趋化因子^[9]Tab.1 CC Chemokines identified from humans^[9]

正式名称 Official name	染色体位置 Chromosome location	人类中的同义名 Synonyms in human
CCL1	17q11.2	I-309
CCL2	17q11.2	MCP-1/MCAF/TDCF
CCL3	17q12	MIP-1/LD78
CCL3L1	17q12	LD78
CCL4	17q12	MIP-1
CCL4L1	17q12	LAG1/LAG-1/SCYA4L
CCL5	17q12	RANTES
CCL6		No Report
CCL7	17q11.2	MCP-3
CCL8	17q11.2	MCP-2
CCL9		No Report
CCL10		No Report
CCL11	17q11.2	Eotaxin
CCL12		No Report
CCL13	17q11.2	MCP-4
CCL14	17q12	HCC-1
CCL15	17q12	HCC-2/Lkn-1/MIP-1
CCL16	17q12	HCC-4/LEC/LCC-1
CCL17	16q13	TARC
CCL18	17q12	DC-CK1/PARC/AMAC-1
CCL19	9p13.3	MIP-3/ELC/exodus-3
CCL20	2q36.3	MIP-3/LARC/exodus-1
CCL21	9p13.3	6Ckine/SLC/exodus-2
CCL22	16q13	MDC/STCP-1
CCL23	17q12	MPIF-1/CK8/CK8-1
CCL24	7q11.23	Eotaxin-2/MPIF-2
CCL25	19p13.3	TECK
CCL26	7q11.23	Eotaxin-3
CCL27	9p13.3	CTACK/IL
CCL28	5p12	MEC

2.2 鱼类CC趋化因子结构特点

鱼类CC趋化因子鉴定工作进展一直较慢,原因之一是CC趋化因子的多变性,低序列保守性阻碍了用生物信息学方法进行DNA核苷酸水平上的序列分析;另一个原因就是大部分CC趋化因子的分子量较小,一般少于100个氨基酸,使用不同种类的核酸序列所设计的探针或引物所进行的杂交或PCR方法的分子克隆,不是十分有效。尽管如此,

一些重要基因的发现非常有助于鱼类CC趋化因子的研究。大多数鱼类的CC趋化因子都有4个保守半胱氨酸残基,但也有例外,如虹鳟CK1基因是第1个被描述的鱼类CC趋化因子^[12],它有6个半胱氨酸残基,结构上与哺乳动物的CCL20非常相似。第2个鱼类CC趋化因子,即CC趋化因子1,是从鲤鱼(*Cyprinus carpio*)中分离来的^[13],它与哺乳动物致敏性(MCP)亚组高度相似。第3个CC趋化因子CK2是从虹鳟鱼鉴定出来的^[14]。这些早期的工作提供了第1个启示,建立与哺乳动物直向同源相似性是困难的,所有这些蛋白质氨基酸序列与任何相近的哺乳动物对应蛋白质同源性水平都不超过40%。早期发现,鱼类缺乏CC趋化因子,因而推测鱼类与现存哺乳动物在趋化因子方面的直向同源性很小^[6,15],因此只能鉴定出少量的CC趋化因子。哺乳动物的大多数CC趋化因子在进化谱中都表现出唯一性。近年来,基因组学方法促进了鱼类趋化因子的研究,有7个新的CC趋化因子分别来自丽鱼科的*Paralabidochromis chilotes*和*Melanochromis auratus*,1个来自猫鲛鱼(*Scyliorhinus canicula*)^[16],14个分别来自斑点叉尾鲷和蓝鳃(*Latesurus fuscatus*)^[17],15个来自虹鳟^[18](表2)。后两组CC趋化因子的鉴定对以往鱼类免疫系统的观念提出了新的挑战,这两组CC趋化因子在公共数据库中将作为未来功能分析的基础,同时,也对其他种类的研究起到一个信息叠加和积累作用。

2.3 鱼类CC趋化因子进化分析

用Clustal X软件的NJ法对所有新的CC趋化因子和先前发表的鱼类趋化因子进行系统进化分析,建立了具有非鱼类CC趋化因子的3个独特CC趋化因子直向进化同源组(图1)。第1个直向进化同源组以人类的CCL27和CCL28建立,进化枝中有丽鱼的SCYA101和SCYA101a,大西洋鲑的CB510320,斑马鱼的BI839410,虹鳟鱼的CK11以及鲟鱼的BM027974和BM029630;第2个直向进化同源组是以人类CCL20建立的,包括虹鳟的CK8a和CK8b,鲟鱼的SCYA112和鸡(*Gallus gallus*)的AAK84434,其中鸡的序列与人的CCL20最相近(与其他鱼类CC趋化因子相比);第3个直向进化同源组是在鸡的XP-424980和蓝鳃的SCYA109间建立的。所有其他鱼类CC趋化因子都没有归类到非鱼类CC趋化因子的同源组中。很多进化枝都是由不同种类鱼的CC趋化因子建立

的。很明显,哺乳动物大多数 CC 趋化因子或者本身形成分明的进化枝或者不形成任何进化枝,这表明对来自鱼类和哺乳动物之间的不同种动物的 CC 趋化因子的鉴定是十分必要的。

采用 Clustal W 归类法进行准直向同源比分析(图 2),很多鱼类趋化因子被归类到含有哺乳动物趋化因子的进化枝内。共计 7 组鱼类 CC 趋化因子是直向进化同源组。潜在的直向进化同源组为 CCL20,包括 鳉鱼 (*Fundulus heteroclitus*) CN976993、虹鳟 CK8a 和 CK8,鲟鱼的 SCYA112。

同理,直向进化同源组还有包括 5 个鱼类 CC chemokines 的 CCL24, 8 个鱼类 CC 趋化因子的 CCL22,至少 4 个鱼类 CC 趋化因子的 CCL17,15 个鱼类 CC 趋化因子的 CCL25,7 个鱼类 CC 趋化因子的 CCL27/CCL28 和 17 个鱼类 CC 趋化因子的 CCL19/CCL21。尽管这样的分析尚缺少统计学上重复性的支持,但是它暗示着当更多的中间种类趋化因子序列成为可能时,其他形式的直向进化同源组也可以被确定,并且其他的归类比对方法也可以用于 CC 趋化因子的系统进化分析。

表 2 先前报道的鱼类 CC 趋化因子
Tab.2 Previously reported fish CC chemokines

动物种类 Species	CC 趋化因子 CC chemokine	GenBank 编号 Acc. No	动物种类 Species	CC 趋化因子 CC chemokine	GenBank 编号 Acc. No
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	CK1	AF093802	丽鱼科 <i>Melanochromis auratus</i> 和 <i>Paralabidochromis chilotes</i>	Menu-SCYA101	AY178962
	CK2	AF418561		Menu-SCYA102	AY178963
	CK3	AJ315149		Pach-SCYA101	AY178964
	CK4A	CA371157		Pach-SCYA103	AY178965
	CK4B	CA352593		Pach-SCYA104	AY178966
	CK5A	CA383670		Pach-SCYA105	AY178967
	CK5B	CA374135		Pach-SCYA106	AY178968
	CK6	CA355962	猫鲛鱼 <i>Scyliorhinus canicula</i>	Seca-SCYA107	AY178970
	CK7A	CA355962		Icfu-SCYA101	AY555498
	CK7B	CA346976	斑点叉尾鲟 <i>Ictalurus punctatus</i> , 蓝鲟 <i>Ictalurus furcatus</i>	Iepu-SCYA102	AY555499
	CK8A	CB494647		Icfu-SCYA103	AY555500
	CK8B	CA353159		Icfu-SCYA104	AY555501
	CK9	CA378686		Iepu-SCYA105	AY555502
	CK10	CA361535		Icfu-SCYA106	AY555503
	CK11	EX072681		Icfu-SCYA107	AY555504
	CK12A	CA358073		Iepu-SCYA108	AY555505
	CK12B	CA346383		Icfu-SCYA109	AY555506
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	CC chemokine	AB010469		Icfu-SCYA110	AY555507
牙鲈 <i>Paralichthys olivaceus</i>	CC chemokine	AU090535		Iepu-SCYA111	AY555508
	Paol-SCYA104	AB117523		Iepu-SCYA112	AY555509
				Iepu-SCYA113	AY555510
				Icfu-SCYA114	AY555511

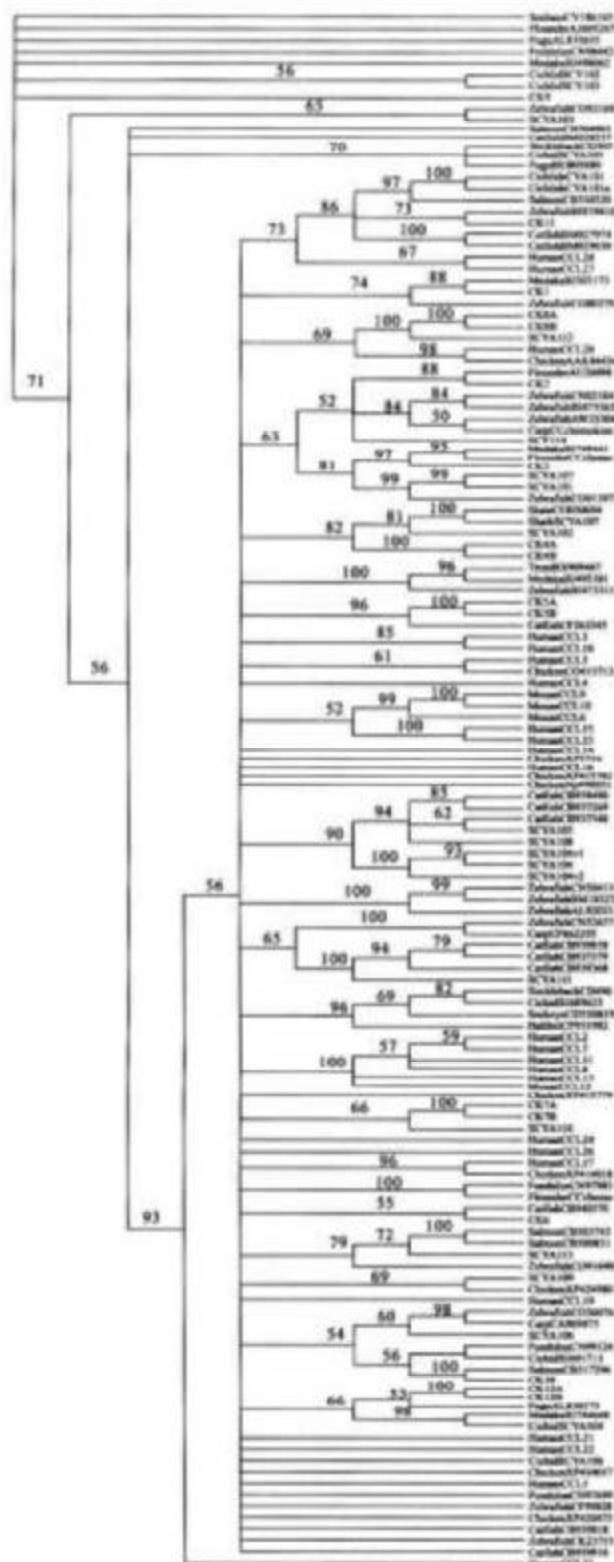


图1 基因的氨基酸序列通过 Clustal X 软件的 NJ 法构建的 CC 趋化因子系统进化图(包括全部哺乳动物代表 CC 趋化因子、鸡类和全部鱼类 CC 趋化因子, 鱼类新趋化因子基因的注册号在其种名之后)

Fig.1 Phylogenetic analysis of CC chemokines using amino acid sequences of genes by NJ method of Clustal X with bootstrapping

Sequences included all representative mammalian CC chemokines, chicken CC chemokines, and all fish CC chemokines.

The accession numbers for the novel fish CC chemokines are indicated in the sequences immediately following the species name. The accession numbers for representative mammalian CC chemokines are: P22362 (CCL1), P13500 (CCL2), P10147 (CCL3), P13236 (CCL4), P13501 (CCL5), P27784 (CCL6), P80098 (CCL7), P80075 (CCL8), P51670 (CCL9), P51670 (CCL10), P51671 (CCL11), Q62401 (CCL12), Q99616 (CCL13), Q16627 (CCL14), Q16663 (CCL15), O15467 (CCL16), Q92583 (CCL17), P55774 (CCL18), Q99731 (CCL19), P78556 (CCL20), O00585 (CCL21), O00626 (CCL22), P55773 (CCL23), O00175 (CCL24), O15444 (CCL25), Q9Y258 (CCL26), Q9Y4X3 (CCL27), and Q9NRJ3 (CCL28).

The accession numbers for chicken CC chemokines are: NP_990051.1 (chemokine K203), XP_424980.1 (CCL19), XP_415782.1 (chemokine ah221), XP_415779.1 (A13), XP_415714.1 (chemokine ah294), XP_415713.1 (MIP-1 beta), XP_414018.1 (CCL17), XP_414017.1 (CCL2), XP_420473.1 (MIP-2), and AAK8434.1 (chemokine ah189).

The accession numbers for published fish CC chemokines are listed in Table 2. CichidSCYA101a refers to PichSCYA101. Flounder CC chemokine and 2 refer to AU090535 and ABI17523, respectively.

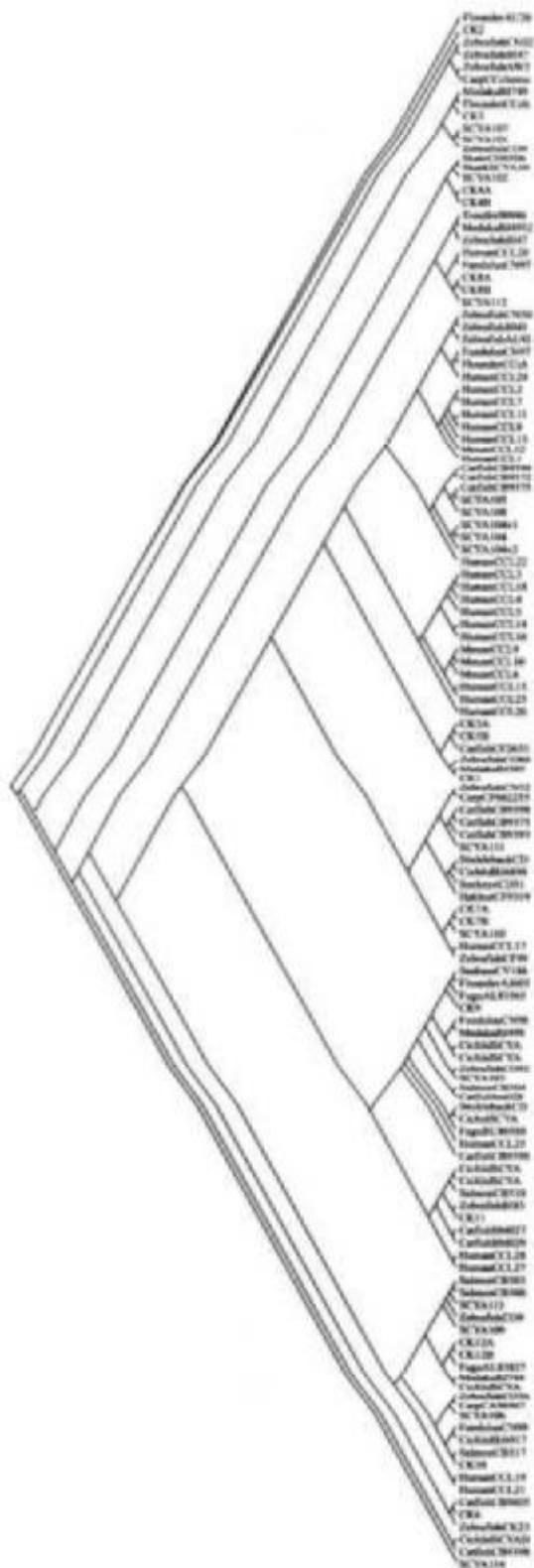


图2 采用 Clustal W 不设自举检验的启发式比对法构建的 CC 趋化因子系统进化树结构图(包括全部哺乳动物代表 CC 趋化因子、鸡和鱼类 CC 趋化因子。鱼类新趋化因子基因的注册号在其种名之后)

Fig.2 Phylogenetic analysis using Clustal W without bootstrapping by heuristic search. Sequences included all representative mammalian CC chemokines, chicken CC chemokines, and all fish CC chemokines. The accession numbers for the novel fish CC chemokines are indicated in the sequences immediately following the species name.

哺乳动物的代表 CC 趋化因子的注册号是: (The accession numbers for representative mammalian CC chemokines are): P22362 (CCL1), P13500 (CCL2), P10147 (CCL3), P13236 (CCL4), P13501 (CCL5), P27784 (CCL6), P80098 (CCL7), P80075 (CCL8), P51670 (CCL9), P51670 (CCL10), P51671 (CCL11), Q62401 (CCL12), Q99616 (CCL13), Q16627 (CCL14), Q16663 (CCL15), O15467 (CCL16), Q92583 (CCL17), P55774 (CCL18), Q99731 (CCL19), P78556 (CCL20), O00585 (CCL21), O00626 (CCL22), P55773 (CCL23), O00175 (CCL24), O15444 (CCL25), Q9Y258 (CCL26), Q9Y4X3 (CCL27), and Q9NRJ3 (CCL28). 鸡 CC 趋化因子的注册号是: (The accession numbers for chicken CC chemokines are): NP_990051.1 (chemokine K203), XP_424980.1 (CCL19), XP_415782.1 (chemokine ah221), XP_415779.1 (A13), XP_415714.1 (chemokine ah294), XP_415713.1 (MIP-1 beta), XP_414018.1 (CCL17), XP_414017.1 (CCL2), XP_420473.1 (MIP-2), and AAK84434.1 (chemokine ah189). 已发表的鱼类 CC 趋化因子的注同号列在表 2 中 (The accession numbers for published fish CC chemokines are listed in Table 2). CichidSCYA101a refers to PachSCYA101. Flounder CC chemokine1 and 2 refer to AU090535 and AB117523, respectively.

3 讨论

3.1 CC趋化因子的命名

趋化因子构成一个蛋白质家族,根据其氨基酸序列结构基序的不同,这个家族可以分为几个亚家族。趋化因子的共同性质是白细胞趋化性。像Bacon等所归纳的,先前的趋化因子是随机命名,因而缺乏命名的系统性^[9]。如一些趋化因子叫白细胞介素类(如IL-8),而另一些则冠以说明功能的名称(如巨噬细胞趋化蛋白),一些根据产生这些趋化因子的细胞类型来命名(如血小板因子4)。由于通常所选择的名称都比较混乱,不便于使用,因而导致这些趋化因子总是以名字的缩写形式被引用(如PANTES)。很多趋化因子表现出重叠功能,在鉴别与特定试验观察资料相关的趋化因子时易引起混淆。为了避免趋化因子命名的混乱,国际免疫学会(IUIS)和世界卫生组织趋化因子命名组委会(WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature)采用了趋化因子的标准命名法^[9,19]。在这个新的命名系统中,趋化因子分为CXC、CC、C和CX₂C 4个亚组。名字分别是在其亚组名后加上一个字母“L”表示配体(Ligand)和一个阿拉伯数字,如CXCL5。

鱼类趋化因子的命名也有些混乱。一些报道使用了哺乳动物趋化因子旧的传统命名法,而不是新的标准命名系统。例如,类白细胞介素8(IL-8 like)在牙鲆、虹鳟、七鳃鳗(*Lampetra fluviatilis*)和斑点叉尾鲟中都有描述^[20-23]。其他一些报道中,虽然使用了标准命名系统,却没有给出有力的系统发生的支持和进行功能分析,基因鉴定纯粹是基于序列同源相似性比对。这种基于同哺乳动物趋化因子进行序列同源性比对以后给出的趋化因子名称可能是真实的,但是还缺乏系统进化上的证据支持,也缺乏实验数据对其功能进行验证^[24]。在虹鳟,CC趋化因子使用CKx系统来命名,X表示基因鉴定的时间,但是不反映与哺乳动物直向同源关系。Kuroda等^[16]使用SCY-A、B、C、D系统分别表示CC、CXC、CX₃C和C 4种类型趋化因子基因,用起始于101的3位阿拉伯数字表示基因是来自鱼类。这个系统也被He等^[17]用来描述斑点叉尾鲟和蓝鲫的趋化因子基因。

假如通过系统发生或功能分析方法建立直向进化同源组,又能采用标准哺乳动物命名法,这样最为合理。在此之前仍可继续使用暂时的鱼类命名系

统,以避免混淆。一旦通过系统进化和功能分析找到它们的直向同源关系,则可逐渐并入标准命名系统。虽然功能分析可能尚需时日,但全面的系统进化分析是可以实现的。

3.2 鱼类CC趋化因子基因表达分析与功能研究

鱼类趋化因子的表达分析揭示,绝大部分鱼类的趋化因子基因都在相关免疫器官或组织(如头肾、肝、脾、鳃等)中表达,暗示着它们具有天然免疫功能。但是,关于鱼类趋化因子基因表达和功能分析还处于初期阶段,CC趋化因子基因诱导表达的研究只在虹鳟中有报道,其CK1和CK2是被PHA所诱导的,而CK5a、CK5b、和CK6则由炎症细胞因子TNF- α 所诱导,表明它们在炎症反应中起作用。趋化性的功能分析仅限于鱼类CC趋化因子。有关趋化性的研究已在虹鳟CK1^[25]和牙鲆SCYA104有过报道^[26]。

4 结语

尽管目前鱼类和哺乳类趋化因子之间的直向进化同源组精确数目尚不清楚,大量的趋化因子,包括众多特异性的CC趋化因子,已经从硬骨鱼类鉴定出来。鲑(斑点叉尾鲟和蓝鲫)是鱼类中发现CC趋化因子最多的一种,共有26个特异性CC趋化因子(多于人的CC趋化因子总数)。在鲑鱼的CC趋化因子中,只有3个趋化因子建立了直向进化同源组,它们是BM029630、SCYA112和SCYA109。假定大部分鱼类都含有绝大多数的特异性趋化因子,那么大量CC趋化因子还有待从各种鱼类中发现。这种推论原理:如果A相似于B,但不相似于C,然而B同时相似于A和C,此时若没有B存在,就不能建立A与C之间的准确关系。这一设想在达尔文用形态学标准进行进化论研究时确实奏效。虽然人与细菌的相似性并不明显,但是当进化谱的全部生物根据各自的进化地位被放入到彼此相连的进化链中,它们的整个进化过程就会显而易见。因此,可以预期当更多的序列变得可能,很多鱼类CC趋化因子的直向进化同源关系亦将建立。

鉴于已经发现大量鱼类CC趋化因子,且用系统进化分析的方法不能建立它们的直向同源关系,有必要对鱼类趋化因子进行表达和功能分析,以便阐明它们在天然免疫系统的重要作用。鱼类是现存脊椎动物中种类最多的类群,在只具有天然免疫性和主要依赖获得性免疫功能的动物中占有极其重

要的进化地位。鱼类趋化因子的序列和信息不仅对比较分子免疫学研究至关重要,而且有助于更好地认识和研究主要养殖经济动物流行性、暴发性疾病的发生机制和防治。鱼类趋化因子的数量已远远超过预期的数字,这对现存的趋化因子多样性的观点提出挑战,也为鱼类免疫学的研究奠定了新的基础。几个鱼类趋化因子在鱼类病原体存在情况下的表达研究和功能分析已经得到重要结果。

参考文献:

- [1] Ellis A E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25: 827-839.
- [2] Magor B G, Magor K E. Evolution of effectors and receptors of innate immunity [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25: 651-682.
- [3] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family [J]. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12: 991-1045.
- [4] Matzinger P. An innate sense of danger [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 961: 341-342.
- [5] Neville L F, Mathiak G, Baggioni O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1997, 8: 207-219.
- [6] Laing K J, Secombes C J. Chemokines [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28: 443-460.
- [7] Ahuja S K, Murphy P M. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 20 545-20 550.
- [8] Murphy P M, Baggiolini M, Charo I F, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors [J]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52: 145-176.
- [9] Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, et al. Chemokine/chemokine receptor nomenclature [J]. *Cytokine*, 2003, 21: 48-49.
- [10] Mantovani A, Locati M, Sallan S. CC chemokines [A]. In: Thomson AW, Lotze MT, editors. *The Cytokine Handbook* [M]. London: Elsevier, 2003. 1083-1097.
- [11] Oppenheim J J, Howard O M Z, Gaetzel E. Chemotactic factors, neuropeptides, and other ligands for seven transmembrane receptors. In: *Cytokine reference: a compendium of cytokines and other mediators of host defence* [C]. London: Academic Press, 2000. 985-1021.
- [12] Dixon B, Shum B, Adams E J, et al. CX-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Immunol Rev*, 1998, 166: 341-348.
- [13] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) CC chemokine, CXC chemokine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization [J]. *Immunogenetics*, 1999, 49: 909-914.
- [14] Liu L, Fujiki K, Dixon B, et al. Cloning of a novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CC chemokine with a fractalkine-like stalk and a TNF decoy receptor using cDNA fragments containing Au-rich elements [J]. *Cytokine*, 2002, 17: 71-81.
- [15] Huising M O, Stet R J M, Kruiswijk C P, et al. Molecular evolution of CXC chemokines: extant CXC chemokines originate from the CNS [J]. *Trends Immunol*, 2003, 24: 306-312.
- [16] Kuroda N, Uinuk-ool T S, Sato A, et al. Identification of chemokines and a chemokine receptor in cichlid fish, shark, and lamprey [J]. *Immunogenetics*, 2003, 54: 884-895.
- [17] He C, Prutman E, Boersmaert P, et al. Multiple CC chemokines in channel catfish and blue catfish as revealed by analysis of expressed sequence tags [J]. *Immunogenetics*, 2004, 56: 379-387.
- [18] Laing K J, Secombes C J. Trout CC chemokines: comparison of their sequences and expression patterns [J]. *Mol Immunol*, 2004, 41: 793-808.
- [19] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity [J]. *Immunity*, 2000, 12: 121-127.
- [20] Najakobin A M, Mechetina L V, Alabyev B Y, et al. Identification of an IL-8 homolog in lamprey (*Lampetra fluviatilis*): early evolutionary divergence of chemokines [J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29: 375-382.
- [21] Lee E Y, Park H H, Kim Y T, et al. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Gene*, 2001, 274: 237-243.
- [22] Chen L, He C, Boersmaert P, et al. Analysis of a catfish gene resembling interleukin-8: cDNA cloning, gene structure, and expression after infection with *Edwardsiella ictali* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29: 135-142.
- [23] Laing K J, Zou J J, Wang T, et al. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26: 433-444.
- [24] Huising M O, Stolte E, Flük G, et al. CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27: 875-888.
- [25] Lally J, Al-Ancouti F, Bols N, et al. The functional characterisation of CX-1, a putative CC chemokine from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 15: 411-424.
- [26] Khattiyi R, Ohira T, Hirose I, et al. Identification of a novel Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) CC chemokine gene and an analysis of its function [J]. *Immunogenetics*, 2004, 55: 763-769.

Phylogenetic analysis of CC chemokine genes of fish

HE Chong-bo, MU Yun-lei, WANG Zhi-song, ZHOU Zun-chun, LIU Wei-dong

(Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Liaoning Key Laboratory of Marine Fishery Molecular Biology, Liaoning Open Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Dalian 116023, China)

Abstract: CC chemokines are a superfamily of chemotactic cytokines involved in recruitment, activation and adhesion of a variety of leukocyte types to inflammatory foci, the important component of the innate immune system. In this paper the structure and function of CC chemokine genes from economically important fishes such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), flounder (*Paralichthys olivaceus*) and catfish were analysed by comparative genomics and bioinformatics methods. Phylogenetic analysis of all the new CC chemokines and the previously published fish chemokines using the neighbor joining method allowed the establishment of orthologies of three distinct CC chemokine groups with non-fish CC chemokines. The first orthology was established with human CCL27 and CCL28. Included within this clade were cichlid (*Melanochromis auratus* and *Paralabidochromis chilotes*) SCYA101 and SCYA101a, salmon (*Salmo salar*) CB510320, zebrafish (*Danio rerio*) BI839410, rainbow trout CK11, channel catfish (*Ictalurus punctatus*) BM027974 and BM029630. The second orthology was established with human CCL20. This clade contained the trout CK8a, CK8b, catfish SCYA112, and chicken (*Gallus gallus*) AAK84434. The chicken sequence was much closer to the human CCL20 than to any of the fish CC chemokines included in the clade. The third orthology was established between chicken XP_424980 and blue catfish (*Ictalurus furcatus*) SCYA109. All the other fish CC chemokines were not grouped into clades containing non-fish CC chemokines. Phylogenetic analysis using Clustal W by heuristic search without bootstrapping was also performed to explore the relationship of fish CC chemokines and mammalian CC chemokines. Altogether, orthologies were suggested for seven groups of fish CC chemokines. Potential orthologies were suggested for CCL20 including *Fundulus* CN976993, the trout CK8a and CK8b, and the catfish SCYA112. Similarly, orthologies were suggested for CCL24 with five fish CC chemokines, for CCL22 with eight fish CC chemokines, for CCL17 with at least four fish CC chemokines, for CCL25 with 15 fish CC chemokines, for CCL27/CCL28 with seven fish CC chemokines, and for CCL19/CCL21 with 17 fish CC chemokines. Chemokine data from fish is crucial not only for comparative immunology, but also in efforts to understand and prevent a number of fast-acting diseases prevalent among important aquaculture species. Ongoing work in fish CC chemokines will help better understand the important relationship between fish disease resistance and innate immunity. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 119–127]

Key words: fish; innate immunity; CC chemokine; gene; phylogenetics