

大菱鲆1个CXCL10样趋化因子的克隆、鉴定与表达分析

刘洋¹, 陈松林², 孟亮², 张玉喜²

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:趋化因子是一类趋化性细胞因子的总称, 它们在白细胞的趋化反应中起着重要作用。本研究从构建的大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 脾脏 cDNA 文库中筛选到一种大菱鲆 CXC 趋化因子, 经过 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增得到了它的全长 cDNA。该趋化因子的全长 cDNA 含有 1 个 79 bp 的 5'UTR、1 个 372 bp 的开放阅读框 (ORF) 和 1 个 227 bp 的 3'UTR。开放阅读框编码 123 个氨基酸残基。此 CXC 趋化因子基因内含有 4 个外显子和 3 个内含子, 3 个外显子的碱基长度分别为 591 bp、86 bp 和 372 bp。Blast 分析和系统发生分析都表明这个趋化因子和已知的脊椎动物的 CXCL10 相近。用鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染大菱鲆后 12 h, 该趋化因子在肝脏和脾脏中表达水平达到最高, 在头肾中则是在感染后 5 h 表达水平最高。在肝脏中, 从感染后 12 h 开始该趋化因子的表达水平逐渐下降并且在 72 h 后恢复到正常水平。在脾脏中, 一直到感染后 24 h 该趋化因子保持高水平表达, 随后表达水平减弱至正常水平。在头肾中, 从感染后 5 h 开始一直到 24 h, 表达水平逐渐升高, 随后表达水平, 立刻降低至与正常水平一致。在正常的大菱鲆组织内没有检测到该趋化因子的表达, 表明它仅在受到鳃弧菌感染的时候才被诱导表达。结论认为该趋化因子在免疫反应中可能起着重要作用。[中国水产科学, 2007, 14 (4): 554-562]

关键词: CXC 趋化因子; CXCL10; 大菱鲆; 感染; cDNA 文库

中图分类号: Q959.486

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)04-0554-09

生物体的免疫系统提供了一个完整的防御机制以保护个体不受病原微生物的侵扰。目前认为, 免疫系统主要由两部分组成: 先天性免疫和获得性免疫。鱼类在进化史上比哺乳动物古老并且属于变温动物, 其免疫系统与哺乳动物也有较大不同, 先天性免疫系统在鱼类抵抗病原菌侵染过程中起着主要的作用。相对于获得性免疫, 先天性免疫的免疫应答速度更快且不依赖于温度^[1-3]。此外, 研究表明, 鱼类像哺乳动物那样有一个包含信号分子、细胞因子和趋化因子的网络, 从而能够控制和协调先天和获得性免疫^[4]。趋化因子是一类小的分泌蛋白 (6~14 kD) 的总称, 它们是免疫系统的重要组成部分。研究者最初在哺乳动物中发现了趋化因子, 其能够引导白细胞到损伤或者感染的位点。近年来的研究发现趋化因子参与了多种机体反应活动, 如炎症反应、细胞间通讯、抗原呈递、血细胞发育和转移及病毒侵染和伤口愈合等^[5-8]。根据其氨基酸序列中

前两个半胱氨酸残基的位置, 可将趋化因子分为 4 个亚类: CXC、CC、C 和 CX3C。目前, 在哺乳动物中已经鉴定出 16 种 CXC 趋化因子^[9], 但是在鱼类中发现的 CXC 趋化因子较少, 如在牙鲆 (*Paralichthys olivaceous*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、鲤 (*Cyprinus carpio*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 中发现了 IL-8^[10-14]; 在斑点叉尾鲴 (*Ictalurus punctatus*) 和鲤中发现了 CXCL12 和 CXCL14^[15-16], 在斑点叉尾鲴中发现了 CXCL10^[17]。然而, 目前几乎没有关于鱼类 CXC 趋化因子功能的研究报道。

在哺乳动物中, CXCL9、CXCL10 和 CXCL11 都是由 I 型和 II 型干扰素诱导产生的^[18]。它们有共同的受体 CXCR3。CXCL10 可以由一系列不同的细胞分泌产生, 如单核细胞、内皮细胞、成纤维细胞和星形胶质细胞。目前对于 CXCL10 的功能仍未研究清楚, 研究已经表明, 它是一个多效性的分子, 能够引起多种生物学效应, 包括刺激单核细胞、自然

收稿日期: 2006-11-13; 修订日期: 2007-02-11.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004B117403); 国家自然科学基金项目 (40376047, 30671623).

作者简介: 刘洋 (1978-), 男, 博士研究生, 专业方向海洋生物学.

通讯作者: 陈松林. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

杀伤细胞和 T 细胞迁移、T 细胞成熟调节、黏连分子表达调节以及血管发生的抑制^[19-22]。

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 是一种重要的经济海水养殖鱼类,其生长速度快,肉质好,并且适应低温。但是由于病原菌的侵染,养殖疾病频繁暴发,给大菱鲆养殖业造成巨大的经济损失,极大限制了养殖业的进一步发展。由于抗生素的强烈副作用,利用分子生物学技术提高养殖鱼类的抗病力是很有必要的。本课题组从大菱鲆脾脏 cDNA 文库中鉴定出一种 CXCL10 样的趋化因子,得到其部分 cDNA 序列(已提交到 GenBank,接收号 DQ339043),克隆了该趋化因子基因并且对其基因结构进行了分析,同时构建了系统发生树将该趋化因子和其他已知 CXCL10 趋化因子进行了聚类分析。另外,还利用 RT-PCR 技术对于该趋化因子在鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染的大菱鲆组织中的表达进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

大菱鲆购自中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋养殖基地,体质量 200~500 g,运至麦岛实验基地喂养,水温 17~20 ℃。

取出正常大菱鲆组织(肝脏,脾脏,肠,头肾,肾,鳃,性腺,肌肉,心脏,脑和皮肤)保存于 -80 ℃ 用于

总 RNA 提取。同时还保存了不同发育时期的大菱鲆胚胎(16 细胞期,囊胚期,原肠期,尾芽期,体节期,心跳期,出膜前期和仔鱼期)于 -80 ℃ 下用于 RNA 提取。

1.2 大菱鲆脾脏 cDNA 文库的构建

大菱鲆脾脏 cDNA 文库的构建参照 Chen 等的方法^[23]。用 Trizol 试剂 (Qiagen) 从 4 个大菱鲆个体的脾脏中提取总 RNA,并且使用 oligo dT 引物合成 cDNA,然后用 pBlueScript II (SK+) cDNA 文库构建试剂盒 (Stratagene) 按照说明构建 cDNA 文库。

1.3 引物设计

参照已知的大菱鲆 CXC 趋化因子的部分 cDNA 序列 (GenBank 接收号 DQ339043),设计了两条特异引物 (T950GSP5 和 T950GSP3) 应用 RACE 法 (rapid amplification of cDNA ends) 扩增该 cDNA 的 5' 和 3' 未知序列,其中 T950GSP5 用来扩增 5' 未知序列 (5' UTR) 而 T950GSP3 用来扩增 3' (3' UTR) 未知序列, RACE 通用引物使用 BD 公司的 Long primer 和 Short primer。还根据该趋化因子的开放阅读框设计了一对特异引物 (T950N 和 T950C) 用于进行该趋化因子的表达分析,以大菱鲆 cDNA 为模板使用该对引物进行 PCR 扩增得到的特异片段大小为 301 bp。此外,还设计了两条特异引物 (TG950N 和 TG950C) 来以大菱鲆基因组为模板扩增该趋化因子基因。以上引物均列于表 1。

表 1 实验所用的引物序列
Tab.1 Primer sequences designed for turbot CXC chemokine

引物 Primer	引物序列 Primer sequence
Long primer	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
Short primer	5'-CTAATACGACTCACT ATAGGGC-3'
T950GSP5	5'-CCTCAGGCACAGTTTCACATCGCGGTCC-3'
T950GSP3	5'-GTGTCCACAGACGCAATCGGGCATCAGA-3'
T950N	5'-CTGTCAGCTCGCCTTCCTG-3'
T950C	5'-CCTCCTCAGGCACAGTTTC-3'
TG950N	5'-ATGAAGCTGTGCCCCAGT-3'
TG950C	5'-CTGGGAGTTGGAAGATGAG-3'
TactinN	5'-AGGTGATGAAGCCCAGAGCA-3'
TactinC	5'-GCAGTGGTGGTGAAGGAGTAG-3'

1.4 RNA 的分离和未知 cDNA 未知末端序列的扩增

使用 Trizol 试剂从正常大菱鲆组织(脾脏)中 (Qiagen) 提取总 RNA。使用 Oligotex™ mRNA mi-

di kit (Qiagen) 分离得到 Poly (A) + RNAs, 然后使用随机引物合成 cDNA^[24]。

使用 Smart RACE cDNA amplification kit (BD Biosciences Clontech) 进行 5'-RACE 和 3'-RACE。Touch-

down PCR 反应如下: 94 ℃ 2 min; 94 ℃ 5 s, 72 ℃ 3 min, 5 个循环; 94 ℃ 5 s, 70 ℃ 10 s, 72 ℃ 3 min, 10 个循环; 94 ℃ 5 s, 66 ℃ 10 s, 72 ℃ 3 min, 20 个循环; 72 ℃ 10 min。扩增得到的片段使用 Qiaex II gel extraction kit (Qiagen) 进行分离纯化, 然后克隆到 pMD18-T 载体 (Takara) 中, 在大肠杆菌 DH5 α 中扩繁, 然后使用 ABI3730 测序仪仪器进行测序。

1.5 大菱鲆基因组 DNA 的提取和 CXC 趋化因子基因组序列的扩增

大菱鲆基因组 DNA 从正常大菱鲆肝脏中提取。将 50 mg 大菱鲆肝脏加入到 1 mL 提取液 (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris pH8.0, 25 mmol/L EDTA, 1% SDS, 3 μ g 蛋白酶 K) 中匀浆, 之后将匀浆液置于 55 ℃ 下温育 30 min, 完毕后加入等体积的酚/氯仿 (体积比 1:1) 抽提, 然后以 13 000 r/min 转速在 4 ℃ 下离心 15 min, 收集上清液并且再用等体积的酚/氯仿 (体积比 1:1) 抽提两次。最后收集上清液, 加入 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA, DNA 沉淀用 75% 乙醇洗涤后溶解于灭菌水中, 保存于 -20 ℃ 下备用。

用 1 对特异引物 (TG950N 和 TG950C) 扩增该趋化因子的基因组序列 (表 1)。PCR 反应程序如下: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。扩增得到的片段使用 Qiaex II gel extraction kit (Qiagen) 进行分离纯化, 然后克隆到 pMD18-T 载体 (Takara) 中, 在大肠杆菌 DH5 α 中扩繁, 然后进行测序。

1.6 序列和系统发生分析

DNA 序列和蛋白序列使用 DNASTAR 5.0^[25] 编辑和分析; 蛋白的信号肽序列使用 Signal P^[26] 预测; 系统发生树使用 MEGA3.0^[27] 构建, 计算方法为 Neighbour-joining, 该 NJ 树的可靠性用自展内部分支法评定, 重复 1 000 次。

从 GenBank 中选择序列 *Homo sapiens*: CXCL1 (P09341), CXCL2 (P19875), CXCL3 (P19876), CXCL4 (P02776), CXCL5 (P42830), CXCL6 (P80162), CXCL7 (P02775), CXCL8 (P10145), CXCL9 (Q07325), CXCL10 (P02778), CXCL11 (O14625), CXCL12 (P48061), CXCL13 (O43927), CXCL14 (O95715), *Mus musculus*: CXCL12 (P10889), CXCL10 (P17515), *Rattus norvegicus*: CXCL10 (NP_620789), *Bos taurus*: CXCL10 (XP_871914), *Cyprinus carpio*: CXCL12a (AJ627274), CXCL12b (AJ536027), CXCL14 (AJ536028), *Ictalurus punctatus*: CXCL10 (AY335950), CXCL12 (AY836755),

CXCL14 (AY836756), *Paralichthys olivaceus*: CXCL8 (AF216646); *Oncorhynchus mykiss*: CXCL8 (AJ300835), CXCL10 (AAM90579); *Danio rerio*: CXCL12a (NP_840092), CXCL12b (NP_932334), CXCL14 (AF279919); *Capra hircus*: CXCL10 (BAC55183); *Ovis aries*: CXCL10 (NP_001009191); *Macaca nemestrina*: CXCL10 (AAO52732); *Macaca mulatta*: CXCL10 (Q8MIZ1) 与本研究所获 CXC 趋化因子一起构建系统发生树。

1.7 病原菌感染大菱鲆

大菱鲆的病原菌感染实验参照 Chen 等^[28]的方法。将体质量 200~500 g 的大菱鲆饲养于 1 000 L 的养殖箱中, 水温保持在 17 ℃。将鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*, ATCC 19019) 在 28 ℃ 条件下培养于 2216E 培养基 (蛋白胨 5.0 g, 酵母提取物 1.0 g, Fe-PO₄·4H₂O 0.1 g, 海水 1 L, pH 7.6) 中培养至对数中期, 离心收集菌体后使用生理盐水重新悬浮至浓度 7.6×10^8 CFU/mL。使用麻醉剂 MS 222 将大菱鲆麻醉, 然后进行腹腔注射。将大菱鲆分为两组, 一组注射 0.5 mL 鳃弧菌悬浮液, 设两个平行组每组各 5 个个体, 被感染大菱鲆均出现感染症状; 另一组注射 0.5 mL 生理盐水作为阴性对照, 设两个平行组各 5 个个体。未注射大菱鲆作为空白对照。注射后 5 h、12 h、48 h、72 h、96 h 分别取大菱鲆肝脏、脾脏和头肾, 并保存于 -80 ℃ 备用。

1.8 CXC10 样趋化因子的表达分析

从上述冻存大菱鲆组织 (1.1 和 1.7) 中提取总 RNA, 使用 Trizol 试剂, 按照 Chen 等^[23]的方法进行。使用 OligotexTM spin-column kit (Qiagen) 将 Poly (A) + RNAs 从总 RNA 中分离出来。cDNA 的合成使用 Promega 公司的 M-MLV 反转录酶, 按照操作说明进行。PCR 反应程序如下: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30~35 个循环; 72 ℃ 10 min。特异引物 TactinN 和 TactinC (表 1) 用于扩增 450 bp 的 β -actin 基因片段, 作为内参。

2 结果与分析

2.1 大菱鲆 CXC 趋化因子的克隆和鉴定

构建的大菱鲆脾脏 cDNA 文库含有超过 2.2×10^6 个克隆, 随机挑取 40 个克隆进行 PCR 鉴定, 发现插入片段的长度为 700~2 000 bp。本课题组从这个 cDNA 文库中鉴定出一个大菱鲆 CXC 趋化因

子基因(对应克隆号为950, GenBank 接收号为DQ339043), 其片段长度为510 bp, 通过5'和3'-RACE分别扩增得到了其5'和3'端未知序列。该趋化因子的完整cDNA序列为679 bp, 包括1个79 bp的5'UTR、1个372 bp的开放阅读框(编码123个氨基酸)和1个227 bp的3'UTR。通过基因组的序列扩增发现该趋化因子基因包含了4个外显子和3个内含子。在每个内含子的5'和3'都分别有典型

的内含子剪切特征GT(5')和AG(3'), 见图1。3'UTR在630~637 bp之间包含了1个典型的加尾信号AATAA。预测的信号肽和成熟肽的断裂点位于第19位甘氨酸和第20位天冬氨酸之间。成熟肽含有4个位置保守的半胱氨酸(第28、30、57、72位), 其中前2个半胱氨酸被一个赖氨酸(第29位)隔开, 该特征证明该趋化因子为CXC趋化因子(图1)。

ACGCGGGGGTTTCCATCTGGAGTCCAGACTAAAGGAAGATACTGCAGGGAGAGCCAGAGC	60
CGGTCTACAGTCTCAAACC ATG AACTCAGCTGTCGTTGCCTTCCTCAGCTCTCTGCTGT	120
M N S A V V A F L S S L L V	14
TCTCTGTGCTCAAGGtactgtgactgtgcaaacctttattgtcctgagtcattcatgttca	180
L C A Q	18
ttattttgtttttttcatgtttggtggtgggaatggggagtaacctgtggcaacacaaatac	240
agcacaatggctgatccttttttttttttttttacctgtcccatgcagtagggcagctc	300
aaagtggctgaacttctgtgcaactcaagtgtgtcattctacaatgtcaggagagagtcgt	360
taacactggtggttaaaatggcagaagataatgtgtatagtgttgagggttaacactgaa	420
tctgtgtcttagttgttagcagaaaaattcaagggttcaaatctctaaagaaatcagatt	480
acattttacatggaaataaataagatctgtaaaaatgtatggaaaccaaattgtaataccaa	540
gaaaatataataattttcatatatactaaaatagccagaaatccattttttttcattttcatc	600
ttgagtgtactgagctgacataactttcactgaaaaatattttcagcctccactcactcatgt	660
tcattctgaagtctgtgactaaacaatgatcaacagtttaataccctcatctttctttcc	720
cacagGAGACCCAGGGACAGATCCAGAAATGCAAGTGTAAACGGTTTTATCGGCCG	780
<u>G D</u> P G N R S Q K C K C L N G F I G R	37
CGTCACCCACATCTCATCAAGTCAGAGCCAGTCATACACCAGCCAAACATCTTCTGTCC	840
V T P H L I K S E P V I H Q P N I F C P	57
TCAGTTGGAAATTATTTATgtgagtaaatgagctgaattaatttaacatttactggcgagt	900
Q L E I I I	63
tattcttcagggttctcccttacatgtcgtgttcttccctccagTACTTTAACAGGAAAT	960
T L T G N	68
AAGGAGAAATGTGTGAATCCACTGTACCATTTGGAAAGCTGCTTCTGAAAAACCAAAG	1020
K E K C V N P L S P F G K L L L K N Q K	88
AAgtaagttcagcttgctgcactatcctccgacaacatgacagtccttaatgctgcaggt	1080
K	89
ctctactgatactgtggtgtgcagattcacattggttttttactaactgcgttggtttgtc	1140
gattcagGAACGAGAGCAAAGCAGCTGTGGTCATGACAACGGCCTCCAGTCAAACGAACA	1200
N E S K A A V V M T T A S S Q T N	106
CCTGGAGCTCAACACGACTCCGCTCCACACACTCTGCACCTAGGACGATG TAG TGGCAGC	1260
T W S S T R L R S T H S A P R T M *	123
GAAACACTGTGTTACAAATGGAAGATGTTCACTATTATTGCCTTTGTGTATTTTATTTAA	1320
ATAAGTGTCCAAAATGTTCTCAGTGGCCAGTGTCCGTTTTCTGTTCTCTTAATTTAACT	1380
TAGCTTCACATGTATATATGAAGGAGTCAATCTGTACATACATTTTCAAGAA AAATAAAAC	1440
ACACCTGATGGAAAAA	1480

图1 大菱鲆CXCL10样趋化因子基因及蛋白序列

注:翻译起始密码子(ATG)、终止密码子(TAG), 加尾信号(AATAAA)和4个保守半胱氨酸用粗体标出;下划线标出信号肽和成熟肽的断裂位点;内含子用小写字母列出。

Fig. 1 Turbot's CXCL10-like chemokine gene and putative amino acid sequences

Note: The translation start codon (ATG), termination codon (TAG), polyadenylation signal (AATAAA) and four conserved cysteines is bold; The predicted cleavage of the signal sequence to the putative mature protein is underlined; The introns were listed with lowercase letters.

2.2 系统发生分析和序列比对分析

根据推测的氨基酸序列构建了一个系统发生树(图2), 来研究该大菱鲆的CXC趋化因子和其他已知脊椎动物的CXC趋化因子的关系。从图2中可以看出, 该趋化因子和CXCL10、CXCL9以及CX-

CL11聚在一起, 并且比起其他鱼类的CXCL10(虹鳟和斑点叉尾), 它和哺乳动物CXCL10的遗传距离更相近。此外, 利用最小进化法构建的系统发生树也得到了非常相似的结果(数据未出示)。因此把该趋化因子命名为大菱鲆CXCL10。

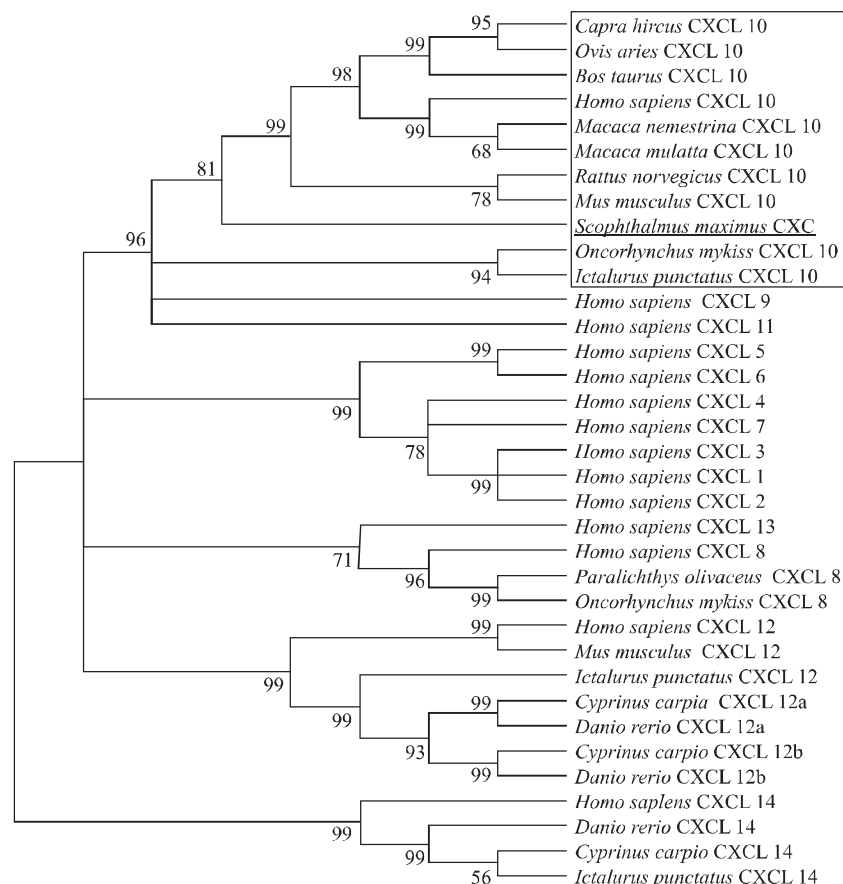


图2 基于大菱鲆 CXCL10 样趋化因子和其他已知脊椎动物 CXCL 趋化因子蛋白序列的 NJ 系统发生树

注: 节点处数值为自展置信值, 自展重复 1 000 次; 下划线标出了大菱鲆 CXCL10, 矩形框标出 CXCL10 的分支。

Fig.2 Neighbour joining tree of turbot and other vertebrate CXCL chemokine amino acid sequences

Note: Numbers at branch nodes represent the confidence level of 1 000 bootstrap replications

该趋化因子和其他已知的 CXCL10 氨基酸序列比对结果显示, 其具有较高的保守性(图 3)。它和大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的相似度为 33.7%, 和小鼠 (*Mus musculus*) 的相似度为 31.6%, 和两种猩猩 (*Macaca nemestrina* 和 *Macaca mulatta*) 的相似度为 30.6%, 但是和鱼类的两种 CXCL10 相似度较低, 分别为 21.1% (虹鳟, *Oncorhynchus mykiss*) 和 25% (斑点叉尾, *Ictalurus punctatus*)。

2.3 大菱鲆 CXCL10 样趋化因子在感染大菱鲆组织中的表达分析

为了分析大菱鲆 CXCL10 样趋化因子在体内组织中的表达情况, 本研究进行了 RT-PCR 分析。在正常的大菱鲆 11 种组织 (肝脏、脾脏、肠、头肾、肾、鳃、性腺、肌肉、心脏、脑和皮肤) 内没有检测到它的表达。研究分析了大菱鲆 CXCL10 基因在经鳃

弧菌感染的大菱鲆的肝脏、脾脏和头肾中的表达状况。在这 3 种组织中, 大菱鲆 CXCL10 基因均能够表达(图 4)。在肝脏中, 感染 12 h 后 CXCL10 基因的表达量就达到了最高, 之后逐渐降低, 到 72 h 恢复到正常水平; 在脾脏中, CXCL10 的表达量从 12 h 到 24 h 保持最高水平, 随后即表达减弱至与正常水平一致。在头肾中, CXCL10 从感染开始表达量逐渐增加, 至 24 h 表达水平最高, 随后也迅速降低至微弱表达。使用生理盐水注射大菱鲆作为阴性对照, 表达分析发现, CXCL10 的表达和未注射的大菱鲆 (正常) 一致。这也表明, 生理盐水对大菱鲆并没有产生不良影响。

此外, 分析了大菱鲆 CXCL10 基因在不同发育阶段的胚胎和感染鳃弧菌的大菱鲆胚胎细胞中的表达状况, 没有检测到它的表达。

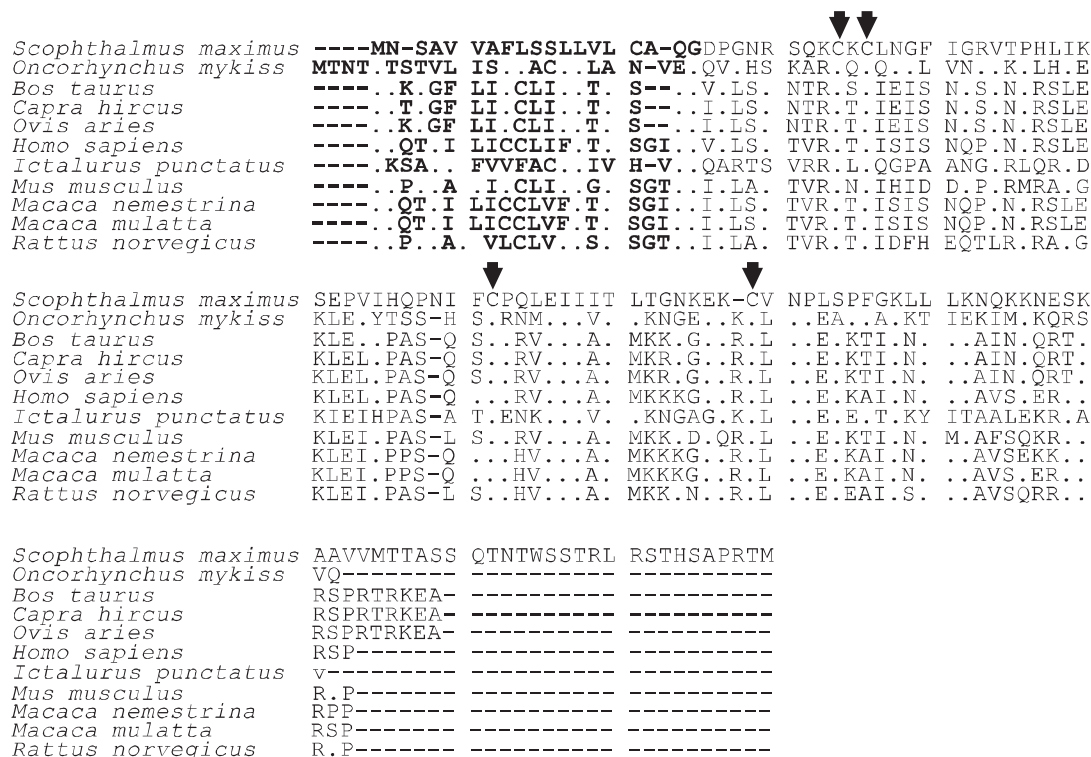


图3 大菱鲆CXCL10样趋化因子和其他已知CXCL10氨基酸序列的比对

注:圆点表示相同的氨基酸残基,横线表示空位;箭头标出4个保守的半胱氨酸残基;信号肽序列用粗体标出。

Fig.3 Alignment of deduced amino acid sequence of turbot's CXCL10-like chemokine with other known vertebrate CXCL10

Note: Identical amino acid residues are indicated by dots; Dashes indicate gaps that are introduced for optimal alignment. Arrows indicate the CXC motif; The amino acid residues in bold fronts are the signal sequences of the respective chemokines.

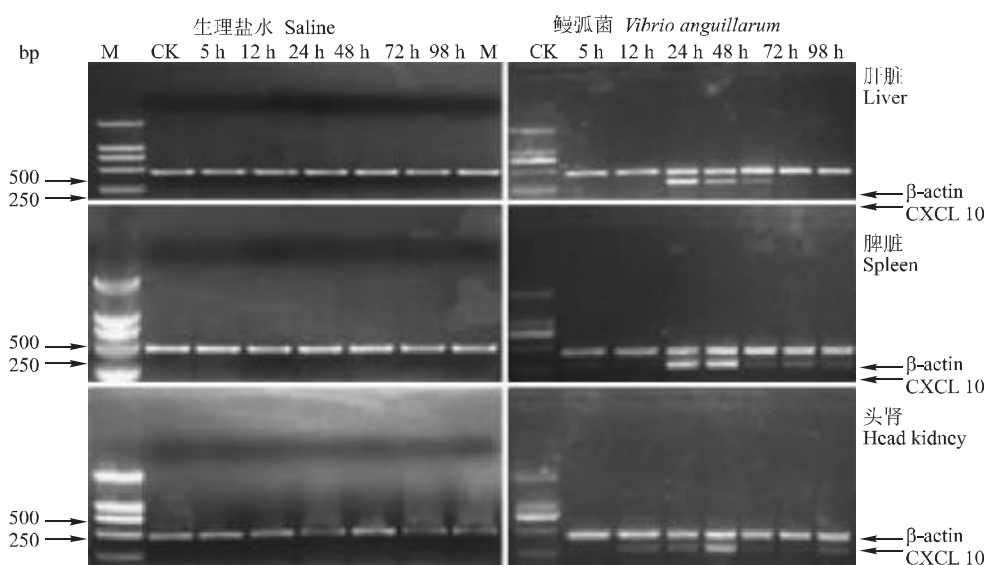


图4 CXCL10样趋化因子基因在感染鳃弧菌大菱鲆肝脏、脾脏和头肾中的表达

注:M-分子量标记;CK-未注射大菱鲆组织;CXCL10的特异扩增产物301bp和β-actin特异扩增产物450bp在右边标出。

Fig.4 Expression of turbot CXC-like chemokine in liver, spleen and head kidney tissues of infected *S. maximus*

Note: M - molecular weight standard; CK - uninfected tissues as controls; The turbot CXCL10 gene-specific RT-PCR products (301 bp) are indicated on the right margin, along with β-actin RT-PCR products (450 bp) as an internal control.

3 讨论

鱼类的先天性免疫系统在抵抗病原菌侵染过程中起着非常重要的作用。在发生炎症的位点,趋化因子在白细胞的补充过程中起着关键作用^[13]。趋化因子和白细胞表面的趋化因子受体相互作用,从而能够激活和引导嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞到达炎症发生位点^[29-31]。目前,在鱼类上克隆出的 CXC 趋化因子仍很少^[10,12,32-35],这主要是因为趋化因子的种间保守性很低,使用同源克隆的方法难以获得,相对来说使用构建 cDNA 文库和生物信息学的方法对于筛选趋化因子更有效。

本研究从大菱鲆 cDNA 文库中筛选到了一个可被病原菌诱导产生的大菱鲆 CXC 趋化因子,它类似于哺乳动物的 CXCL10。获得了其全长 cDNA,开放阅读框 (ORF) 编码一个含有 123 个氨基酸残基的多肽,其中含有的 4 个保守的半胱氨酸分别位于第

28、30、56、72 位,并且前 2 个半胱氨酸(第 28 和 30 位)被 1 个赖氨酸(29 位)隔开,该特征和 CXC 趋化因子的特征吻合。通过基因组扩增也获得了该趋化因子的基因组片段,含有 4 个外显子和 3 个内含子,内含子和外显子的位置与人和虹鳟的 CXCL10 一致,但是不同于鲤鱼的 CXCL10 趋化因子,鲤鱼的 CXCL10 趋化因子含有 3 个外显子和 2 个内含子^[13]。可以看出大菱鲆、人、虹鳟和鲤的 CXCL10 的第 3、4 个外显子差异较大,这也许暗示了它们的进化地位和不同的功能。这 3 个内含子的位置与人和虹鳟的 CXCL10 的内含子位置一致,然而在鲤的 CXCL10 中第 3 个内含子缺失。可以看出,大菱鲆、人、虹鳟和鲤相对应的第 1 和 2 个外显子的长度基本一致,而第 3 和 4 个外显子存在着比较大的差别,尤其是鲤鱼可以看作是缺失了第 4 个外显子,而大菱鲆的第 4 个外显子最长。此外,内含子的长度更显示了大菱鲆、人、虹鳟和鲤间的更大差异(图 5)。

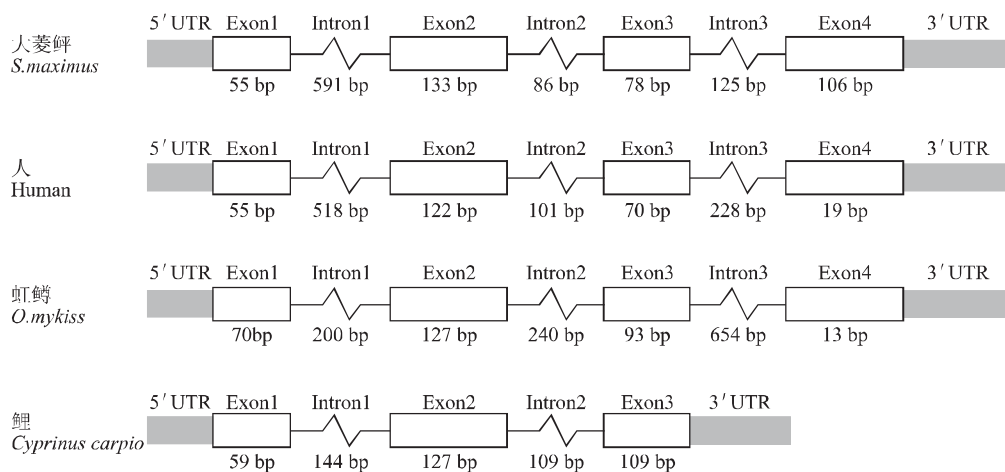


图 5 大菱鲆、人、虹鳟和鲤 CXCL10 序列比较

Fig.5 Structure comparisons of *S. maximus*' s CXCL10-like chemokine gene with CXCL10 of human, *O. mykiss* and *Cyprinus carpio*

由于已鉴定出的鱼类 CXC 趋化因子数目较少,对其进行分类命名的工作仍旧比较困难。本研究通过 BlastP 进行搜索,发现该趋化因子和哺乳类 CXCL10 最相似,其次是 CXCL9。另外构建的 NJ 树表明该趋化因子和哺乳类 CXCL10 最接近,但是这和虹鳟^[33]及斑点叉尾鲶^[17]的 CXCL10 的系统发生分析不太一致。对于鱼类趋化因子的分类需要更深入的工作,更多的鱼类趋化因子的克隆和鉴定将使得

其分类更加简单。

研究者已经发现趋化因子在白细胞的趋化作用中起着重要的作用。从哺乳动物的趋化因子的大量表达分析和功能鉴定研究中可以了解它们在免疫系统内发挥的重要作用。目前,对于鱼类的趋化因子的研究也集中在它们的免疫相关功能,这对于研究鱼类的免疫机制从而改善鱼类的抗病力会有很大的帮助。本研究进行了大菱鲆 CXCL10 在感染组织

(肝脏、脾脏和头肾)中的 RT-PCR 表达分析。大菱鲆 CXCL10 趋化因子在感染后能够被诱导高水平表达,这个结果和斑点叉尾鲷的 CXCL10 的表达分析一致^[17]。不同的是,大菱鲆的 CXCL10 在正常大菱鲆组织内没有表达迹象,而斑点叉尾鲷则在正常组织内有广泛的表达。通过对大菱鲆不同发育阶段的胚胎和感染的胚胎细胞的 RT-PCR 表达分析可以推测,大菱鲆 CXCL10 在胚胎早期发育阶段不会发生作用,可能是因为它抵抗侵染的表达机制未发育完善。可以看出,大菱鲆 CXCL10 仅在病原菌(鳃弧菌)侵染过程中有着较强的应答反应,其在大菱鲆先天性免疫系统中的表达机制需要深入研究,这对改善大菱鲆的抗病力有着重要现实意义。

参考文献:

- [1] Pasquier L D. Antibody diversity in lower vertebrates – why is it so restricted? [J]. Nature, 1982, 296: 311 – 313.
- [2] Alexander J B, Ingram G A. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish [J]. Annu Rev Fish Dis, 1992, 2: 249 – 279.
- [3] Ellis A E. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 827 – 839.
- [4] Magnadottir B. Innate immunity of fish [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20: 137 – 151.
- [5] Adler M W, Rogers T J. Are chemokines the third major system in the brain? [J]. J Leukocyte Biol, 2005, 78: 1 204 – 1 209.
- [6] Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors [J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 217 – 242.
- [7] Baggiolini M. Chemokines and leucocyte traffic [J]. Nature, 1998, 392: 565 – 568.
- [8] Cyster J G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs [J]. Science, 1999, 268: 2 098 – 2 101.
- [9] Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, et al. IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature [J]. J Interferon Cytokine Res, 2002, 22: 1 067 – 1 068.
- [10] 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.
- [11] Laing K, Secombes C J. Chemokines [J]. Dev Comp Immunol, 2004, 28: 443 – 460.
- [12] Sangrador-Vegas A, Lenington J B, Smith J. Molecular cloning of an IL-8-like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of suppression subtractive hybridization [J]. Cytokine, 2002, 17: 66 – 70.
- [13] Savan R, Kono T, Aman A, et al. Isolation and characterization of a novel CXC chemokine in common carp (*Cyprinus carpio* L) [J]. Mol Immunol, 2003, 39: 829 – 834.
- [14] Long Q, Quint E, Lin S, et al. The zebrafish scyba gene encodes a novel CXC-type chemokine with distinctive expression patterns in the vestibulo-acoustic system during embryogenesis [J]. Mech Dev, 2000, 97: 183 – 186.
- [15] Baoprasertkul P, He C, Peatman E, et al. Constitutive expression of three novel catfish CXC chemokines: homeostatic chemokines in teleost fish [J]. Mol Immunol, 2005, 42: 1 355 – 1 366.
- [16] Huising M O, Muelen T, Flik G, et al. Three novel carp CXC chemokines are expressed early in ontogeny and at nonimmune sites [J]. Eur J Biochem, 2004, 271, : 4 094 – 4 106.
- [17] Baoprasertkul P, Peatman E, Chen L, et al. Sequence analysis and expression of a CXC chemokine in resistant and susceptible catfish after infection of *Edwardsiella ictaluri* [J]. Dev Comp Immunol, 2004, 28: 769 – 780.
- [18] Luster A D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation [J]. N Engl J Med, 1998, 338: 436 – 445.
- [19] Taub D D, Lloyd A R, Conlon K, et al. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells [J]. J Exp Med, 1993, 177: 1 809 – 1 814.
- [20] Taub D D, Sayers T J, Carter C R, et al. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity [J]. J Immunol, 1995, 155: 3 877 – 3 888.
- [21] Loetscher P. The ligands of CXC chemokine receptor 3, ITAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3 [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 2 986 – 2 991.
- [22] Strieter R M, Burdick M D, Gomperts B N, et al. CXC chemokines in angiogenesis [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16: 593 – 609.
- [23] Chen S L, Xu M Y, Hu S N, et al. Analysis of immune-relevant genes expressed in red sea bream (*Chrysophrys major*) spleen [J]. Aquaculture, 2004, 240: 115 – 130.
- [24] Chen S L, Hong Y, Scherer S, et al. Lack of ultraviolet-light inducibility of the medakafish (*Oryzias latipes*) tumor suppressor gene p53 [J]. Gene, 2001, 264: 197 – 203.
- [25] Dayhoff M O, Schwartz R M, Orcutt B C. A model of evolutionary change [M]. / Dayhoff M O. Atlas of protein sequence and structure, Vol. 5, suppl. 3. Washington, DC: National Biomedical Research Foundation, 1978: 345 – 538.
- [26] Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, et al. Identification of prokaryotic and eukaryotic signalpeptides and prediction of their cleavage sites [J]. Protein Eng, 1997, 10: 1 – 6.
- [27] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3.0: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Brief Bioinform, 2004, 5: 150 – 163.
- [28] Chen S L, Li W, Meng L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 22: 172 – 181.
- [29] Oppenheim J J, Zachariae C O, Mukaida N, et al. Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine” cytokine family [J]. Ann Rev Immunol, 1991, 9: 617 – 648.
- [30] Schall T J, Bacon K B. Chemokines: leukocyte trafficking and in-

- flammation[J]. *Curr Opin Immunol*, 1994, 6: 865 – 673.
- [31] Bacon K B, Schall T J. Chemokines as mediators of allergic inflammation[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1996, 109: 97 – 109.
- [32] 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.
- [33] Laing K J, Bols N, Secombes C J. A CXC chemokine sequence isolated from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* resembles the closely related interferon-gamma-inducible chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2002, 13: 462 – 473.
- [34] Huising M O, Stet R J, Kruiswijk C P, et al. Molecular evolution of CXC chemokines: extant CXC chemokines originate from the CNS [J]. *Trends Immunol*, 2003, 24: 307 – 313.
- [35] Inoue Y, Endo M, Haruta C, et al. Molecular cloning and sequencing of the silver chimaera (*Chimaera phantasma*) interleukin-8 cDNA [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 15: 269 – 274.

Cloning, characterization and expression analysis of a CXCL10-like chemokine from turbot *Scophthalmus maximus*

LIU Yang¹, CHEN Song-lin², MENG Liang², ZHANG Yu-xi²

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory For Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China)

Abstract: Chemokines represent a superfamily of small secreted protein (6 – 14 kD), which is an essential part of both innate and adaptive immune system. They have been implicated in several immune mediated responses, such as inflammation, intercellular communication, antigen presentation, blood cell development, metastasis, viral infection and wound healing. Based on the arrangement of the first two cysteine residues of amino acid sequences, chemokines were divided into four groups: CXC, CC, C and CX3C subfamilies. A CXC chemokine gene, corresponding to clone 950, was identified from this turbot spleen cDNA library (GenBank accession number DQ339043). The CXC chemokine gene has a partial sequence of 510 bp with unknown 5' and 3' ends, which was obtained by using the methods of 5' and 3'-RACE, respectively. The complete cDNA contains a 79 bp 5' UTR, a 372 bp open reading frame (ORF) encoding 123 amino acids and a 227 bp 3' UTR. Four exons and three introns are identified in the turbot CXC chemokine gene. The three introns were 591 bp, 86 bp and 125 bp, respectively. A condensed phylogenetic tree was constructed based on the amino acid sequences of turbot CXC chemokine and other well-defined vertebrate CXC chemokines. The overall topology of the tree showed the turbot CXC chemokine clusters with all CXCL10. Alignment of amino acid residues of the turbot CXCL10 genes with those from mammals and fish indicated high level conservation of amino acid sequence. The turbot CXC10-like chemokine was not expressed in normal turbot tissues. Interestingly, the highest expression levels of the turbot CXC10-like chemokine were detected at 12 h in liver and spleen after challenging with *V. anguillarum* and at 5 h in head kidney. The expression in liver decreased gradually after 12 h and came back to the level of background after 72 h. In spleen, the expression kept high levels till the 24th hour and then became faintly consistent with background. The expression of the CXC chemokine was not detected in normal tissues of turbot, which suggested that it was only induced when challenged with *V. anguillarum*. These results indicate that the turbot CXC10-like chemokine plays an important role in turbot immune response. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 554 – 562]

Key words: CXC; Chemokine; CXCL10; *Scophthalmus maximus*; Infection; cDNA

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn