

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00918

大菱鲆趋化因子受体 *CCR3* 和 *CCR9* 基因的克隆及组织表达

孟艳青^{1,2}, 刘晓飞^{1,2}, 刘洋^{1,2}, 常亚青^{1,2}, 王秀利^{1,2}, 姜志强^{1,2}

1. 农业部北方海水增养殖重点实验室, 大连海洋大学, 辽宁 大连 116023;

2. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023

摘要: 本实验克隆了大菱鲆趋化因子受体基因 *CCR3* 和 *CCR9* 的全长 cDNA, 并进行了鉴定。其中, 全长 cDNA 的克隆采用了 5' 和 3'-RACE。*CCR3* cDNA 全长 1 451 bp, 包括 92 bp 的 5' 非编码区, 276 bp 的 3' 非编码区以及编码 360 个氨基酸的 1 083 bp 的开放阅读框。*CCR9* cDNA 全长 1 441 bp, 包括 59 bp 的 5' 非编码区, 278 bp 的 3' 非编码区, 以及编码 367 个氨基酸的 1 104 bp 的开放阅读框。两种受体均具有 7 次跨膜结构, 符合 G 蛋白偶联受体的序列特征。系统进化分析表明, 大菱鲆 *CCR3* 与其他鱼类 *CCR3* 聚为一支, 大菱鲆 *CCR9* 也与其他鱼类的 *CCR9* 聚为一支; 系统进化树显示的亲缘关系符合各物种的进化地位。实时定量 PCR (qRT-PCR) 表明这两个基因在大菱鲆正常组织中均有一定量的表达, 尤其是它们在头肾、脾及心脏中均有高水平的表达。在脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导之后, *CCR3* 在脾和肝中的表达水平与对照组有显著性差异($P<0.05$), 而 *CCR9* 的表达水平仅在肝中与对照组有显著性差异($P<0.05$)。两个基因在免疫相关组织中表达水平较高, 并且能够对 LPS 产生免疫应答, 说明它们在大菱鲆免疫系统中发挥了重要功能。

关键词: 大菱鲆; 趋化因子受体; *CCR3*; *CCR9*; 克隆; 表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)05-0918-13

鱼类在进化上是介于仅具有天然免疫系统动物和主要依赖获得性免疫系统动物的中间类群^[1], 相对于高等脊椎动物, 鱼类的先天性免疫系统在抵抗病原侵染过程中起着主要的作用。研究表明, 像哺乳动物一样, 鱼类也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性和获得性免疫。近年来的研究发现, 趋化因子及其受体的相互作用参与细胞的生长、发育、分化、凋亡和分布等多种生理功能, 并在多种病理过程中发挥重要作用, 如炎症反应、病原体感染、创伤修复及肿瘤形成和转移等^[2-5]。趋化因子受体属于 G 蛋白偶联受体, 具有 7 次跨膜结构。*CC* 趋化因子受体 3(*CCR3*) 是一种嗜酸性粒细胞的趋化因子受体, 能与很多 *CC* 类趋化因子结

合起作用, 其中包括 *CCL11(CC* 趋化因子配体 11)、*CCL26*、*CCL7*、*CCL13*、*CCL5* 等^[6-7]。它不仅表达于嗜酸粒细胞, 而且在淋巴细胞、巨噬细胞、气道上皮细胞中也有表达^[6-9]。*CCR3* 对嗜酸性粒细胞进入气管起关键作用^[9-10], 因此 *CCR3* 拮抗剂很可能可有效治疗哮喘^[11]。*CC* 趋化因子受体 9(*CCR9*) 是趋化因子 *CCL25* 唯一的受体, 2 种分子都存在于胸腺皮质和小肠黏膜^[12-13]。有报道证明, *CCR9* 广泛表达于大多数的上皮淋巴细胞和固有层 T 细胞, 可以介导 T 细胞到小肠, 并能调节小肠炎症疾病^[14-16]。此外, 在慢性炎症性肝病中, *CCR9* 可能介导 T 细胞由肠转移到肝^[17]。*CCR9* 不仅在 T 细胞中表达, 而且在小肠的 B 细胞中和浆细胞样树突细胞中也有表达^[18-20]。此外,

收稿日期: 2012-10-18; 修订日期: 2013-01-16.

基金项目: 辽宁省教育厅计划项目(2009A171).

作者简介: 孟艳青(1984-), 女, 硕士研究生, 生物化学与分子生物学专业. E-mail: tegong19871222@163.com

通信作者: 刘洋, 副教授. E-mail: liuy78@foxmail.com

CCR9 在一些癌细胞中也被检测到, 可能调节癌细胞的迁移和入侵^[21]。

近年来, 通过对鱼类基因组及 EST 序列的系统研究, 已经鉴定出斑马鱼(*Danio rerio*)中的 26 个受体基因对应着至少 111 个趋化因子基因, 而人类已知的 18 个趋化因子受体仅对应着 44 个趋化因子。Nomiyama 等^[22]在斑马鱼中发现了另外一种趋化因子亚家族 CX 型趋化因子亚家族, 但是否存在 CX 趋化因子的特殊受体仍未知。迄今为止, 已研究的趋化因子受体仅为趋化因子受体家族的少数成员。在模式生物斑马鱼中, 已鉴定出 17 种 CC 趋化因子受体^[23]; 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中已鉴定出 CCR7、CXCR4 和 CXCR8^[24-25], 后来 CCR7 又被重新鉴定为 CCR9, 而另外一个 CCR9B 也被鉴定出来^[26]。其他鱼类中也鉴定出一些趋化因子受体, 如从鲤(*Cyprinus carpio*)的差减文库中筛选到 CXCR4; 在软骨鱼类小体鲟(*Acipenser ruthenus*)、鮀鲨(*Lamna ditropis*)和斑马鱼中均发现 CXCR4^[3]; 在软骨鱼类象蛟(*Cetorhinus maximus*)、食人蛟(*Carcharodon carcharias*)、杂斑鳐(*Raja naevus*)中发现 CXCR1 和 CXCR2^[3]; 河鲀(*Takifugu rubripes*)中, 两个分别被命名为 CXCR1 和 CXCR2 的 IL-8 受体也被鉴定出来^[27]; 在斑马鱼中, 也有 CXCR3、CXCR5 的同源基因被鉴定出来^[28-29]。近年来, 建立了一些大菱鲆免疫相关的 EST 文库, 并筛选出了不少免疫病相关基因^[30-31]。此外, 对于众多免疫相关基因, 包括天然抗性相关巨噬蛋白^[32]、抗菌肽^[33]、MHCIIA 和 B^[34]以及趋化因子也进行了相关研究。到目前, 大菱鲆中 3 个 CXC 趋化因子, 1 个 CC 趋化因子和 CXCR4 已有相关报道^[35-40]。

目前为止, 仍没有直接的证据或迹象揭示大菱鲆 CCR3 和 CCR9 基因的功能。本研究的主要目标是克隆这两个基因的全长 cDNA, 并探索它们在不同组织中的表达情况, 以及在免疫相关组织中对 LPS 的应答, 从而推断它们与免疫抗病的相关性, 为研究大菱鲆 CCR3 和 CCR9 基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大菱鲆购自大连天正实业有限公司, 体质量 50~100 g, 实验室喂养 1 个月, 水温 16~20℃。

1.2 LPS 诱导和取样

将大菱鲆分为 2 组, 一组每尾注射质量浓度为 1 mg/mL 的 LPS 0.2 μL, 共 18 尾; 另一组每尾注射 0.2 μL 生理盐水(Physiological Saline, PS)作为对照组, 共 18 尾。注射 6、12、24、48、72、96 h 后各组分别取出 3 尾使用鱼安定(MS-222)进行麻醉, 解剖取出肝、脾、血液和头肾, 保存于-80℃ 用于 RNA 提取。同样方法麻醉解剖正常大菱鲆, 取出肝、脾、肠、头肾、肾、鳃、血液、肌肉、心脏、脑和皮肤保存于-80℃ 用于 RNA 提取。

1.3 引物设计

根据 GenBank 已公布的 2 种趋化因子受体的部分 cDNA 序列(CCR3: DQ454090; CCR9: DQ848940), 利用生物学软件 Primer Premier 5.0 进行引物设计。以 β-actin (EU686692) 基因片段设计的引物(ActbF 和 ActbR)作为内参。以上引物序列及用途见表 1。

1.4 总 RNA 的提取和全长 cDNA 的扩增

总 RNA 的提取采用 Trizol 法(Invitrogen, 美国), 并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测及紫外分光光度计定量。CCR3 和 CCR9 基因的全长 cDNA 从大菱鲆的脾中克隆。提取 11 种不同组织及 LPS 和 PS 处理的组织的总 RNA 用于 qRT-PCR 分析。

5'-RACE 和 3'-RACE 使用 Smart RACE cDNA amplification kit (Clontech) 试剂盒进行。采用以下程序进行 Touch down PCR 反应: 94℃ 2 min; 94℃ 5 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 5 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 10 个循环; 94℃ 5 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 25 个循环; 72℃ 10 min。然后采用巢式 PCR 获得目的基因片段。将扩增得到的片段与 pMD19-T 载体(Takara, 日本)连接, 并转化到 DH5α 大肠杆菌中, 然后筛选阳性克隆少量培养并送样测序。

1.5 序列以及系统发生分析

使用 DNASTAR 5.0 软件处理测序得到 DNA 序

列, 然后将测序得到的核酸序列以及推导出的氨基酸序列与其他物种进行序列比对^[41]。氨基酸序列跨膜区预测使用 TMHMM2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行预测。使用 Clustal W 程序对大菱鲆两种趋化因子受体基因分别与其他物种的相应基因进行氨基酸序列的同源性比较^[42]。系统进化树的构建基于推导的氨基酸序列, 使用 MEGA 4.0 软件中邻接法构建系统进化树, 计算方法为 Neighbour-joining^[43]。

1.6 CCR3 和 CCR9 基因组织表达分析

取各样品 RNA 500 ng 经 DNase I 处理之后配制 10 μL 反转录体系合成 cDNA, 然后稀释为 100 μL 作为 qRT-PCR 的模板。

本研究采用的是 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国), 每次反应均为 20 μL 体系: 2×SYBR Green Real time PCR Master Mix (Takara), 上下游引物(qCCR3F 和 qCCR3R 用于 CCR3; qCCR9F 和 qCCR9R 用于 CCR9)各 5 μmol/L, 2 μL cDNA 模板。反应条件采用三步法: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 32 s, 40 个循环; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s。根据 β -actin 基因片段设计的引

物 ActbF 和 AcfbR 作为内参(表 1)。

应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测趋化因子受体在组织中的表达, 并用 SPSS 统计软件对数据进行显著性分析。基因表达不同阶段间的相关性采用单因素方差分析(one-way ANOVA)法进行方差分析。LPS 和 PS 处理后基因表达差异采用配对样本 t 检验(Paired-Samples T test)进行分析, 以 $P<0.05$ 为差异显著, 以 $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 CCR3 和 CCR9 全长 cDNA 的克隆与鉴定

根据 CCR3 已知的部分序列, 得到了未知的中间片段以及未知的 3'末端。最终通过拼接得到全长 1 451 bp 的重叠群(contig), 包括 92 bp 的 5' 非编码区, 276 bp 的 3'非编码区以及编码 360 个氨基酸的 1 083 bp 的开放阅读框(图 1A)。CCR9 的克隆采用与 CCR3 相同的方法, 最终得到全长 1 441 bp 的重叠群, 包括 59 bp 的 5'非编码区, 278 bp 的 3'非编码区, 以及编码 367 个氨基酸的 1 104 bp 的开放阅读框(图 1B)。此外, 在 poly (A)尾巴前 13 bp 处有 AATAAA 加尾信号。两个基因的

表 1 本研究中使用的引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primer name	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')	引物用途 function of primer
CCR3S	TTAGCACAGTGACAAACATCT	CCR3 未知的中间片段扩增
CCR3A	CACGTACAGGGCATAGTCT	
CCR3R5	TGCACCACTGCGAGGTATCGGTCAAT	CCR3 5'RACE 引物
CCR3R5n	GAGCTGTAGAACGCCGATG	CCR3 5'RACE 巢式引物
CCR9S	GCATGTGCGACAGAACAGGT	CCR9 未知的中间片段扩增
CCR9A	CACATACAGGAAGGGATTGA	
CCR9R3	TGTGTTGTCCTCTCCCAGCTGCCGTA	CCR9 3'RACE
CCR9R3n	CTGCTGTAGTGGAGGCC	CCR9 3'RACE 巢式
UPM	CTAACATCGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT CTAACATCGACTCACTATAGGGC	Clontech RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Clontech RACE 巢式
qCCR3F	ATTGCCTCAGTTGTGGTTGG	CCR3 实时定量 PCR
qCCR3R	GACAGGATTGGACAGTGATTCT	
qCCR9F	CAGAACCTGAAGAGAAAGCGAC	CCR9 实时定量 PCR
qCCR9R	TCACCCGAGCAAAGATGAAC	
ActbF	GTATGGGCCAGAAGGACAGCTA	β -actin 实时定量 PCR
AcfbR	TCATCCCAGTTGGTCACAATACC	

氨基酸序列经过跨膜区预测分析发现均有 7 次跨膜区，符合 G 蛋白偶联受体的特点(图 1)。

2.2 序列比对分析和系统发生分析

大菱鲆 2 种趋化因子受体的氨基酸序列与其他鱼类及哺乳类趋化因子受体的比对结果表明，

这些基因具有很高的同源性(图 2)。趋化因子受体的特征包括 DRYLAIVHA 序列或其变异序列(与趋化因子受体信号转导密切相关), 以及图 2 中显示的半胱氨酸。我们根据氨基酸序列构建了系统进化树, 来探索大菱鲆 CCR3、CCR9 与其他脊椎

cacttccctgtgaccacatcaaactcgctcttgaacacccaaaaagtcctcgccgataaaactccagccATGAA	cgccgggtggacagttacgcg	111
AGTATCAGAACCTCTGTGACCTGTCATGACACTAGCACGACTGACCCGAGCTACGGTCACTGAAACTGTCACCC	M N D E D	6
Q Y Q N F L D L F N D T S T T D P S Y V V S K T V T I C T K	AGGCCATACAACAACTTGGTGCAGATTCTACCGGTTTCTACTATGTCACCTCTCTGAGTTACCTGGCAACGGCTTGCTT	201
Q A I N N F G A R F I P V F Y Y V N F L L S Y L G N G L V L	TCATCATCTACAAGTATGAGAAGCTCACACAGTGACAAACATATTCTCTGCAATTGGTCTATCCAACATCTCTTGGCACCAGCC	291
F I I Y K Y E K L N T V T N I F L L N L U S N I L F A T S	F I I Y K Y E K L N T V T N I F L L N L U S N I L F A T S	66
TGCCCTCTGGCGGCATACCATCAGTCGGAGTGGATTTGGCCAGGCTCTGTGTAAGTGGTCAGCAGCGCTACTTCATCGGCTCT	TGCCCTCTGGCGGCATACCATCAGTCGGAGTGGATTTGGCCAGGCTCTGTGTAAGTGGTCAGCAGCGCTACTTCATCGGCTCT	381
L P F W A A Y H Q S E W I F G Q G A L C K M V S S A Y F I G F	L P F W A A Y H Q S E W I F G Q G A L C K M V S S A Y F I G F	96
ACAGCTCCATCTCTCCACGGCTCATGACCATGACCGATACTCGCAGTGGCAGCTACAGGAGAAAGG	ACAGCTCCATCTCTCCACGGCTCATGACCATGACCGATACTCGCAGTGGCAGTACAGGAGAAAGG	471
Y S S I L F L T L M T I D R Y L A V V H A V A V T K S R R K	Y S S I L F L T L M T I D R Y L A V V H A V A V T K S R R K	561
CAAATGCCATATTGGCTCAAGTTGGTTGGTGTATCTACTGTTGCAAGTCTGAAGAGCTGTTTACAGAAATGTTGGAGAGTC	CAAATGCCATATTGGCTCAAGTTGGTTGGTGTATCTACTGTTGCAAGTCTGAAGAGCTGTTTACAGAAATGTTGGAGAGTC	651
A N A I I A S V V V W C I S V V A S L K E L V L Q N V W E S	CGTAACTAACAGTACTGAGTGGAGCTCAGGATACCAAGAGATCACCATCAAGACTGGCTCTCTGCACTTACATACAGCTTC	186
P Y N G L M C E E S G Y Q E I T M K Y W R L V S Y Y Q Q F L	P Y N G L M C E E S G Y Q E I T M K Y W R L V S Y Y Q Q F L	741
TCTCTCTCTGCTGCTCTGTTGAGTGTACTGTCATCAGAATACTGTGTCGAATCCCTGTCACCCGATGAAGGAGAAGTGC	TCTCTCTCTGCTGCTCTGTTGAGTGTACTGTCATCAGAATACTGTGTCGAATCCCTGTCACCCGATGAAGGAGAAGTGC	831
L F F L L P L F L V M Y C Y I R I T V R I L S T R M K E K C	L F F L L P L F L V M Y C Y I R I T V R I L S T R M K E K C	246
GTGCGCTGCAAGCTCATATTGGTATCATCTCACGTTCTCATCTGCTGACACCTAACACATCTCATCTCATCAGCTACAGTACAGA	GTGCGCTGCAAGCTCATATTGGTATCATCTCACGTTCTCATCTGCTGACACCTAACACATCTCATCTCATCAGCTACAGTACAGA	921
R A V K L I F V I I F T F F I C W T P Y N I L I L I Q A I Q	R A V K L I F V I I F T F F I C W T P Y N I L I L I Q A I Q	276
TCTCCAGGAGAACGAGATGGCAGCTCATGCTCTGAGAGCTTAGACCTGACCCGCAACGTCAGGCTACCTGTTACTGTT	TCTCCAGGAGAACGAGATGGCAGCTCATGCTCTGAGAGCTTAGACCTGACCCGCAACGTCAGGCTACCTGTTACTGTT	1011
I S N E N E D G D S C S E S L D Y A L Y V T R N V A Y L Y	I S N E N E D G D S C S E S L D Y A L Y V T R N V A Y L Y	306
GTATCAGTTCTGTTTATACATTGGGAAAGAACAGTCCAGGCACTTCAGGAGGTGTATGGCAAAGAACAGTCCCATGTCGAAGA	GTATCAGTTCTGTTTATACATTGGGAAAGAACAGTCCAGGCACTTCAGGAGGTGTATGGCAAAGAACAGTCCCATGTCGAAGA	1101
C I S S V F Y T F V G K K F Q S H F R R L M A K K I P C L K	C I S S V F Y T F V G K K F Q S H F R R L M A K K I P C L K	336
GACACATCAGCCTCAGGCCAGGAGCACCCAGATCCACATCACAGAACGACCAACTCTGCTTATGACTACTAGAcacagacacacacacac	GACACATCAGCCTCAGGCCAGGAGCACCCAGATCCACATCACAGAACGACCAACTCTGCTTATGACTACTAGAcacagacacacacac	1191
R H I S L S S Q S T R S T S Q K T P H S A Y D Y *	R H I S L S S Q S T R S T S Q K T P H S A Y D Y *	360
acacacacacacacacactggacaatcacatagacttgtatctctctgttagtctgaggcctgttaaagggtgttcaattgtgtcttta	acacacacacacacactggacaatcacatagacttgtatctctctgttagtctgaggcctgttaaagggtgttcaattgtgtcttta	1281
gttgggaatgcaggagcattcagttaacttctgtcagactttttaaaaaaaaaaaagttgttaccaataacttgattacataaagtt	gttgggaatgcaggagcattcagttaacttctgtcagactttttaaaaaaaaaaaagttgttaccaataacttgattacataaagtt	1371
tgtatattccaaatgttagatataatgtgaataagattatgtcatgtcagaatgttccacaacgtgtcgagccggtaa	tgtatattccaaatgttagatataatgtgaataagattatgtcatgtcagaatgttccacaacgtgtcgagccggtaa	1451

图 1 大菱鲆 *CCR3(A)* 和 *CCR9(B)* 基因 cDNA 和推导的氨基酸序列

终止密码子用星号表示，加尾信号(AATAAA)用黑框标出，7次跨膜结构用黑色水平线表示。

Fig. 1 The cDNA sequences of *Scophthalmus maximus* CCR3(A) and CCR9(B) gene and deduced amino acid sequence. The asterisk represents stop codon. The polyadenylation signal (AATAAA) is boxed. The seven transmembrane domains are underlined.

A

图 2 大菱鲆 CCR3(A)及 CCR9(B)与其他物种氨基酸序列比对

完全相同的序列用星号表示，同源性较强和较弱的序列分别用:和.来表示，缺失用-表示，保守的半胱氨酸残基用向上的黑色箭头表示。DRYLALIVHA 序列用黑色水平箭头表示。序列的 GenBank 接收号在图 3 中列出。

Fig.2 Alignment of deduced amino-acid sequences of *Scophthalmus maximus* CCR3(A) and CCR9 (B) with other known vertebrate orthologues.

The residues identical in all sequences were shown with asterisks (*), whereas those with strong homologies and weak similarities were marked by colons (:) and dots (.), respectively. Gaps were introduced by (-) during the alignment process. The conserved cysteines were shown with black up arrows. The DRVLAIVHA sequence or a variation of it was shown with black horizontal arrows.

The Accession numbers of GenBank were shown in fig. 3.

动物 CCR3、CCR9 的关系(图 3)。所有 CCR3 受体聚在同一大分支, 所有 CCR9 受体聚在另一个大分支内。系统进化树显示的亲缘关系符合各物种的分类地位。与哺乳动物相比, 两栖类非洲爪蟾的 CCR3 受体和鱼类的亲缘关系更近。鱼类的 CCR3 受体聚类到一个分支内。大菱鲆的 CCR3 和斑马鱼的 CCR3-3 及其他鱼的 CCR3 亲缘关系更近。这与 Liu 等^[23]的分析一致。大菱鲆 CCR9 与鲈 CCR9、裸盖鱼 CCR9 及斑马鱼 CCR9b 亲缘关系

更近。系统进化树显示出所有鱼类的 CCR9 分为两类, 一类是与斑马鱼 CCR9a 聚为一类的 CCR9 受体, 另一类则是与斑马鱼 CCR9b 聚为一类的 CCR9。这也与 Liu 等^[23]和 Dixon 等^[26]分析的一致。

2.3 大菱鲆 CCR3 和 CCR9 的组织表达

使用 qRT-PCR 方法检测了大菱鲆 CCR3 和 CCR9 基因的 mRNA 在正常组织中的表达情况。它们在正常大菱鲆组织中均有一定的表达。两个基因的 mRNA 在头肾、脾及心脏中均有高水平的

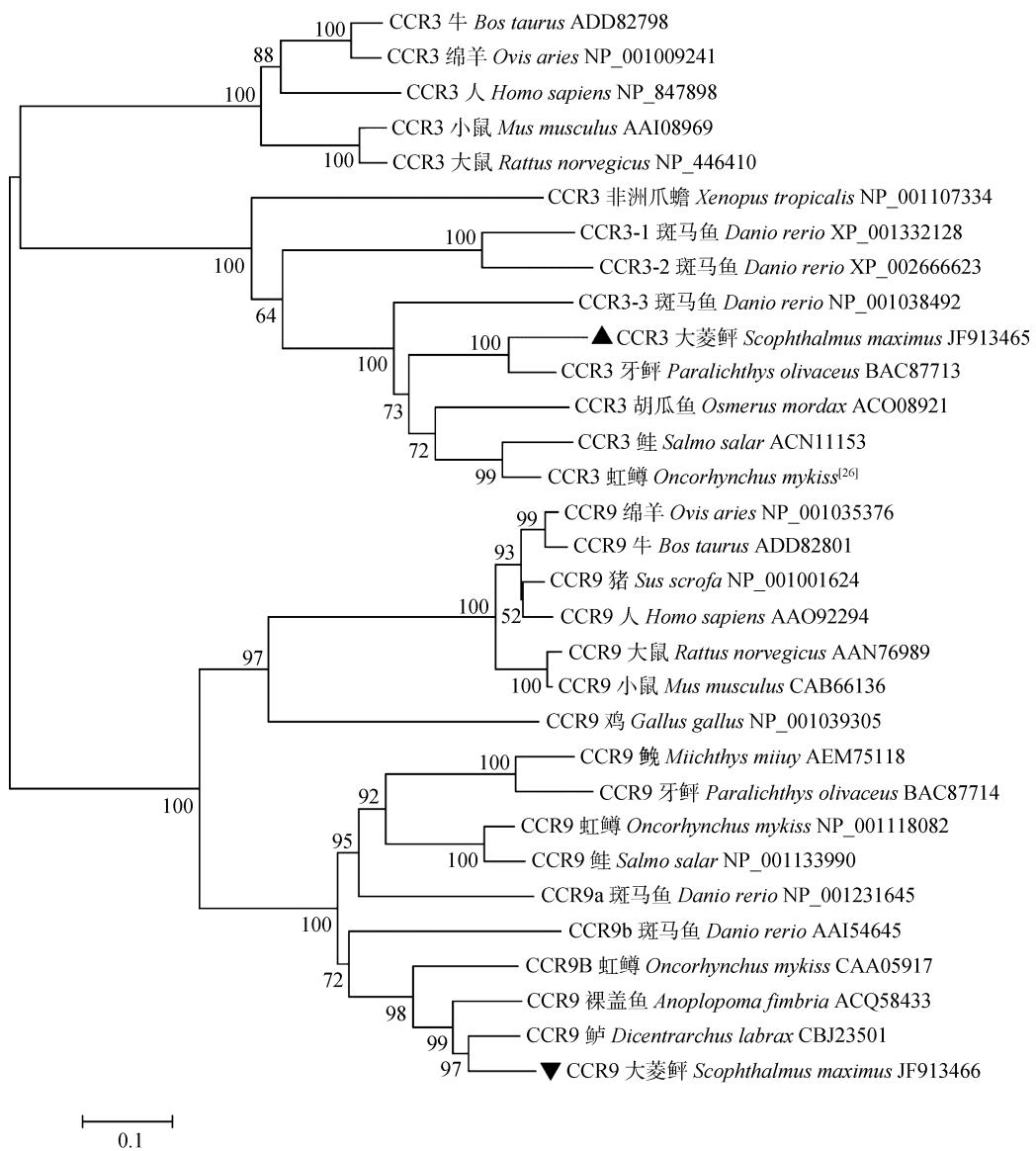


图 3 不同物种趋化因子受体基因的系统进化分析

分支上的数值代表 1 000 bootstrap 的置信度。GenBank 接收号在物种名右侧列出。大菱鲆 CCR3 用▲标注, CCR9 用▼标注。

Fig. 3 Chemokine receptors genes phylogenetic analysis of different species

Numbers at branch nodes represent the confidence level of 1 000 bootstrap replications. The accession numbers of GenBank were shown on the right of species names. Turbot CCR3 were marked by “▲”, and CCR9 were marked by “▼”.

表达(图 4)。此外 *CCR9* 基因也在鳃和皮肤中有较高水平表达(图 4)。

在脾中, 注射 LPS 组与对照组的 *CCR3* 的表达量存在极显著差异($P<0.01$), 注射脂多糖后呈现波浪形的表达趋势, 其中 6 h 检测到强烈表达(图 5A)。*CCR9* 表达量与对照组无显著性差异($P>0.05$), 注射脂多糖 0 h 到 24 h 期间, 表达量显著上升, 在 48 h 达到峰值, 72 h 表达量开始下降, 96 h 恢复到初始水平(图 6A)。

在头肾中, *CCR3* 在注射 LPS 组与对照组的表达量均无显著性差异($P>0.05$), 注射脂多糖 24 h,

CCR3 表达量升高, 之后表达量下降趋于初始水平(图 5B)。*CCR9* 注射 LPS 组与对照组的表达量也无显著性差异($P>0.05$), 注射脂多糖后 6 h, 表达量显著升高, 12 h 之后无明显变化(图 6B)。

在肝中, *CCR3* 的表达量在注射 LPS 组与对照组间均存在极显著差异($P<0.01$), *CCR3* 表达量 2 次显著变化分别出现在脂多糖注射后 24 h 和 72 h, 其他时间的表达量维持在初始水平。在对照组中, *CCR3* 的表达量从初始值缓慢下降直到 96 h(图 5C)。*CCR9* 的表达量在注射 LPS 组与对照组间存在显著差异($P<0.05$), 脂多糖刺激 24 h 和 72 h 后

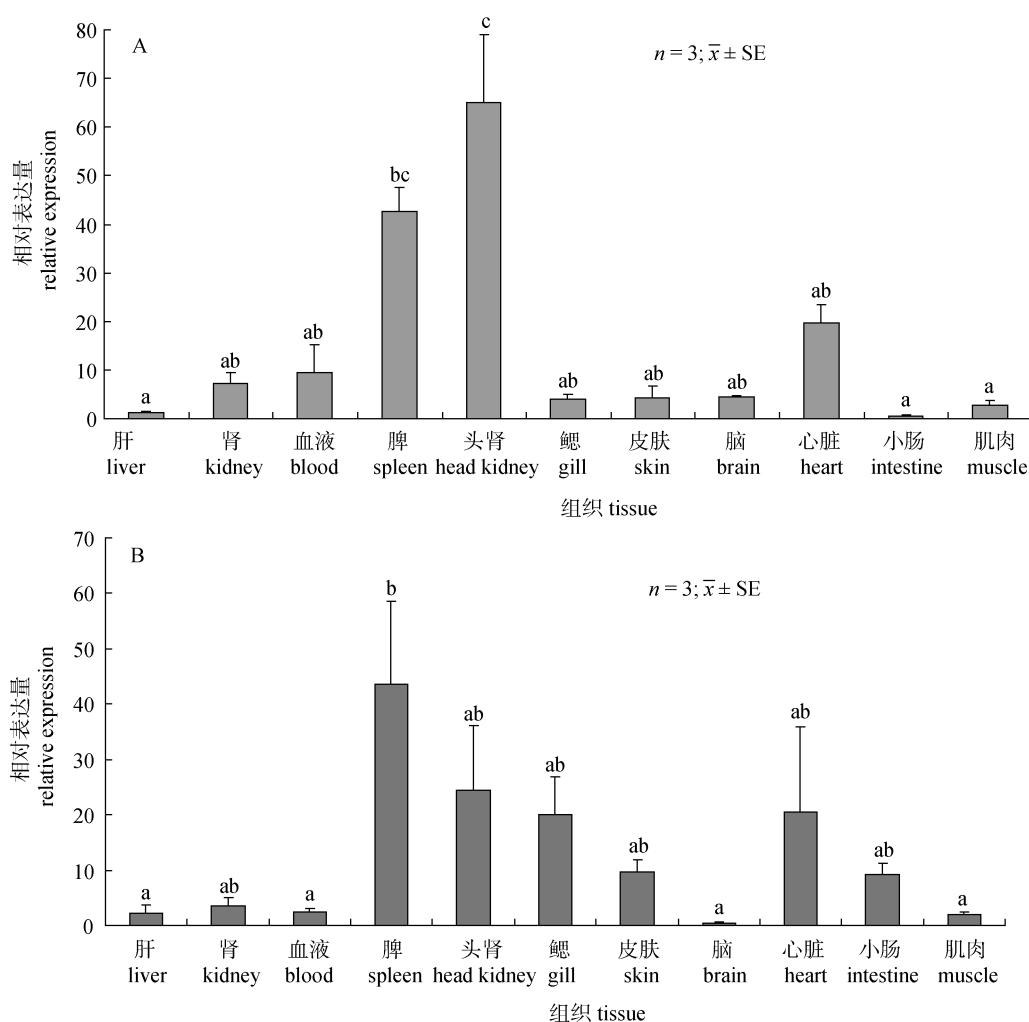


图 4 *CCR3* mRNA (A) 和 *CCR9* mRNA(B) 在大菱鲆正常组织中的表达

把各基因在肝中的表达水平做为基线, 设为 1. 柱图上方不同字母表示组织间差异显著($P<0.05$)。

Fig.4 The expression pattern of *CCR3*(A) and *CCR9*(B) mRNA in various tissues from untreated *Scophthalmus maximus*. Expression level in liver was chosen as the cardinal, set as 1. Different letters above columns denote significant difference among tissues ($P<0.05$).

分别出现强烈表达(图 6C)。

在血液中, 注射 LPS 组与对照组 CCR3 的表

达量无显著性差异($P>0.05$), CCR3 表达量在注射脂

多糖后 6~24 h 逐渐升高, 24 h 达到高峰然后缓慢

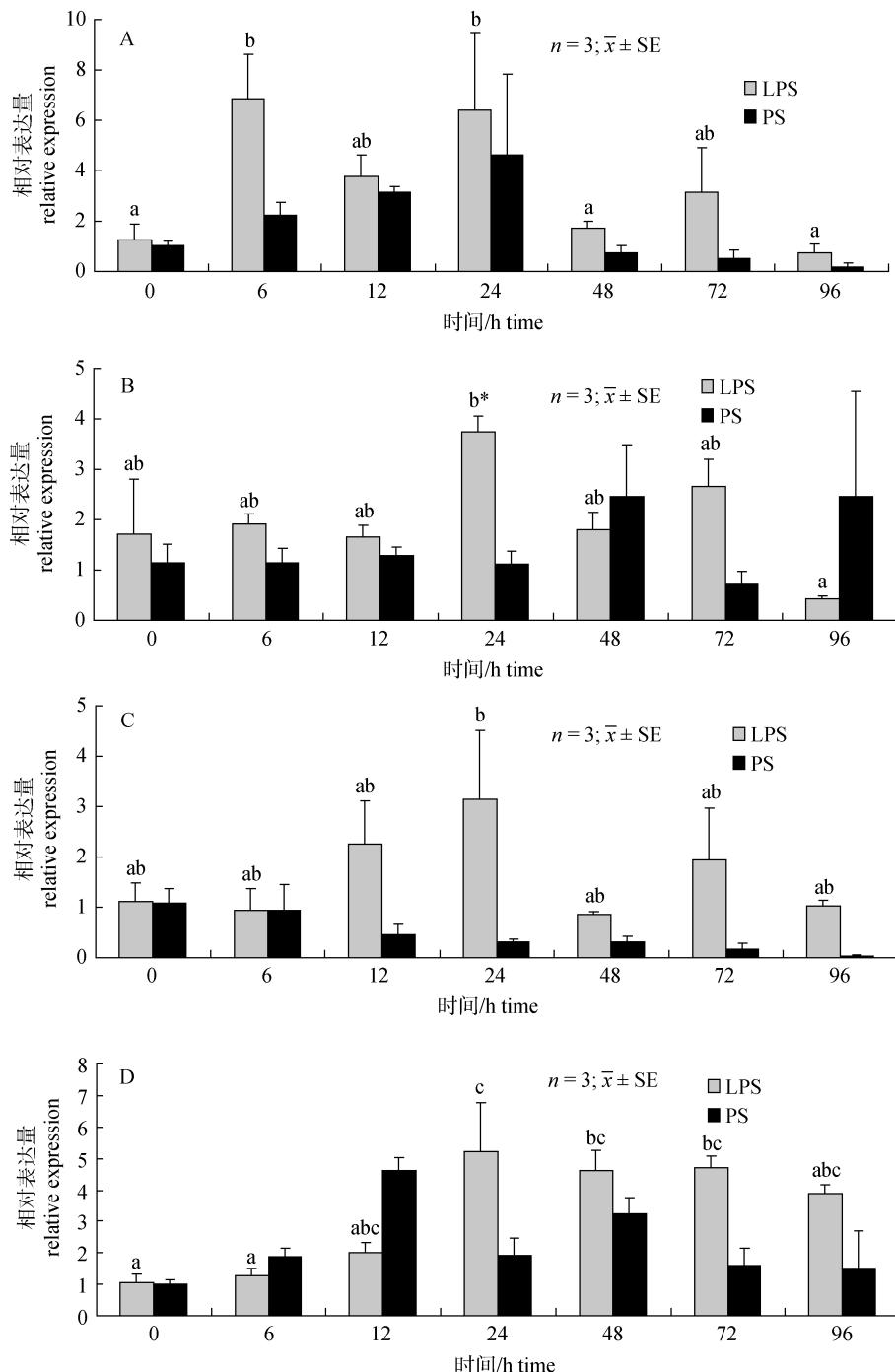


图 5 CCR3 mRNA 在大菱鲆脾(A)、头肾(B)、肝(C)和血液(D)中表达量的 RT-PCR 分析

把 0 h 时的基因表达量作为基线, 设为 1。柱图上方不同字母表示不同时间点之间差异显著($P<0.05$)。*表示与对照组差异显著($P<0.05$)。LPS: 脂多糖; PS: 生理盐水。

Fig.5 The quantitative RT-PCR analysis of CCR3 mRNA expression in spleen (A), head kidney (B), liver(C) and blood(D) of *Scophthalmus maximus*

Expression level at 0 h was chosen as the cardinal, set as 1. Different letters above columns denote significant difference between times ($P<0.05$). * denotes significant difference compared with control ($P<0.05$). LPS: lipopolysaccharide; PS: physiological saline.

下降(图 5D)。注射 LPS 组与对照组 CCR9 的表达量无显著性差异($P>0.05$)，*CCR9* 的表达量在注射脂多糖后 6 h 显著升高，然后从 12 h 到 24 h 逐渐下降，之后从 48 h 到 96 h 持续升高，96 h 达到高

峰(图 6D)。

本研究发现，与脾、头肾和血液相比较，*CCR9* 在肝中具有显著性差异表达，表明在肝中*CCR9* 对 LPS 的敏感程度高于其他 3 种组织。

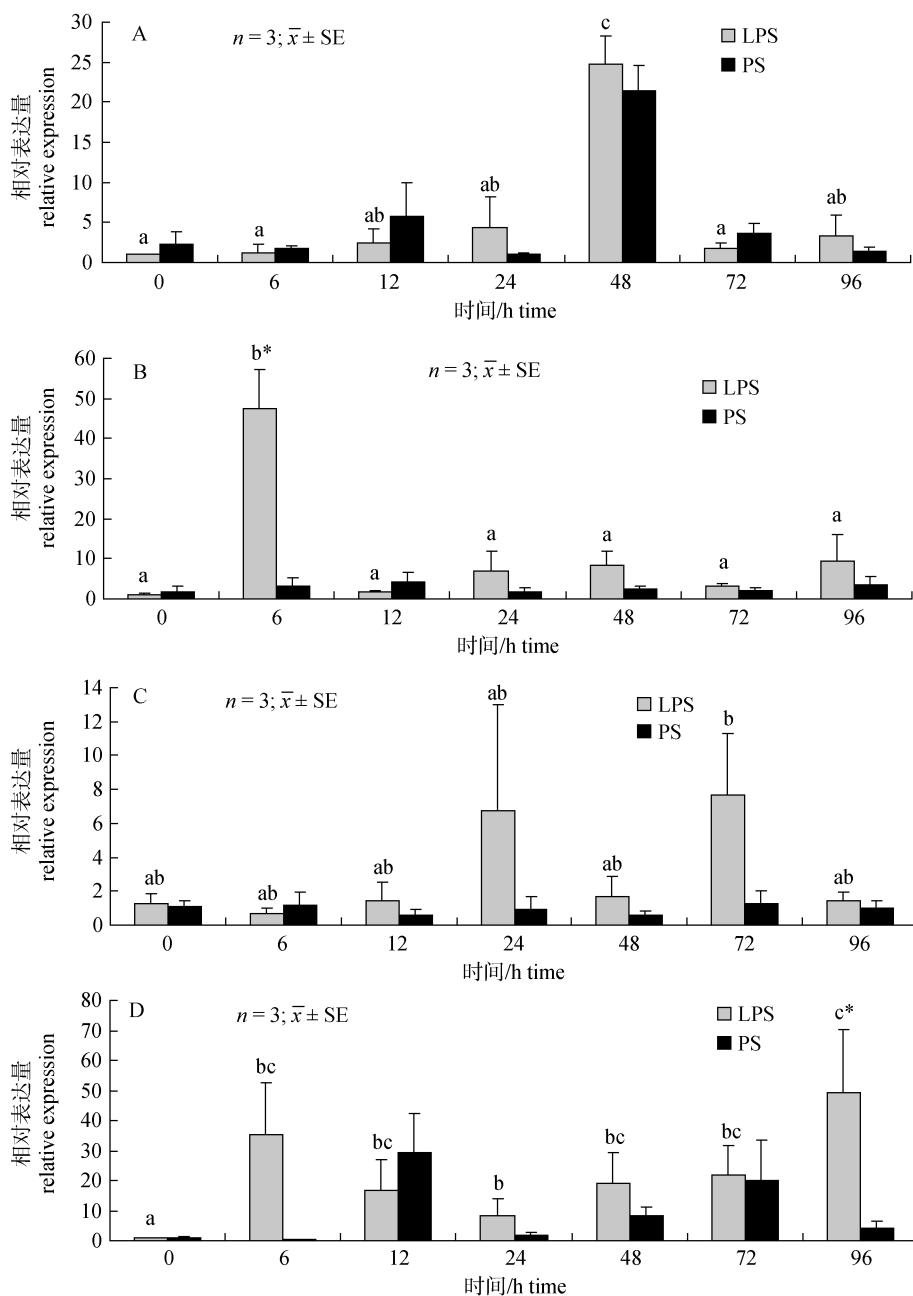


图 6 *CCR9* mRNA 在大菱鲆脾(A)、头肾(B)、肝(C)和血液(D)中表达量的 RT-PCR 分析

把 0 h 时的基因表达量作为基线设为 1。柱图上方不同字母表示不同时间点之间差异显著($P<0.05$)。*表示与对照组差异显著($P<0.05$)。LPS：脂多糖；PS：生理盐水。

Fig.6 The quantitative RT-PCR analysis of the expression level of *CCR9* mRNA in spleen (A), head kidney (B), liver (C) and blood (D) of *Scophthalmus maximus*

Expression level at 0 h was chosen as the cardinal, set as 1. Different letters above columns denotes significant difference between times ($P<0.05$). * denotes significant compared with control ($P<0.05$). LPS: lipopolysaccharide; PS: physiological saline.

CCR3 在注射 LPS 后头肾和血液中的表达水平与对照组的表达水平相当, 但是在脾和肝中存在着差异, 这也表明在脾和肝中 CCR3 对脂多糖的敏感程度高于其他两种组织。在免疫相关组织里, CCR3 和 CCR9 均对 LPS 有应答, 可以推断它们在大菱鲆中具有免疫功能。值得注意的是 CCR3(脾中诱导后 6 h)比 CCR9(脾中诱导后 48 h)提前达到表达高峰, 表明了在 LPS 诱导之后 CCR3 启动免疫应答早于 CCR9。与此相反, CCR9(头肾中诱导后 6 h)比 CCR3(头肾中诱导后 24 h)提前达到表达高峰, 表明了在 LPS 诱导之后 CCR9 启动免疫应答早于 CCR3。

3 讨论

趋化因子受体是一类介导趋化因子行使功能的 G 蛋白偶联的跨膜受体。本研究克隆了大菱鲆趋化因子受体基因 CCR3 和 CCR9。所有动物的趋化因子受体之间存在 25%~80% 的一致性, 一些其他的 G 蛋白偶联受体与趋化因子受体也存在大约 25% 的一致性。虽然趋化因子受体间缺少独特的结构特征, 但是它们之间仍然存在一些共性: 它们的氨基酸长度都在 340~370; 具有 1 段酸性 N-末端; 在第 2 个胞内环有 DRYLAIVHA 序列; 第 3 个胞内环较短; 在 4 个胞外环中都包含 1 个半胱氨酸。

本研究将这 2 种大菱鲆趋化因子受体和其他物种 CCR3 和 CCR9 受体做了系统进化分析, 通过这两个受体的氨基酸序列的比较得出的亲缘关系与这些物种的进化地位相符(图 3)。目前, 在斑马鱼中已鉴定出 3 种 CCR3 受体: CCR3-1、CCR3-2 和 CCR3-3^[23]。而进化树中显示出, 其他鱼类的 CCR3 和斑马鱼 CCR3-3 亲缘关系更近。在斑马鱼的半定量基因表达分析中, CCR3-1 和 CCR3-2 表现出了类似的表达模式: 在脾和肾中表达水平非常高, 在肠和肝中表达水平较高, 但是在各组织中未能检测到 CCR3-3 的表达^[23]。而在虹鳟的实时定量基因表达分析中, CCR3 在外周血淋巴细胞、头肾及脾中有高水平的表达, 在脑、性腺及胸腺中也有较高表达^[26]。可以看出斑马鱼

CCR3-1 和 CCR3-2 及虹鳟 CCR3 在各组织中的表达模式与本实验结果类似, 而斑马鱼 CCR3-3 则表现出了非常明显的差异, 这也与本研究系统进化树表现的亲缘关系不一致。在斑马鱼中, 发现了两种 CCR9 基因: CCR9a 和 CCR9b, 它们定位于不同的染色体上, 这也表明了 CCR9 存在基因扩增现象^[23]。最近, 在虹鳟中也发现存在两种 CCR9 基因: CCR9 和 CCR9B^[23,26], 这也恰好符合本研究系统进化树的结果: 鱼类 CCR9 基因聚为两个分支(图 3)。半定量表达分析表明, 斑马鱼 CCR9a 和 CCR9b 在脑、鳃、肝和肠中表达水平高^[23], 虹鳟 CCR9 在各组织中(血液、头肾、鳃、脾和肝)均有高水平表达^[24]。实时定量表达分析表明, 虹鳟 CCR9B 在胸腺和外周血淋巴细胞中表达水平高, 在鳃、脾、脑和小肠中表达水平较高^[26]。这些结果也与本实验实时定量表达分析结果有差异。

在大菱鲆中, 头肾和脾是 CCR3 和 CCR9 表达量相对较高的组织, 这也揭示了这两个基因在免疫中的功能。此外, CCR9 在鳃、皮肤和肠中也有很高的表达。而之前的报道也认为病原菌入侵鱼体的主要途径就是鳃、皮肤和肠, 这些黏膜免疫系统介导先天性免疫系统与后天性免疫系统对潜在病原的免疫应答, 同时调控免疫反应的强度^[44]。在斑马鱼和虹鳟中, CCR3 和 CCR9 基因的表达也存在类似的状况^[23,26]。而在高等脊椎动物中, CCR9 也能介导 T 细胞迁移到小肠^[14~16]。相对于对照组, 本研究检测到注射 LPS 后 CCR9 在肝中表达水平显著较高。在注射 LPS 后的脾和肝中 CCR3 的表达水平与对照组存在显著性差异。在海水养殖中, 革兰氏阴性菌在致病菌中比例非常高, 如弧菌属; LPS 则是革兰氏阴性菌的细胞壁成分, 能够引起宿主的免疫反应。可以看出, 在免疫相关组织里 CCR3 和 CCR9 均对 LPS 有应答, 可以推断它们在大菱鲆中具有免疫功能。而且, 实验结果也显示了 CCR3 和 CCR9 对 LPS 的应答有先后顺序, 可以推测, 它们在趋化因子信号通路中发挥不同的功能。由于目前发现的鱼类 CCR3 和 CCR9 基因种类较少, 并且相关的基因表达分析报道也很少, 加上基因表达分析方法的差异,

进行 CCR3 和 CCR9 系统的分析及功能鉴定还有较大难度。

总之, 本研究克隆并鉴定了大菱鲆两个趋化因子受体家族的重要成员 CCR3 和 CCR9, 对其表达模式的分析揭示出它们在大菱鲆免疫系统中发挥着重要的作用, 也为进一步研究大菱鲆 CCR3 和 CCR9 基因的功能奠定基础。

参考文献:

- [1] 赫崇波, 木云雷, 王志松, 等. 鱼类CC趋化因子基因及其系统进化分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 119–127.
- [2] 赫崇波, 王强, 刘卫东. 鱼类趋化因子基因的研究[J]. 中国水产科学, 2006, 25(7): 367–370.
- [3] 张如峰. 鱼类 CXC 型趋化因子受体研究进展[J]. 科技信息, 2012(4): 124.
- [4] Adler M W, Rogers T J. Are chemokines the third major system in the brain? [J]. *J Leuk Biol*, 2005, 78(6): 1204–1209.
- [5] Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors[J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18(1): 217–242.
- [6] Combadiere C, Ahuja S K, Murphy P M, et al. Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 16491–16494.
- [7] Daugherty B L, Siciliano S J, DeMartino J A, et al. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor[J]. *J Exp Med*, 1996, 183: 2349–2354.
- [8] Sallusto F, Mackay C R, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells[J]. *Science*, 1997, 277: 2005–2007.
- [9] Stellato C, Brummet M E, James R, et al. Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells[J]. *J Immunol*, 2001, 166: 1457–1461.
- [10] Ma W, Bryce P J, Humbles A A, et al. CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109: 621–628.
- [11] Erin E M, Williams T J, Barnes P J, et al. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease[J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2002, 1: 201–214.
- [12] Hu Y H, Chen L, Sun L, et al. CXCL8 of *Scophthalmus maximus*: Expression, biological activity and immunoregulatory effect[J]. *Dev Comp Immunol*, 2011, 35: 1030–1037.
- [13] Hosoe N, Miura S, Watanabe C, et al. Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte–endothelium interaction in inflamed and uninflamed intestinal mucosa[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286: G458–466.
- [14] Olaussen R W, Karlsson M R, Lundin K E, et al. Reduced chemokine receptor 9 on intraepithelial lymphocytes in celiac disease suggests persistent epithelial activation[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132: 2371–2382.
- [15] Papadakis K A, Prehn J, Moreno S T, et al. CCR9-positive lymphocytes and thymus-expressed chemokine distinguish small bowel from colonic Crohn's disease[J]. *Gastroenterology*, 2001, 121: 246–254.
- [16] Wurbel M A, Philippe J M, Nguyen C, et al. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9[J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30: 262–271.
- [17] Eksteen B, Grant A J, Miles A, et al. Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9+ gut-homing lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis[J]. *J Exp Med*, 2004, 200: 1511–1517.
- [18] Feng N, Jaimes M C, Lazarus N H, et al. Redundant role of chemokines CCL25/TECK and CCL28/MEC in IgA⁺ plasma cell recruitment to the intestinal lamina propria after rotavirus infection[J]. *J Immunol*, 2006, 176: 5749–5759.
- [19] Pabst O, Ohl L, Wendland M. Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine[J]. *J Exp Med*, 2004, 199: 411–416.
- [20] Wendland M, Czeloth N, Mach N, et al. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine[J]. *PNAS*, 2007, 104: 6347–6352.
- [21] Johnson E L, Singh R, Singh S, et al. CCL25-CCR9 interaction modulates ovarian cancer cell migration, metalloproteinase expression, and invasion[J]. *World J Surg Oncol*, 2010, 8: 62.
- [22] Nomiyama H, Hieshima K, Osada N, et al. Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: identification of a novel chemokine subfamily CX [J]. *BMC Genom*, 2008, 9: 222.
- [23] Liu Y, Chang M X, Wu S G, et al. Characterization of C-C chemokine receptor subfamily in teleost fish[J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(3): 498–504.
- [24] Daniels G D, Zou J, Charlemagne J, et al. Cloning of two chemokine receptor homologs (CXC-R4 and CC-R7) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *J Leukoc Biol*, 1999,

- 65: 684–690.
- [25] Zhang H, Thorgaard G H, Ristow S S. Molecular cloning and genomic structure of an interleukin-8 receptor-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 13: 251–258.
- [26] Dixon B, Luque A, Abós B, et al. Molecular characterization of three novel chemokine receptors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 34(2): 641–651.
- [27] Saha N R, Bei J X, Suetake H, et al. Description of a fugu CXC chemokine and two CXC receptor genes, and characterization of the effects of different stimulators on their expression [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 1324–1332.
- [28] Long Q, Quint E, Lin S, et al. The zebrafish scyba gene encodes a novel CXC-type chemokine with distinctive expression patterns in the vestibule acoustic system during embryo genesis [J]. Mech Dev, 2000, 97: 183–186.
- [29] Zakrzewska A, Cui C, Stockhammer O W, et al. Macrophage-specific gene functions in Spi1-directed innate immunity [J]. Blood, 2010, 116: e1–e11.
- [30] Park K C, Osborne J A, Montes A, et al. Immunological responses of turbot (*Psetta maxima*) to nodavirus infection or polyriboinosinic polyribocytidyl acid (pIC) stimulation, using expressed sequence tags (ESTs) analysis and cDNA microarrays [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26: 91–108.
- [31] 孟亮, 陈松林, 刘洋. 大菱鲆脾 cDNA 文库构建、EST 序列分析与免疫抗病相关基因的筛选 [J]. 水产学报, 2009, 5: 713–718.
- [32] Chen S L, Zhang Y X, Xu J Y, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein (Nramp) cDNA from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2007, 147: 29–37.
- [33] 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.
- [34] Zhang Y X, Chen S L. Molecular identification, polymorphism, and expression analysis of major histocompatibility complex class IIA and B genes of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Mar Biotechnol, 2006, 8: 611–623.
- [35] Liu Y, Chen S L, Meng L, et al. Cloning, characterization and expression analysis of a novel CXC chemokine from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 711–720.
- [36] 刘洋, 陈松林, 孟亮, 等. 大菱鲆 1 个 CXCL10 样趋化因子的克隆、鉴定与表达分析 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 554–562.
- [37] 刘洋, 陈松林, 孟亮, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)一种 CXC 趋化因子的克隆及其表达特征 [J]. 高技术通讯, 17(12): 1295–1300.
- [38] Chen S L, Liu Y, Dong XL, et al. Cloning, characterization, and expression analysis of a CC chemokine gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Fish Physiol Biochem, 2010, 36: 147–155.
- [39] Hu Y H, Chen L, Sun L, et al. CXCL8 of *Scophthalmus maximus*: Expression, biological activity and immunoregulatory effect [J]. Dev Comp Immunol, 2011, 35: 1030–1037.
- [40] Jia A R, Zhang X H. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of the CXCR4 gene from turbot: *Scophthalmus maximus* [J]. J Biomed Biotechnol, 2009: 767893.
- [41] Dayhoff M O, Schwartz R M, Orcutt B C, et al. A model of evolutionary change in proteins [M]//Dayhoff M O. Atlas of protein sequence and structure, vol. 5, Suppl. 3. Washington, DC: National Biomedical Research Foundation, 1978: 345–358.
- [42] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucl Acids Res, 1994, 22: 4673–4680.
- [43] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24: 1596–1599.
- [44] Baudin Laurencin F, Germon E. Experimental infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., by dipping in suspensions of *Vibrio anguillarum*: ways of bacterial penetration; influence of temperature and salinity [J]. Aquaculture, 1987, 67: 203–205.

Chemokine receptor genes *CCR3* and *CCR9* in turbot (*Scophthalmus maximus*): Cloning and tissue distribution

MENG Yanqing^{1,2}, LIU Xiaofei^{1,2}, LIU Yang^{1,2}, CHANG Yaqing^{1,2}, WANG Xiuli^{1,2}, JIANG Zhiqiang^{1,2}

1. Key Laboratory of North Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture; Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: Turbot is an important aquaculture species in the eastern North Atlantic and Mediterranean regions, China, and Korea. Research on the molecular mechanisms of the turbot immune system could contribute to improving the economic performance of turbot aquaculture. In this study, we cloned and characterized the full-length cDNA of *CCR3* and *CCR9* in turbot (*Scophthalmus maximus*). The full-length cDNAs were obtained by the 5' and 3'-RACE method. The *CCR9* cDNA was 1 441 bp in length, consisting of a 59 bp 5' UTR, a 278 bp 3' UTR, and a 1 104 bp ORF encoding a 367 amino acid polypeptide. The *CCR3* cDNA was 1 451 bp in length and contained a 92 bp 5' UTR, a 267 bp 3' UTR, and a 1 083 bp ORF encoding 360 amino acids. The TMHMM (TransMembrane prediction using Hidden Markov Models) analysis confirmed that they were seven-transmembrane-spanning proteins. A phylogenetic tree based on the amino acid sequences was constructed by the neighbor-joining (NJ) method using Mega4. The results of phylogenetic analysis revealed that turbot *CCR3* and *CCR9* were more similar to the cDNAs of other teleosts than to each other. The relationships exhibited in the tree are consistent with their evolutionary relationships. The *CCR9* and *CCR3* mRNA expression levels in various tissues was measured by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Both gene transcripts were expressed in all of the tissues analyzed, with the highest expression being in the spleen, head kidney, and heart. The lipopolysaccharide (LPS) challenge results suggest that *CCR9* expression in liver was more sensitive than in the other three tissues, while *CCR3* expression in spleen and liver was more sensitive than in head kidney or blood. *CCR3* and *CCR9* expression levels were both high in immune-related tissues and after induction by LPS. Our results indicate that both genes play a role in the turbot immune system. This work further elucidates the functions of these genes in immune responses, which will help to better understand the important relationship between fish disease resistance and innate immunity.

Key words: *Scophthalmus maximus*; chemokine receptor; CCK3; *CCR9*; clone; expression

Corresponding author: LIU Yang. E-mail: liuy78@foxmail.com