

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19056

牙鲆趋化因子基因 *CXCL9* 的克隆、鉴定与表达分析

张永珍^{1, 2, 3}, 陈松林^{1, 2}, 王磊^{1, 2}

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部农村海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 趋化因子是一类具有化学趋化功能的小分子分泌性蛋白, 能够引导白细胞到损伤或者感染的部位, 参与免疫调节和病理反应。为丰富鲆鲽鱼类趋化因子的相关基础研究, 本研究克隆了牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)趋化因子基因 *CXCL9*, 其全长为 910 bp, 开放阅读框为 408 bp, 编码 135 个氨基酸。该基因具有趋化因子超家族的典型特征, 在 35、37、60 和 77 个氨基酸位置具有 4 个保守的半胱氨酸残基, 形成两个二硫键。氨基酸序列分析表明, 该基因与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)的 *CXCL9* 基因具有较高的同源性, 分别为 78.5% 和 71.0%。实时荧光定量 PCR 结果显示, *CXCL9* 在正常牙鲆肝脏和脾脏中的表达量非常高, 在皮肤和鳃等组织中表达量次之, 说明 *CXCL9* 特异性地在免疫相关组织中表达。经迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)感染后, 牙鲆肝脏中 *CXCL9* mRNA 表达量在感染后 6 h 即出现高峰值, 而头肾和脾脏中的高峰值出现较晚。经鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后 6 h, 牙鲆肝脏中 *CXCL9* mRNA 的表达量升高近 8 倍, 头肾中的表达高峰值出现在感染后 24 h, 而脾脏中 *CXCL9* mRNA 的表达量在感染后 6 h 迅速升高 10 倍, 逐渐降低后 48 h 又出现高峰, 为正常水平的 20 倍。上述研究结果说明 *CXCL9* 基因在病原菌感染过程中有快速响应, 可能参与了免疫防御过程, 将有可能发展为一种牙鲆细菌性疾病的生物标记。本研究为牙鲆趋化因子超家族免疫机制的深入研究奠定了基础。

关键词: 牙鲆; *CXCL9*; 趋化因子; 细菌感染; 基因表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)01-0035-09

趋化因子是一类小分子分泌性蛋白(8~14 kD), 它首先被发现作用于白细胞转移和其他细胞过程^[1]。趋化因子家族大都具有保守的半胱氨酸序列, 基于前两个半胱氨酸排列的不同, 趋化因子分为 CC 型、CXC 型、CX₃C 型和 C 型等^[2]。1990 年, Farber^[3]从 IFN- γ 刺激的小鼠巨噬细胞系中获得一种新型的小分子, 命名为 IFN- γ 诱导的单核因子(monokine induced by IFN- γ , Mig)。随后这种小分子被证实为一种趋化因子, 命名为 *CXCL9*。*CXCL9* 与趋化因子受体 CXCR3 结合, 不仅作用于 T 细胞向外

周炎症部位的募集, 也可以增强淋巴器官内活化的 T 细胞、B 细胞、树突细胞的相互作用, 从而调节机体对病原的抵抗反应^[4]。最新研究发现 *CXCL9* 是一个重要的生物标记, 在慢性 Q 热、多种恶性肿瘤以及多种炎症疾病的鉴定中发挥作用^[5-7]。血清和尿液中 *CXCL9* 的水平与器官移植风险密切相关^[8-9], 因此对 *CXCL9* 基因功能的探究成为研究热点。

鱼类趋化因子的信息不仅对比较分子免疫学研究十分重要, 而且能够更好地认识主要养殖经济品种的流行性疾病发生的分子免疫学基础^[10]。

收稿日期: 2019-06-10; 修订日期: 2019-07-08。

基金项目: 山东省自然科学基金重点项目(ZR2016QZ003); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31802332); 山东省泰山学者攀登计划专项; 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022018026)。

作者简介: 张永珍(1989-), 女, 硕士研究生. E-mail: 925336232@qq.com

通信作者: 王磊, 助理研究员, 从事鱼类功能基因和遗传育种研究. E-mail: leileiwang@ysfri.ac.cn

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是一种重要的海产鱼类,具有较高的营养价值和经济价值,被广泛养殖于中国、韩国和日本等亚洲国家。近年来随着牙鲆高密度工厂化养殖的不断发展和养殖环境的恶化,各种疾病也频繁暴发,对牙鲆养殖业造成了巨大的经济损失。危害牙鲆的主要病害有细菌病和病毒性疾病,如鳃弧菌病、爱德华氏菌综合征、淋巴囊肿病等。虽然采用抗生素等传统药物治疗取得了一定的效果,但细菌耐药性的增强以及药物在鱼体内的残留对消费者的健康造成了潜在的威胁。因此挖掘鱼体抗病关键基因,揭示其作用机制,对牙鲆抗病品系培育及鱼类养殖业的健康、可持续发展具有重要的意义。牙鲆中仅见关于 CXCL8 和 CXCL13 的报道,对于其他 CXCL 型趋化因子的研究十分缺乏^[11-12]。

本研究克隆了牙鲆 CXCL9 基因的 cDNA 序列全长,预测该基因的蛋白结构,构建了系统进化树及多重比对序列来分析 CXCL9 在其他物种中的同源性保守性,研究了 CXCL9 基因在健康牙鲆中的表达模式,以及鳃弧菌或迟缓爱德华氏菌感染后的表达量变化,为进一步研究牙鲆 CXCL9 的抗病免疫机制奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的健康牙鲆(体重 280~370 g, 体长 27~32 cm)由本课题组成员在山东省海阳市黄海水产有限公司繁育培养。每 5 条鱼饲养在 72 L 的充气方形箱子中,水温(22±1)℃,每天换水 1~2 次,每次换水量为原水量的 1/3,在实验室暂养 1 周以消除环境胁迫。

1.2 组织样本采集

随机选取 5 尾健康牙鲆,使用 100 mg/L 的 MS-222 麻醉后分别取其肝、脾、肾、头肾、胃、肠、皮肤、肌肉、鳃、心、脑和血等组织。分别放入冻存管,立即投入液氮暂存,随后转移到 -80℃ 冰箱,用于 RNA 的提取。

对牙鲆分别进行鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)或迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)感染,感染方法同 Wang 等^[13]。取感染后 0 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 这 5 个时间点牙鲆各 5 尾,麻醉后解剖,取肝脏、头肾和脾脏,分别放入冻存管中,立即投入液氮暂存,随后转移到 -80℃,用于 RNA 的提取。动物实验操作按照中国水产科学研究院黄海水产研究所动物伦理委员会要求进行(黄水研〔2019〕33 号文)。

1.3 RNA 提取与 cDNA 合成

使用 Trizol 试剂法提取牙鲆各组织的总 RNA,用分光光度计测定其浓度,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳测定其质量。使用 TaKaRa 反转录试剂盒(PrimeScriptRT reagent kit with gDNA Eraser, 宝生物工程(中国)有限公司)合成 cDNA。合成 cDNA 时 RNA 模板的统一加入量为 1000 ng,合成的 cDNA 保存于 -20℃ 备用。

1.4 CXCL9 基因的克隆

基于相似物种转录本信息序列合成引物 CXCL9-F1/CXCL9-R1(表 1)。以牙鲆的肝脏 cDNA 作为模板,经 PCR 扩增、克隆、测序进行序列验证,根据验证正确的基因片段设计 RACE 引物 CXCL9-RACE-5NGSP/5GSP 和 CXCL9-RACE-3NGSP/3GSP 分别进行 5' 和 3' 端 RACE 扩增(RACE 反应按照 SmarterTM RACE cDNA Amplification Kit

表 1 CXCL9 基因克隆和荧光定量 PCR 所用的引物序列
Tab. 1 Primers used for the cloning and real time RT-PCR expression of CXCL9 gene in the study

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 application
CXCL9-F1	CAACACGGTCACAGTCATA	中间序列验证
CXCL9-R1	GCTTGAAGATGAGGCTCTC	middle sequence confirm
CXCL9-RACE-5NGSP	CAACACGGTCACAGTCATA	5'-UTR 扩增
CXCL9-RACE-5GSP	GTCTGAATCCAGAGGCAC	5'-UTR amplification
CXCL9-RACE-3GSP	CATGCGCTTCCTGCCTCG	3'-UTR 扩增
CXCL9-RACE-3NGSP	GCTTGAAGATGAGGCTCTC	3'-UTR amplification
CXCL9-RT-F	CAACACGGTCACAGTCATA	反转录-荧光定量 PCR
CXCL9-RT-R	GCTTGAAGATGAGGCTCTC	RT-qPCR
actin-RT-F	CACTGCTGCCTCCTCTCCT	反转录-荧光定量 PCR
actin-RT-R	TCTGGACAACGGAACCTCTC	RT-qPCR

(Clontech)进行), PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离切胶, 然后进行胶回收, 连接至 pEASY-T1 载体, 转化大肠杆菌感受态细胞, 筛选单克隆菌液送至华大基因进行测序验证。

1.5 序列和进化分析

利用生物学软件 DNASTAR 6.0 对测序得到的序列进行拼接、开放阅读框搜索及蛋白序列翻译。用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析其蛋白序列的信号肽。利用 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>

[cdd/wrpsb.cgi](http://cdd.wrpsb.cgi)) 和 SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析蛋白二级结构和保守结构域。利用 NCBI 数据库的 BLAST 软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)搜索相似氨基酸序列, 如表 2 所示。

利用 ESPript 3.0 网站(<http://esprict.ibcp.fr/ES-Pript/cgi-bin/ESPrict.cgi>) 进行氨基酸序列的多重比对。利用 MEGA7.0 软件以邻位相接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树, 设置 1000 次 Bootstraps 进行系统进化评估。

表 2 不同物种 *CXCL9* 及相似氨基酸信息
Tab. 2 Similar amino acid sequences information of *CXCL9* from different species

物种 species	基因名 gene name	蛋白序列号 protein ID	氨基酸数目 amino acid number
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>CXCL9</i>	AMS37706.1	135
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>CXCL8</i> (interleukin-8)	BAN04718	96
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>CXCL13</i>	XP_019959758	147
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>CXCL14</i>	XP_019941832	99
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>CXCL19</i>	XP_019961822	108
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	<i>CXCL9</i>	ACD62783.1	137
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	<i>CXCL9</i>	ALI94170.1	140
半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	<i>CXCL9</i>	XP_016893001.1	137
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	<i>CXCL10</i>	AAQ01585.1	95
裸盖鱼 <i>Anoplopoma fimbria</i>	<i>CXCL10</i>	ACQ59055.1	133
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	<i>CXCL9</i>	AIT82993.1	138
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	<i>CXCL9</i>	XP_018952979.1	122
鲫 <i>Carassius auratus</i>	<i>CXCL9</i>	XP_026135123.1	110
南亚野鲮 <i>Labeo rohita</i>	<i>CXCL9</i>	RXN21752.1	124
人 <i>Homo sapiens</i>	<i>CXCL9</i>	CAA51284.1	125
大猩猩 <i>Gorilla gorilla gorilla</i>	<i>CXCL9</i>	XP_004038896	125
小鼠 <i>Mus musculus</i>	<i>CXCL9</i>	CAJ18402.1	126

1.6 实时荧光相对定量 PCR

根据验证的 cDNA 序列设计定量引物 *CXCL9*-RT-F/R(表 1), 以 β -actin 为内参(表 1), 用 ABI 7500 Fast Real-time PCR System 进行实时荧光相对定量检测。RNA 的准备, cDNA 的合成如 1.3 所述。实验所用试剂盒为 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa), PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 1 μ L cDNA 模板, 10 μ L SYBR Premix Ex Taq, 0.4 μ L ROX Reference DyeII, 上下游引物各 0.4 μ L, 补加 7.8 μ L ddH₂O, PCR 反应程序依据 TaKaRa 定量试剂盒说明书进行。每个试验样品和内参分别

设置 3 个生物学重复, 采用 CT 值法分析数据, 用 SPSS17.0 软件进行 one-way ANOVA 法检验数据间差异性的显著程度, 当 $P<0.05$ 时认为差异显著。采用 Origin 8.0 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 牙鲆 *CXCL9* 基因的克隆

获得的牙鲆 *CXCL9* 基因 cDNA 全长为 910 bp, 包括 56 bp 的 5'非编码区(untranslated region, UTR), 408 bp 的开放阅读框(open reading fragment, ORF), 编码 135 个氨基酸残基, 蛋白分子量为

15.4 kD, 446 bp 的 3'UTR 其中发现 1 个 AATAAA 加尾信号。

CXCL9 氨基酸序列中前 28 个氨基酸为信号肽, 信号肽与推测的成熟肽的预测切割位点在 28 位的甘氨酸与 29 位的苏氨酸之间。保守蛋白结构域分析 CXCL9 蛋白属于趋化因子超家族, 32~92 位具有 SCY 结构域(图 1)。NCBI GenBank 中牙鲈 CXCL9 基因序列登录号为: KU821020.1, 蛋白序列登录号为 AMS37706.1。

2.2 牙鲈 CXCL9 基因的序列比对及同源性分析

将牙鲈 CXCL9 蛋白序列进行 BLASTP 比对分析, 发现牙鲈 CXCL9 与其他鱼类的 CXCL9、CXCL10、CXCL11 均有一定程度的相似性, 说明

鱼类 CXCL 基因家族的保守性很高。牙鲈 CXCL9 与大菱鲈 CXCL9、半滑舌鳎 CXCL9 同源性最高, 分别为 78.5%和 71.0%。多重序列比对显示, SCY 区比较保守, 在氨基酸序列 35、37、60 和 77 的位置包含 4 个保守的半胱氨酸残基(图 2)。牙鲈 CXCL19 的 37 位不是半胱氨酸, 可能是因为预测序列翻译错误。采用 MEGA 7.0 软件以 NJ 法构建氨基酸序列系统进化树。结果显示, 牙鲈 CXCL9 与其他海水鱼类聚为一个分支, 3 种淡水鱼的 CXCL9 聚为一个分支, 而哺乳动物聚为另一支。斑点叉尾鲷的 CXCL10 与牙鲈的 CXCL8、CXCL13 和 CXCL14 同源性相近, 然而牙鲈的 CXCL19 与其他 CXCL 的同源关系较远(图 3)。

```

1 GCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGAGAGTCAACGCTCAGCTTGCCTCCAATATGCAGCTTTACCCCAAGT
1 M Q L Y P Q
76 CAGTGTGTCGGCTCGCCTTCCTGAGCCTCTGCTGTGTGCTGATCACAGTGAATGAGTCAGAGGGCACGTTTGTCC
6 S V C R L A F L S L C C V L I T V N E S E G T F V
151 CAGGACGATGCTTGTGTCCGCAATCGCAGTCAAGAATCAGAGGGCACCTGAAAGAGCTCACAGTCTACCACAAAA
32 P G R C L C P Q S Q S R I R G H L K E L T V Y H K
226 GCCCCAGCTGCAACACGGTCACAGTCATAGTGACTCTGAAGAGAAAAATAAGAACTCGTGTGTCTGAATCCAGAGG
57 S P S C N T V T V I V T L K R N N E L V C L N P E
301 CACCGCTGGGCAACAGCTCATCCACTGCTGGAACAGAGCTCATAAGTTGGGCCATGATGTGAAACTCTGCCTGA
82 A P L G K Q L I H C W N R A H K L G H D V K L C L
376 AGAGGAGGAGAGGCCGAGGCAGGAAGCGCATGCGCTCTCGACAGAGGAGCCAGGGTCAAAACATGAGAGCCTCAT
107 K R R R G R G R K R M R S R Q R S Q G Q N M R A S
451 CTTCAAGCTCCTAATGGTCGACCGCCACCTTCAACAAAGCTACAGCACGGAGAGTAGTGTGAACATACAGACTG
132 S S S S *
526 TTGCCAACCTGCAGGTGTTTAACTCCAGGCCACCACTGACAATGATTTTCTGTCCACAGCTCAGACATCATGAT
601 CCCCTGAATTTCCATCTGGGTAGCAAAGCAAACCTTTTTATGCCAGCAGCAGGGGGGTTTATTTATGCAACTCA
676 CTGATATAATTGAAAGCTATACAAGCCCTGGAGGTTTGTCAACAGGTAAACATTTAAGCTTTTATAACCCGATC
751 AACTATATTGTAATGTGTAGTTCTGTGTAGGCAGCTGGAAAAGGTAACATGAACATGTTGTGGGTATTTCATTGT
826 TTATGTAAATATGGACTTTTTTTAAGCACTTTTTTTAAAAATAAACCTATCTGAACAAAAA
901 AAAAAAAAAA

```

图 1 牙鲈 CXCL9 基因 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

方框内为翻译起始位点 ATG, 终止密码子用星号表示, 阴影区域为编码区, 两个箭头指示为 SCY 结构域, 信号肽序列用单下划线标出, 加尾信号(AATAAA)用双下划线表示。

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of CXCL9 in *Paralichthys olivaceus*. The start codon (ATG) is boxed and the stop codon is signed with asterisk. The encoding sequence is highlighted in gray and the two opposite arrows indicate a SCY domain.

Signal peptide is underlined with line; polyadenylation signal (AATAAA) is underlined with double lines.

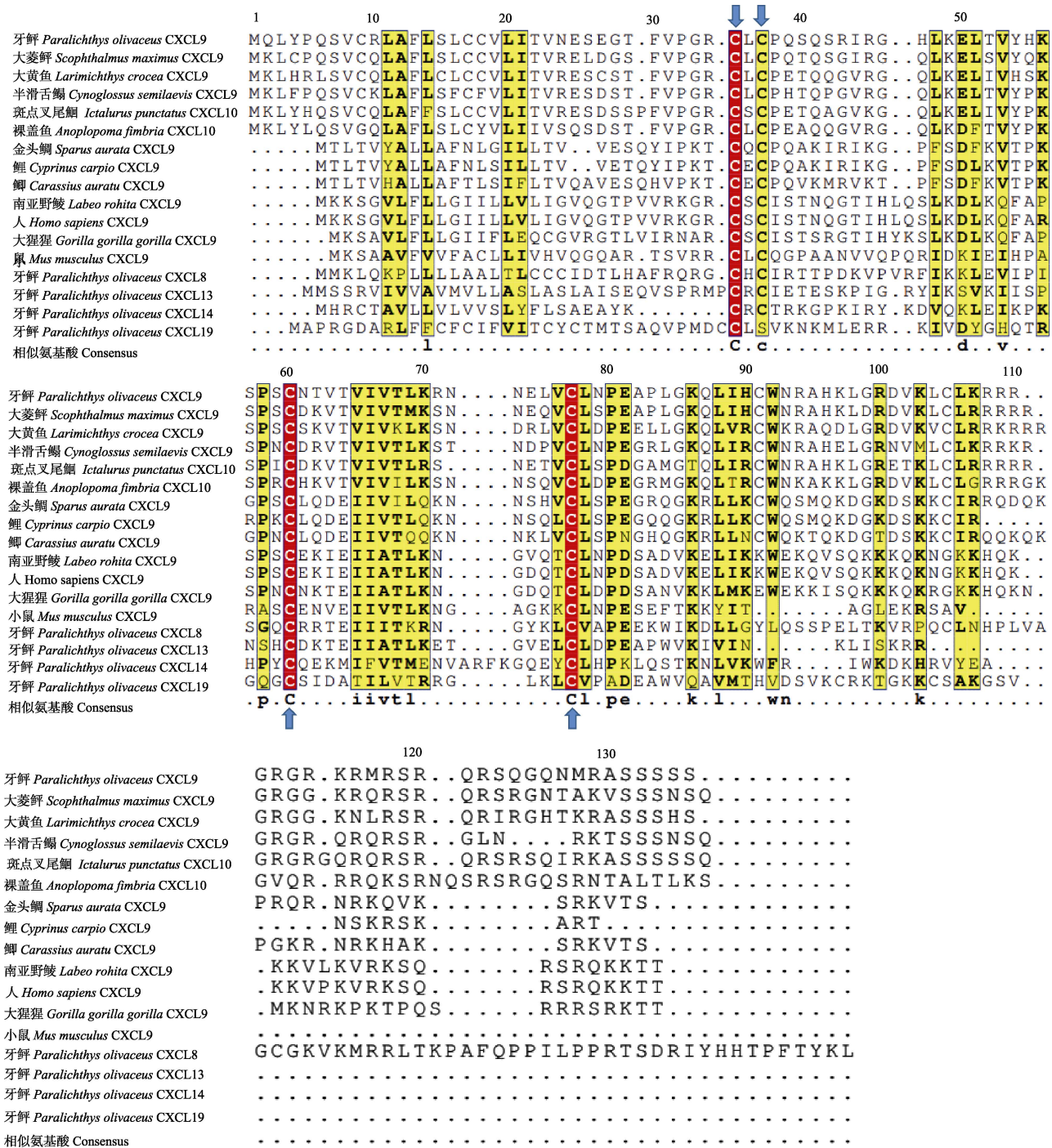


图 2 牙鲆 CXCL9 氨基酸序列与其他物种同源序列的比对
箭头表示保守的半胱氨酸残基。

Fig. 2 Alignment of deduced amino acid sequence of *Paralicthys olivaceus* CXCL9 with other homologous proteins
Arrows indicate the four conservative cysteines residues.

2.3 实时荧光定量 PCR 检测结果

对 *CXCL9* 基因在健康牙鲆各组织(肝、脾、肾、头肾、胃、肠、皮肤、肌肉、鳃、心脏、脑、血)中的表达进行检测(图 4), 结果显示, *CXCL9* 基因在

牙鲆各组织中的表达量差异较大。在肝脏和脾脏中的表达量最高且显著高于其他各组织($P<0.05$), 在皮肤和鳃中有较高的表达量, 在肾脏、肠道等组织中的表达量比较低, 在肌肉、脑和血液中微量表达。

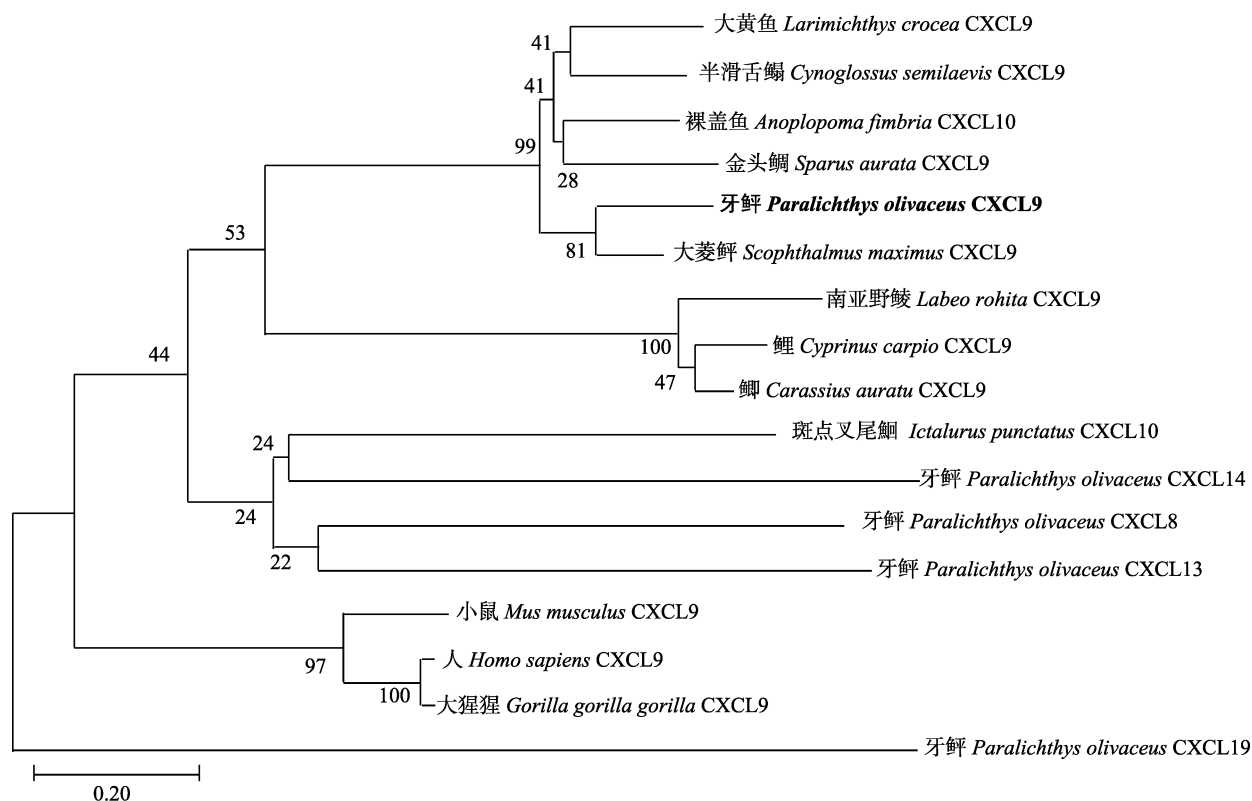


图 3 以 NJ 法构建的牙鲆与其他物种 CXCL9 同源基因的系统进化树

利用 Bootstrap 法进行 1000 次评估。

Fig. 3 The phylogenetic tree based on Neighbor-Joining (NJ) method of CXCL9 proteins from *Paralichthys olivaceus* and other species
The parameter was evaluated 1000 degree via method of Bootstrap.

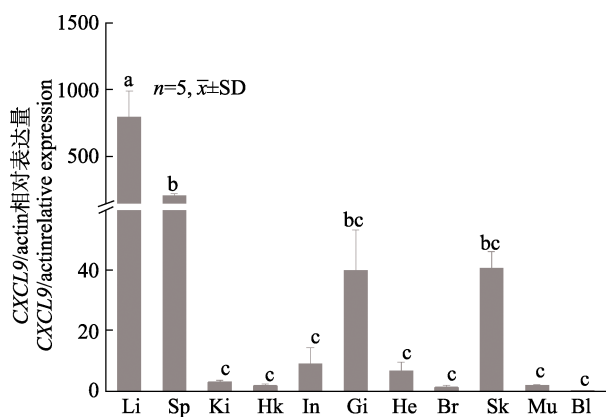


图 4 CXCL9 基因在牙鲆健康组织中的表达

字母表示 CXCL9 基因在不同组织表达量显著性差异. Li: 肝脏; Sp: 脾脏; Ki: 肾脏; Hk: 头肾; In: 肠; Gi: 鳃; He: 心脏; Br: 脑; Sk: 皮肤; Mu: 肌肉; BL: 血液.

Fig. 4 The expression pattern of CXCL9 gene in healthy tissues of *Paralichthys olivaceus*

Letters represent the significant difference of the CXCL9 gene expression among these tissues. Li: liver; Sp: spleen; Ki: kidney; Hk: head kidney; In: intestine; Gi: gill; He: heart; Br: brain; Sk: skin; Mu: muscle; BL: blood.

对牙鲆分别感染鳃弧菌或迟缓爱德华氏菌, 取不同感染时间点的肝脏、脾脏和头肾, 检测 CXCL9 基因的表达量。结果显示, 经迟缓爱德华氏菌感染后, 肝脏中 CXCL9 基因 mRNA 的表达量迅速升高, 在 6 h 出现了高峰值; 在脾脏和头肾中 CXCL9 基因 mRNA 表达量的高峰值出现在 48 h (图 5)。经鳃弧菌感染后, 牙鲆重要免疫组织中 CXCL9 基因 mRNA 水平出现一定的波动, 其中在脾脏中 CXCL9 基因 mRNA 水平在 6 h 迅速升高, 随后降低, 在 48 h 又出现新的高峰。在肝脏和头肾中 CXCL9 基因 mRNA 的表达量的高峰值分别出现在 6 h 和 24 h (图 6)。两组感染实验均说明肝脏中 CXCL9 基因对细菌感染的响应速度最快, 细菌感染后 6 h CXCL9 基因 mRNA 的表达量升高 7~8 倍(图 5A 和图 6A)。脾脏中 CXCL9 基因对细菌的响应能力最强, 鳃弧菌感染 6 h 和 48 h, CXCL9 基因 mRNA 的表达量升高 10 倍和 20 倍(图 6C)。

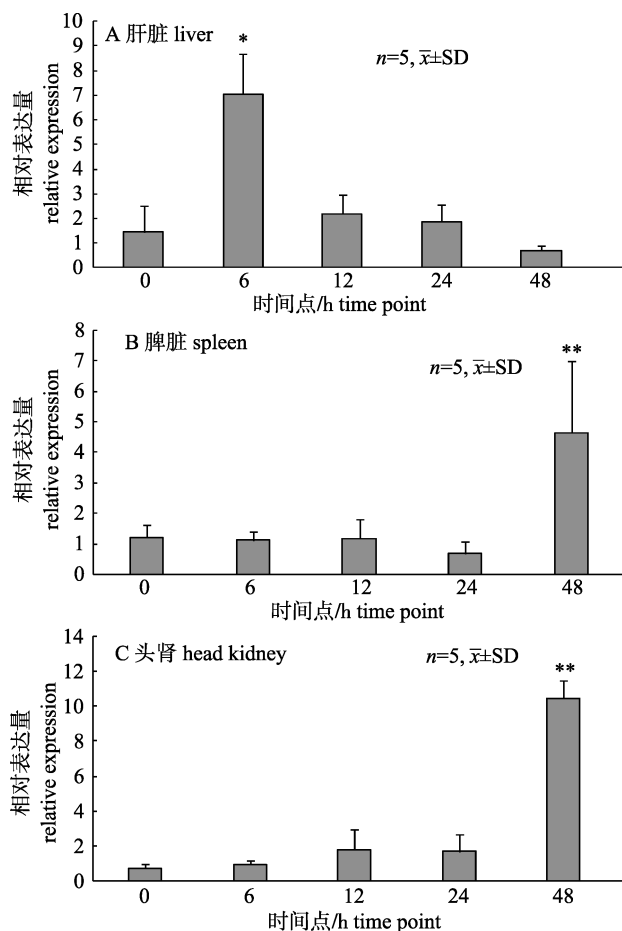


图 5 *CXCL9* 基因 mRNA 在迟缓爱德华氏菌感染牙鲆 3 种免疫组织的表达

星号表示 *CXCL9* 基因 mRNA 的表达量显著性高于 0 h (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Fig. 5 The expression pattern of *CXCL9* gene in three immune-related tissues of *Paralichthys olivaceus* under *Edwa tarda* infection

Asterisks represent the significant difference of the *CXCL9* gene expression among these time points, with Duncan test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

3 讨论

牙鲆 CXC 型趋化因子是免疫系统中很重要的调控因子,能够募集、激活和黏附各种类型的白细胞因子到炎症部位^[11]。通过研究,本研究克隆鉴定了牙鲆 *CXCL9* 基因,该基因的全长为 910 bp,开放阅读框 408 bp,编码 135 个氨基酸残基,蛋白分子量为 15.4 kD。在蛋白序列 35、37、60 和 77 个氨基酸的位置有 4 个保守的半胱氨酸残基,对蛋白质的三级结构和功能具有重要的作用。在其 N 端有 28 个氨基酸的信号肽,说明牙鲆 *CXCL9* 也是一种分泌型多肽。通过序列比对,发

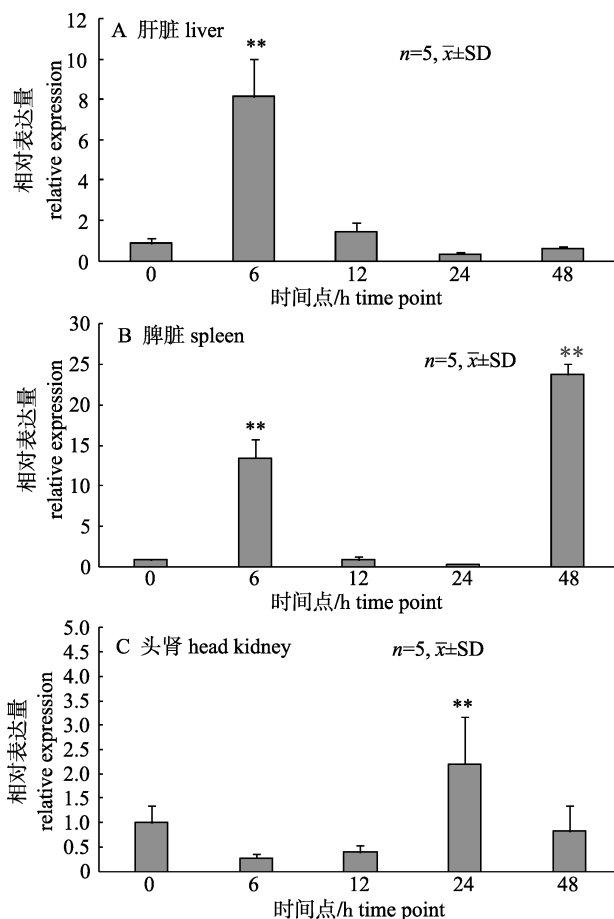


图 6 *CXCL9* 基因 mRNA 在鳎弧菌感染牙鲆 3 种免疫组织中的表达

星号表示 *CXCL9* 基因 mRNA 的表达量显著性高于 0 h (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Fig. 6 The expression pattern of *CXCL9* mRNA in three immune-related tissues of Japanese flounder under *Vrio anguillarum* infection

Asterisks represent the significant difference of the *CXCL9* mRNA expression among these time points, with Duncan test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

现牙鲆 *CXCL9* 基因与大菱鲆、半滑舌鳎 *CXCL9* 基因具有较高的同源性,说明鲆鲽鳎类 CXC 型基因具有相近的功能。氨基酸序列系统进化结果显示,牙鲆 *CXCL9* 基因与金头鲷、大黄鱼等其他海水鱼类 *CXCL9* 聚为一支,鲤和鲫等 3 种淡水鱼类聚为一支,而小鼠和人等哺乳动物单独聚为一支。本文还对其他几种牙鲆的 CXC 型趋化因子进行了统计和同源性分析,发现牙鲆 *CXCL8*、*CXCL13* 和 *CXCL14* 的同源性较近,与斑点叉尾鲷的 *CXCL10* 聚为一个分支,然而牙鲆 *CXCL19* 与上述趋化因子的同源性较远。大量的基因组分

析结果表明,趋化因子的变化速度比其他免疫基因的速度快很多,是针对各种传染性疾病变化最快速的八大蛋白之一^[14-15]。因此本研究丰富了对鱼类趋化因子的认识,具有一定的研究意义。

基于趋化因子功能的不同,将其分为两类:组成型和诱导型,其中组成型趋化因子调控骨髓和淋巴结中的造血作用和免疫监视过程中白细胞的转移,而诱导型趋化因子主要控制在侵扰和炎症反应中的白细胞的转移^[16]。鱼类 CXC 型趋化因子的研究也具有组成型和诱导型两种,例如斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)中的 CXCL12a 和 CXCL12b 是组成型表达^[17],而虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中发现的 CXCL8(interleukin-8)在炎症及病原菌的刺激下,能够在体内大量表达,属于诱导型表达^[18]。牙鲆 CXCL8 在 LPS 刺激的牙鲆头肾和脾脏中表达, CXCL13 也是在 LPS 刺激的免疫相关组织中特异表达,两者均为诱导型表达^[11-12]。在本研究中, CXCL9 基因在健康牙鲆免疫组织肝脏和脾脏中的表达量最高,在鳃和皮肤等免疫组织中有较高的表达量,与 CXCL13、CXCL8 具有一定的相似性,说明这 3 种 CXC 型趋化因子均为诱导型趋化因子。经细菌感染后,牙鲆肝脏、脾脏和头肾中 CXCL9 mRNA 的表达量有不同程度的升高,在肝脏中的响应时间最快,在脾脏中的响应能力最强,说明 CXCL9 基因参与了牙鲆抵抗病原菌的过程,在免疫组织中发挥了重要的作用。

趋化因子 mRNA 的表达模式能够很好地反映免疫反应机制和抗病机理,有潜力发展为多种疾病的生物标记。研究表明, CXCL9 基因在创伤感染、病毒感染等多种疾病中高表达,其诱导大量非特异性炎症细胞到达炎症部位,从而在 Th1 型免疫反应中发挥重要作用^[19]。这种表达模式与 CXCL8、CXCL13 存在一定的差异。Lee 等研究发现 CXCL8 在 LPS 刺激的牙鲆头肾、脾脏和淋巴细胞中表达水平较高,但是在肝脏中未检出^[12]; Kim 等^[11]报道牙鲆 CXCL13 的表达水平在 LPS 刺激后 3 h 和 6 h 的淋巴细胞中有明显的升高,但是在 polyI:C 刺激后没有变化,说明 CXCL13 有可能仅对细菌感染有响应,对病毒感染没有响应。本研究中迟缓爱德华氏菌刺激后 CXCL9 在脾脏中

呈现先升高、下降、再升高的趋势,说明在感染初期脾脏快速分泌 CXCL9,抵御细菌的侵袭,随后募集大量炎症细胞到达脾脏, CXCL9 的表达量升高了 20 倍。因此, CXCL9 也具有作为牙鲆炎症疾病标记的潜能。

综上所述,本文克隆得到了牙鲆 CXCL9 基因 cDNA 序列全长,其蛋白结构具有 CXC 趋化因子超家族的特性。表达模式分析显示, CXCL9 基因在牙鲆的抗细菌病免疫过程中具有重要作用,其在抗病毒病方面的具体功能与机制还需要更进一步的研究。

参考文献:

- [1] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity[J]. *Immunity*, 2000, 12(2): 121-127.
- [2] Moser B, Wolf M, Walz A, et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control[J]. *Trends in Immunology*, 2004, 25(2): 75-84.
- [3] Farber J M. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(14): 5238-5242.
- [4] Park M K, Amichay D, Love P, et al. The CXC chemokine murine monokine induced by IFN- γ (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen *in vivo*[J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 169(3): 1433-1443.
- [5] Jansen A F M, Schoffelen T, Textoris J, et al. CXCL9, a promising biomarker in the diagnosis of chronic Q fever[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2017, 17: 556.
- [6] Bolomsky A, Schreder M, Hübl W, et al. Monokine induced by interferon gamma (MIG/CXCL9) is an independent prognostic factor in newly diagnosed myeloma[J]. *Leukemia & Lymphoma*, 2016, 57(11): 2516-2525.
- [7] Wu Z Q, Huang X Y, Han X D, et al. The chemokine CXCL9 expression is associated with better prognosis for colorectal carcinoma patients[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 78: 8-13.
- [8] Brouard S, Soulillou J P. Pre-transplant serum level of CXCL9 as a biomarker of acute rejection and graft failure risk in kidney transplantation[J]. *Transplant International*, 2010, 23(5): 461-462.
- [9] Rabant M, Amrouche L, Morin L, et al. Early low urinary CXCL9 and CXCL10 might predict immunological quiescence in clinically and histologically stable kidney recipients[J]. *American Journal of Transplantation*, 2016, 16(6): 1868-1881.
- [10] He C B, Wang Q, Liu W D, et al. Study of chemokine genes in fish[J]. *Fisheries Science*, 2006, 25(7): 367-370. [赫崇波,

- 王强, 刘卫东, 等. 鱼类趋化因子基因的研究[J]. 水产科学, 2006, 25(7): 367-370.]
- [11] Kim H J, Yasuike M, Kondo H, et al. Molecular characterization and gene expression of a CXC chemokine gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(6): 1275-1284.
- [12] 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(1-2): 237-243.
- [13] Wang L, Zhang Y Z, Xu W T, et al. Molecular cloning, structure and expressional profiles of two novel single-exon genes (PoCCR6A and PoCCR6B) in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 52: 179-188.
- [14] Peatman E, Liu Z J. Evolution of CC chemokines in teleost fish: A case study in gene duplication and implications for immune diversity[J]. Immunogenetics, 2007, 59(8): 613-623.
- [15] Waterston R H, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome[J]. Nature, 2002, 420(6915): 520-562.
- [16] Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution[J]. Genome Biology, 2006, 7(12): 243.
- [17] Baoprasertkul P, He C B, Peatman E, et al. Constitutive expression of three novel catfish CXC chemokines: homeostatic chemokines in teleost fish[J]. Molecular Immunology, 2005, 42(11): 1355-1366.
- [18] Laing K J, Zou J J, Wang T H, et al. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2002, 26(5): 433-444.
- [19] Bièche I, Asselah T, Laurendeau I, et al. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. Virology, 2005, 332(1): 130-144.

Cloning, characterization, and expression analysis of a chemokine gene *CXCL9* from the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

ZHANG Yongzhen^{1,2,3}, CHEN Songlin^{1,2}, WANG Lei^{1,2}

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Ocean Science and Technology, Qingdao 266071, China;
3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Chemokines are small secreted cytokine peptides (8–14 kD), which were initially found to have the ability to recruit a wide range of immune cells to sites of infection and disease in mammals. In this study, we cloned the *CXCL9* genes of *Paralichthys olivaceus*. The full-length *CXCL9* cDNA is 910 bp, contains an open reading frame of 408 nucleotides encoding 135 amino acid residues. Four conserve cysteine residues at 35, 37, 60, and 77, and the first two cysteines are separated with leucine acid, which is exactly consistent with the features of CXC. Amino acid sequence analysis revealed that the *CXCL9* protein of *P. olivaceus* shared a high homology with that of *Scophthalmus maximus* and *Cynoglossus semilaevis* at 78.5% and 71.0%, respectively. RT-PCR demonstrated that *CXCL9* mRNA was expressed highest in the liver and spleen, and high in the skin and gills of healthy *P. olivaceus*. *CXCL9* mRNA expression was upregulated in the liver after being infected with *Edwardsiella tarda* for 6 h, while in the head kidney and spleen, the peak value of *CXCL9* expression was 24 h or 48 h after infection. After being infected with *Vibrio anguillarum*, the *CXCL9* mRNA expression in the liver was upregulated at 6 h, and its expression in the head kidney was upregulated at 24 h. The expression model is different in the spleen, as *V. anguillarum* infection upregulated *CXCL9* expression 10-fold after 6 h, then decreased gradually, before upregulating approximately 20-fold at 48 h. These results indicate that *P. olivaceus CXCL9* genes play an important role in the immune response, and can be a biomarker of bacterial disease in *P. olivaceus*.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *CXCL9*; chemokine; pathogenic infection; gene expression

Corresponding author: WANG Lei, E-mail: leileiawang@ysfri.ac.cn