

文章编号: 1000-0615(2005)02-0263-07

·综述·

鱼类几种新型免疫因子的研究进展

潘雪霞, 邵健忠, 项黎新, 孟 真

(浙江大学生命科学院, 浙江 杭州 310012)

关键词: 鱼类; 免疫因子; 基因结构; 免疫功能; 研究进展

中图分类号: S942.1

文献标识码: A

Research advances in immune-related cytokines of fish

PAN Xue-xia, SHAO Jian-zhong, XIANG Li-xin, MENG zhen

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Cytokines are low molecular weight proteins that serve as chemical messengers within the innate and adaptive immune systems. To date, great progresses have been made in fish cytokine researches. A number of cytokine genes have been cloned and sequenced in fish. This review will focus on a number of novel immune-related cytokines including interleukin, interferon, interferon regulatory factors, Myxovirus resistance proteins, transforming growth factor, tumor necrosis factor, chemokines (CC and CXC chemokines), NK cell enhancement factor, MHC I, MHC II and some of their receptors, which have been identified in many fish species recently. Their genes and molecular structures are clarified. These cytokines are evolutionary well conserved. They share high identities at both the nucleotide and amino acid levels with the high vertebrate cytokines, and maintain characteristic structural motifs of those higher vertebrates. The function of some cytokine genes are analyzed in conventional manner by production of recombinant molecules. Several fish cytokines have been identified based on functional similarity to, or cross-reactivity with, mammalian cytokines. Moreover, molecular techniques, such as suppression subtractive hybridization, PCR and cDNA library screening, have recently enabled the identification of fish cytokine genes. Because of fish phylogenetic position and the fact that their immune systems have not been elaborated to the extent seen in mammals, progresses in this field will deepen our understanding of the molecular origins of cytokine genes and extend our knowledge on their mechanisms conferring disease resistance and the recombinant cytokines to control fish diseases.

Key words: fish; immune-related cytokines; gene structure; immune function; research advance

与人类和高等脊椎动物相比, 鱼类免疫因子的研究起步较晚, 但进展较快。近年来已发现了多种新的免疫因子并克隆了其基因, 对它们的结构与功能也进行了较深入的研究, 这为人们深入了解鱼类免疫系统的发生, 探讨免疫因子的分子起源与进化等提供了科学依据。本文对当前鱼类中报道的几种新型免疫因子的研究进展作一综述。

1 鱼类白细胞介素

白细胞介素(interleukin, IL)是一类具有重要免疫生物学功能的细胞因子, 目前在鱼类中已发现了若干种 IL, 如

IL-2, IL-1 和 IL-8 等。Caspi 和 Avtalion^[1]首次在 PHA 刺激的鲤(*Cyprinus carpio*)外周血淋巴细胞培养液中检测到 IL-2, Kusuda 和 Xia^[2]在 PHA 刺激的鳗鲡(*Anguilla japonica*)外周血白细胞以及混合淋巴细胞反应液中也发现了同样的因子。郭琼林^[3]报道了 ConA 刺激的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)脾细胞也能产生 IL-2 样物质, 它不仅能促进小鼠脾淋巴细胞增殖, 而且能协同和激发杀伤细胞杀伤小鼠 L929 细胞; 用抗人白细胞分化抗原 CD25 (IL-2 受体, IL-2R)单克隆抗体进行的免疫组化反应显示, 草鱼淋巴细胞膜上存在与人 IL-2R 类似的受体。此外, 郭

收稿日期: 2003-08-28

资助项目: 国家自然科学基金(30271015, 30371096); 浙江省自然科学基金(301307); 高等学校博士学科点专项基金(20030335040)

作者简介: 潘雪霞(1978-), 女, 浙江杭州人, 硕士研究生, 主要从事鱼类分子免疫研究。Tel: 0571-88273287, E-mail: panxuexia@hotmail.com

通讯作者: 邵健忠, Tel: 0571-88273287, E-mail: shaojz@zju.edu.cn

琼林^[4]还探讨了鱼龄和温度对 IL-2 产生的影响。Blohm 等^[5]通过免疫磁化方法,在 PHA 和 PMA 刺激的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) sIgM⁺ 白细胞培养上清液中分离到两种大小分别为 60 kD 和 12~15 kD 的分泌蛋白,用抗鼠 IL-2 单克隆抗体与包括虹鳟在内的不同物种的 IL-2 进行的免疫组化反应显示,鱼类和哺乳动物 IL-2 在结构和功能上存在着相似性,其生物活性可以在经丝裂原预刺激的虹鳟白细胞亚群和 IL-2 依赖的鼠细胞系中得到证实。目前已从多种鱼类中诱生出 IL-2,然而有关其基因结构的研究还较少。Tamai 等^[6]首次从牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 外周血淋巴细胞中克隆了 IL-2 样 cDNA 序列,测得其大小为 306 bp,编码 26 个氨基酸长度的信号肽和 76 个氨基酸组成的成熟肽。夏春^[7]从经丝裂原刺激的鲤头肾白细胞中克隆到 IL-2 cDNA。近年来,我们实验室也克隆了草鱼 IL-2 样基因的 cDNA 编码序列,结构分析表明其全长 492 bp,编码 164 个氨基酸,推测的分子量大小为 17.5 kD,其核苷酸序列与哺乳动物 IL-2 有 34%~40% 的同源性,与鸟类有 37%~41% 的同源性,可见,鱼类与哺乳动物及鸟类 IL-2 存在一定相似性。

在鱼类 IL-1 研究方面, Sigel 等^[8]最早报道了鲶 (*Ictalurus punctatus*) 外周血淋巴细胞能对人 IL-1 作出应答反应,因此推测鱼类中存在 IL-1 样因子,并且他从鲤上皮细胞中分离到了 IL-1 样活性因子。Zou 等^[9]从虹鳟基因组文库中克隆了 IL-1 β 全基因,序列分析表明其全长为 3.1 kb, 5' 非翻译区 (UTR) 长度 97 bp, 3' UTR 长度 466 bp, 其中包含 7 个 ATTTA 基序,开放阅读框 (ORF) 长 780 bp, 由 6 个外显子组成,所编码的 IL-1 β 含 260 个氨基酸,分子量 29 kD, 有 3 个糖基化位点,与哺乳动物 IL-1 β 氨基酸序列有 49%~56% 的同源性,二级结构中有保守的受体结合位点。与哺乳动物相比,虹鳟 IL-1 β 基因在 5' 端少一个外显子,内含子长度明显减小,转录后除了正常剪接外,还存在两种保留部分内含子的不完全剪接方式。Pleguezuelos 等^[10]在虹鳟中又克隆了第 2 个 IL-1 β 基因 (IL-1 β 2)。虹鳟 IL-1 β 1 与 IL-1 β 2 在基因结构方面,两者基本相似,不同之处在于 IL-1 β 2 的外显子 3 比 IL-1 β 1 的外显子少 334 bp, 其 ORF 编码 254 个氨基酸,与 IL-1 β 1 的同源性为 82%, 缺失的 6 个氨基酸与 mRNA 剪接方式有关。在哺乳动物中, IL-1 β 前体经白介素转换酶 (ICE) 切割形成成熟肽,而在虹鳟的两个 IL-1 β 中都没有发现该酶的作用位点, Zou 等^[11,12]推测虹鳟的 IL-1 β 前体分子是在第 95 位 Ala 处切开,而 IL-1 β 2 前体分子则可能在第 89 位 Arg 和第 90 位 Ala 之间被切开,最终形成成熟肽。目前虹鳟 IL-1 β 成熟肽已通过大肠杆菌系统得到表达,生物学活性研究结果表明它能增强一系列免疫因子包括其本身的表达,还能增强某些细胞的功能,如增强吞噬细胞的移动和吞噬作用。

Sangrador 等^[13]应用扣除杂交技术克隆了虹鳟 IL-1 β 受体 cDNA,发现它编码的受体多肽由 441 个氨基酸残基

组成,与哺乳动物 II 型受体结构相似。Subramaniam 等^[14]报道了大西洋鲑 (*Salmo salar* Linnaeus) IL-1 受体 (IL-1R) 样的 cDNA 序列,它编码的受体多肽包括 1 个信号肽,3 个胞外免疫球蛋白结构域,1 个短的跨膜区和带有 Toll/IL-1R (TIR domain) 结构的胞内区,具有多种激酶的磷酸化位点、糖基化位点和 Leu 拉链结构等,与鸡和人的相应受体的氨基酸序列同源性为 44% 和 31%。

最近, Fujiki 等^[15]从鲤腹膜细胞中克隆了一种细胞因子 M17 cDNA,其大小为 1 600 bp,编码 215 个氨基酸,包括 N 端 33 个氨基酸组成的信号肽。M17 cDNA 的 3' UTR 含 7 个 ATTTA 基序,该基序在多种细胞因子基因和癌基因中是常见的。BLASTP 分析表明 M17 和鸡的睫状神经营养因子 (CNTF) 有 25% 的同源性,和人制瘤素 M (OSM) 及白血病抑制因子 (LIF) 有 19% 的同源,而这些因子目前认为都属于 IL-6 亚家族。与上述 IL-6 亚家族成员相比,虽然 M17 与 CNTF 的核苷酸序列相似性最高,但两者的基因组成和蛋白质一级结构差别较大,表现在 M17 有 3 个外显子和 2 个内含子,而 CNTF 仅有 2 个外显子和 1 个内含子, M17 有一推定的信号肽 (含 33 个氨基酸),而 CNTFs 没有信号, M17 含有 7 个保守的半胱氨酸,而 CNTF 仅含有 1 个;相反, M17 与 OSM 和 LIF 虽然在核苷酸序列的相似性上没有它与 CNTF 高,但三者都有信号序列,在相似的位点上都有多个半胱氨酸残基,在基因组成上, M17 有 3 个外显子和 2 个内含子, OSM 和 LIF 也是如此,基于这些特点,可以认为 M17 与 OSM 和 LIF 有更大的相似性。鉴于 IL-6 亚家族细胞因子在哺乳动物免疫系统有着多重重要功能,所以研究 M17 在鱼类中的功能是一项很有意义的工作。

Lee 等^[16]从牙鲆白细胞 cDNA 文库中筛选到 IL-8 cDNA。Laing 等^[17,18]则从虹鳟和角鲨 (*Triakis scyllia*) 中克隆了 IL-8 cDNA,经基因结构和进化等分析表明,它们属于趋化因子 (chemokine) 超家族成员,其功能可能与机体的炎症反应有关。

2 鱼类干扰素、Mx 蛋白和干扰素调节因子

干扰素 (interferon, IFN) 是一种重要的细胞功能调节因子,具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等功能。自 Gravell 等^[19]最早在经传染性胰腺坏死病毒感染胖头鲶 (*Pimephales promelas*) 鳍传代细胞中发现鱼类干扰素以来,国内外学者已陆续从虹鳟、牙鲆、草鱼、黑鲫 (*Carassus carassus*) 等多种鱼类中发现了 IFN^[20-25],并对其部分理化生物学性质进行了研究。近年来,作者实验室开展了草鱼 IFN 组织细胞来源及其免疫生物学功能研究,发现草鱼 IFN 主要由头肾等免疫组织中的淋巴细胞产生,除了抗病毒活性外,还具有促进巨噬细胞吞噬杀菌、调节淋巴细胞转化等功能^[26,27]。最近,我们在经植物凝集素诱导的草鱼白细胞培养液和血清中都发现了一种干扰素活性物质,

其理化和生物学特性以及诱生剂和诱生条件等与人类和高等动物中报道的 γ -IFN 相符^[28,29]。

在鱼类 IFN 基因克隆方面,由于鱼类 IFN 基因和已知的哺乳类、鸟类等 IFN 基因同源性较低,所以设计有效的引物用 PCR 或者探针筛选文库等方法获得该基因比较困难。Tamai 等^[30]曾从经 c-Ha-ras 和 c-fos 癌基因共转染的牙鲈白细胞系 HL-8 中克隆了牙鲈 IFN cDNA,其大小为 433 bp,其中 5' UTR 12 bp,3' UTR 7 bp,ORF 414 bp,它编码 30 个氨基酸组成的信号肽和 108 个氨基酸组成的成熟肽,其氨基酸序列与哺乳动物 I 型 IFN 有 12%~24% 的同源性,但与人 II 型 IFN 没有同源性。克隆的牙鲈 IFN 基因在 BHK-21 细胞中表达出的 16 kD 的重组蛋白具有抗病毒活性。最近,Stephen 等^[31]报道了斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 IFN 基因序列,该基因编码 185 个氨基酸,包括 N 端 22 个氨基酸组成的信号肽。Scott 等^[32]则克隆了鲟 IFN cDNA,其全长 cDNA 序列包括 5' UTR 143 bp,3' UTR 433 bp,开放阅读框(ORF)489 bp,编码 162 个氨基酸。张义兵等^[33]用差减 cDNA 文库技术,从灭活病毒诱导的鲫囊胚培养细胞中鉴定了一批干扰素激活相关基因。

Mx 蛋白是一类由 I 型 IFN 诱导产生的具有 GTP 酶活性的物质,因其具有粘病毒抗性(Myxovirus resistance, Mx)而得名。许多哺乳动物 Mx 蛋白能抵抗特定 RNA 病毒感染,参与形成机体的第一道防线。Nygaard 等^[34]用双链 RNA 和 I 型干扰素诱导,在大西洋鲑的巨噬细胞、成纤维细胞和大鳞大麻哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*) 的胚胎细胞中均产生了 76 kD 的 Mx 蛋白,并提出 Mx 蛋白可作为判断鱼类 I 型干扰素表达的分子标志。目前用 Poly I:C 和病毒刺激,已成功克隆了虹鳟的 3 个 Mx cDNA (RBT Mx1~3)、大西洋鲑 Mx cDNA (ASM Mx1~3)、牙鲈和大西洋星鲽 (*Hippoglossus hippoglossus*) Mx cDNA,它们的大小为 2.1~2.6 kb,与哺乳动物 Mx cDNA 的同源性为 40%~53%,所编码的 Mx 蛋白由 620~636 个氨基酸所组成,不同鱼类 Mx 蛋白的氨基酸序列同源性达 74.7%~97.9%^[35-37]。Jensen 等^[38]对星鲽基因组进行 Southern 杂交分析,发现星鲽中至少有两个 Mx 座位;在体内各种器官中,用 Poly I:C 或传染性胰腺坏死病毒都能诱导出两个大小分别为 2.2 kb 和 2.6 kb 的转录本。结构分析显示,所有鱼类的 Mx 蛋白都具有保守的特征性结构,即 N 端有 ATP/GTP 结合区域 (GXXXSGKS/T, DXXG 和 T/NKXD)、发动蛋白家族样区 (LPRG/S/KGIVTR),C 末端有核定位信号和亮氨酸拉链结构,表明从鱼类到哺乳类的进化过程中 Mx 蛋白是高度保守的,显示出 Mx 在物种生存中具有重要意义^[39]。但与哺乳动物 Mx 不同的是,鱼类 Mx 蛋白没有直接的抗病毒活性,其原因尚有待深入研究。

干扰素调节因子(interferon regulatory factors, IRF)是一类结合于干扰素刺激反应元件(interferon-stimulated response elements, ISREs)的转录因子,这类因子 N 端的 120

个氨基酸(其中包含 DNA 结合区域)具有很高的同源性。在哺乳动物中,IRF-1 与辅助 T 细胞介导的免疫反应、自然杀伤细胞活性、细胞增殖与凋亡调控、抗病毒活性和肿瘤发生有关。目前鱼类的 IRF 基因已被克隆,Collet 等^[40]克隆了虹鳟的 IRF-1 和 IRF-2 基因,并对其表达进行了研究。虹鳟 IRF-1 cDNA 包括一个长 996 bp 的 ORF,编码 331 个氨基酸,5' UTR 为 145 bp,3' UTR 为 481 bp。IRF-2 cDNA ORF 长 1035 bp,编码 334 个氨基酸,5' UTR 为 146 bp,3' UTR 为 925 bp。IRF-1 和 IRF-2 在几乎所有组织中都可被诱导,其中 IRF-1 在注射出血性败血症病毒 DNA 疫苗后表达量显著增加。在体外,未经诱导的虹鳟性腺细胞有 IRF-1 和 IRF-2 表达,且 polyI:C 能上调其表达。然而有关 IRF-1 和 IRF-2 的生物学活性是否与哺乳动物相似尚需进一步研究证实。最近,Zhang 等^[41]克隆了鲫干扰素调节因子 7(CaIRF7)cDNA,其全长 1 816 bp,包括 5' UTR 42 bp,3' UTR 508 bp 和编码 421 个氨基酸的 ORF。CaIRF7 在很多组织中为组成型表达,鲫囊胚细胞(CAB)在有活性的草鱼出血病病毒(GCHV)、紫外线灭活的 GCHV 和 CAB 干扰素的刺激下,其 CaIRF7 表达量增加程度不一致,揭示其生物学活性是由干扰素直接调控的。

3 转化生长因子 β

转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)是一类具有多种生物学效应的因子。在免疫反应中,TGF- β 除了参与炎症反应外,还能抑制免疫细胞的增殖与分化以及某些细胞因子的产生。Jang 等^[42]发现一定剂量的哺乳动物 TGF- β 能抑制虹鳟巨噬细胞的呼吸暴发,加入 TGF- β 抗体则能解除这种抑制作用,从而首次提出鱼类中存在 TGF- β 。Hardie 等^[43]克隆了虹鳟 TGF- β 基因,结构分析表明,其全长 3.4 kb,有 7 个外显子,缺少两栖类、鸟类和哺乳类的内含子 2,但在 3' 端多了 1 个内含子,把相应的外显子 7 分割成两部分。虹鳟 TGF- β 由 382 个氨基酸组成,包括 20 个氨基酸组成的信号肽、KEX-Furin 样蛋白酶识别位点(R-K-K-R)、3 个糖基化位点、一个整合素结合位点和 112 个氨基酸构成的 TGF- β 成熟肽单体分子。成熟肽有 9 个保守的半胱氨酸残基组成的典型“cysteine knot”结构。Harms 等^[44]从杂交条斑鱼 (*Morone saxatilis* \times *M. chrysops*) 中克隆了 TGF- β cDNA,它编码的含 382 个氨基酸的前体分子与虹鳟和小鼠的相似性分别为 57.3% 和 78.6%,成熟肽的相似性为 41.1% 和 68.8%。TGF- β 分子有很多亚型,在哺乳动物和鸟类中各有 3 种,分别是 TGF- β 1~3 和 TGF- β 2~4,爪蟾中为 TGF- β 2 和 TGF- β 5,其中 TGF- β 4 和 TGF- β 5 被认为是 TGF- β 1 的祖先。在鱼类中,目前已发现存在 3 种 TGF- β 亚型。在鲤中已发现 TGF- β 1 和 TGF- β 2 两种亚型^[45],虹鳟 TGF- β 被认为是 TGF- β 1 的祖先。硬骨鱼类 TGF- β 3 高度保守,西伯利亚鲟 (*Acipenser baeri*)、虹鳟和欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*) 的 TGF- β 3 的核苷酸和氨基酸

序列与恒温动物的相似性分别为 83% ~ 84% 和 90% ~ 95%, 但与虹鳟 TGF- β 和鲤 TGF- β 2 同源性较低, 进化分析表明它们分属明显异源的类群^[46]。Laing 等^[47] 在鲈 (*Pleuronectes platessa*) 中同时克隆到 3 种 TGF- β 基因片段, 分别与脊椎动物的 TGF- β 1/4/5、TGF- β 2 和 TGF- β 3 同源, 首次为同一种鱼中存在多拷贝 TGF- β 基因提供了直接证据。现有的一些研究还表明, TGF 在鱼类中的功能可能与其在高等脊椎动物中的作用相似, 但确切的生物学功能也有待进一步深入研究

4 肿瘤坏死因子 α

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 是由巨噬细胞和活化 T 细胞产生的重要免疫因子, 具有调节白细胞迁移、增殖、分化和凋亡等活性, 是 β -jellyroll 家族成员。最初人们发现哺乳动物 TNF- α 能增强经丝裂原刺激的虹鳟头肾细胞的免疫反应和巨噬细胞活化, 而针对 TNF- α 受体的单克隆抗体能抑制这种作用, 因而间接证明鱼类中存在 TNF- α 。Hirono 等^[48,49] 利用牙鲈表达序列标签 (expressed sequence tag, EST), 获得了 TNF- α 及其受体的基因序列。TNF- α 基因在牙鲈中是单拷贝, 其 cDNA 全长 1217 bp, 包含 4 个外显子, 5' UTR 188 bp, 3' UTR 354 bp, ORF 675 bp, 编码 225 个氨基酸, 与哺乳类的 TNF- α 和 β 的氨基酸相似性为 20% ~ 35%。TNF- α 受体 cDNA 为 2 729 bp, 编码 395 个氨基酸, 推测的受体蛋白具有典型的 TNF 受体 1 特征, 胞内区有 1 个“死亡”结构域, 与诱导细胞凋亡有关, 与 Fas 同属 1 个家族^[50]。Laing 等^[51] 报道了两个虹鳟 TNF- α 基因。其中 TNF- α 1 基因全长 2007 bp, 包括 4 个外显子, 5' UTR 140 bp; 3' UTR 506 bp; ORF 738 bp, 编码 246 个氨基酸; 与牙鲈 TNF- α 的氨基酸序列有 50% 相似性。PCR 和 DNA 印迹杂交结果表明, TNF- α 基因在虹鳟中是双拷贝的, TNF- α 2 基因较长, 约 2.1 kb, 也由 4 个外显子组成, mRNA 剪接位点与基因相同, 但转录调控区的结构有一定差别, 当用 LPS 刺激巨噬细胞后, 发现它的表达强于第一个基因

最近, Sadij 等^[52] 在鲤中也发现了两个 TNF- α 基因, 其编码的 TNF- α 分别由 237 和 231 个氨基酸组成, 推测它们的分子量约为 26 kD。已知哺乳动物的 TNF- α 家族有一个标志序列 ([LV]-x-[LIVM]-x₃-G-[LIVMF]-Y-[LIVMFY]₂-X₂-[QEKHL]), 在预测的鲤 TNF- α 蛋白质序列中, 也具有该标志序列, 所不同的是在第一个氨基酸位点上, 由 I 代替了 LV。此外, 鲤 TNF- α 也含有 1 个与哺乳动物相似的穿膜区和产生成熟肽的剪切位点。鲤 TNF- α 1 和 TNF- α 2 氨基酸序列有 80% 相同, 和其他鱼类的 TNF- α 氨基酸序列约 40% 相同, 尤其在 β 链具有较高的保守性, 与人 TNF- α 相比较, 有 25% 相同。他们还发现, 在几种不同的鲤细胞系中, TNF- α 1 和 TNF- α 2 基因的 3' UTR 均存在多态性, 这种多态性与 TNF- α 的生物学功能有关, 表现在多态性位点

ARE 基序 (AU-rich element, ARE, 即 AUUUA) 与 mRNA 的稳定性和翻译效率有关。另外, TNF- α 2 编码区也含有一个多态性位点, 在该位点上, 可以由脯氨酸密码子替换丝氨酸密码子, 这一改变使 TNF- α 2 基因的编码区增加了 1 个 *Hinf*I 酶切位点。Jeroen 等认为, 在鲤 TNF- α 2 分子中, 由脯氨酸替换丝氨酸后, 可以影响其与受体的结合, 同时造成不同鲤鱼品系对疾病的抵御和敏感性不同, 但有关其进一步的分子机制尚有待阐明。

5 趋化因子

趋化因子 (chemokine) 是一类由免疫细胞产生的具有趋化白细胞作用的超家族细胞因子, 参与炎症反应的发生。根据多肽链中第 1 对半胱氨酸残基的排列方式, 可分成 4 个亚族: CXC 亚族, CC 亚族, C 亚族和 CX3C 亚族。鱼类中发现的趋化因子主要是 CC 亚族和 CXC 亚族, 如虹鳟的趋化因子 CK1 属于 CC 亚族, 其基因长度为 1 215 bp, 其中 ORF 300 bp, 5' UTR 16 bp, 3' UTR 508 bp, 有 3 个 ATTTA 重复序列。虹鳟趋化因子 CK1 与哺乳类 CC 因子在核苷酸和氨基酸序列上分别有 46% 和 65% 的同源性^[53]。

现认为 IL-8 是一种粒细胞趋化因子, 在哺乳动物和鸟类 IL-8 中存在 Glu-Leu-Arg (ELR) 结构, 它与招募中性粒细胞并与相应受体结合有关。Lee 等^[16] 从牙鲈白细胞 cDNA 文库中克隆了 IL-8 cDNA, 其大小为 884 bp, 其中 ORF 330 bp, 编码 110 个氨基酸, 包括 23 个氨基酸组成的信号肽和 87 个氨基酸组成的成熟肽, 在成熟肽中包含了 4 个保守的半胱氨酸残基, 与哺乳动物和鸟类 IL-8 的 ORF 相比较, 缺少编码 ELR 结构的序列; 牙鲈 IL-8 cDNA 的 5' UTR 180 bp, 3' UTR 374 bp, 其中含有多个重复的 ATTTA 序列。最近, 虹鳟和角鲨的 IL-8 cDNA 也相继被克隆, 它们所编码的 IL-8 中也都缺乏 ELR 结构。角鲨 IL-8 与鸡和哺乳动物 IL-8 的氨基酸序列同源性为 50.5% 和 40.4% ~ 45.5%, 与虹鳟的同源性只有 37.7%。虽然上述已知的鱼类 IL-8 中都缺少 ELR 结构, 但是从对包括鱼类在内的多个物种的 IL-8 进行的系统进化树分析表明, 它们确实为 IL-8^[17,18], 目前对鱼类 IL-8 的分子生物学功能研究正在进行中。

6 NK 细胞增强因子

NK 细胞增强因子 (NK cell enhancement factor, NKEF) 是一类能够增强 NK 细胞的细胞毒活性并在氧化应激途径中保护 DNA 和蛋白质免受氧化损伤的因子。目前的研究表明, NKEF 很保守, 从鱼类到哺乳动物有较高的同源性。Zhang 等^[54] 从虹鳟中克隆了 NKEF cDNA, 它包括 ORF 597 bp, 编码 199 个氨基酸; 5' UTR 53 bp; 3' UTR 462 bp。同时, 他们还获得了 6.5 kb 的 NKEF 基因全序列, 它由 6 个外显子组成, 与人和鼠的 NKEF 基因结构高度相

似。RT-PCR 结果表明在虹鳟肝、心、肾、肠、鳃、脾、红细胞和白细胞中都有 NKEF 表达。Southern 杂交发现 NKEF 基因在虹鳟基因组中以单拷贝形式存在。Shin 等^[55]克隆了鲤 NKEF 基因,全长 3363 bp,包含 6 个外显子,ORF 597 bp,编码 199 个氨基酸;5' UTR 97 bp;3' UTR 100 bp。该基因外显子和内含子的接合位点与人和小鼠的完全相同,ORF 部分内含子插入的位置也与虹鳟和人的完全相同。鲤 NKEF 包含该家族两个保守的 Val-Cys-Pro (VCF) 结构域,与哺乳动物和虹鳟等的结构高度保守,氨基酸序列相似性在 80% 以上。但与虹鳟不同的是,NKEF 在鲤不同组织中的表达水平有显著差异。

7 主要组织相容性复合体

鱼类主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 包括 MHC I 和 II,近年来已从鲤^[56-58]、大西洋鲑^[59-62]、斑马鱼^[63,64]、虹鳟^[65,66] 等多种鱼类中克隆了 MHC I 和 II 基因。MHC I 类分子是由该基因编码的 α 链和 β_2 -微球蛋白 (β_2 -microglobulin, B2m) 非共价连接形成的异二聚体,分成经典的 MHC I (MHC Ia) 和非经典的 MHC I (MHC Ib) 两类。MHC Ia 由导肽、胞外结构域 ($\alpha 1 \sim 3$)、连接肽/跨膜区和胞质区组成, $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 结构域中有 4 个保守的半胱氨酸残基、保守的多肽结合区、B2m 结合位点和 CD8 作用位点等,在肺鱼 (*Protopterus aethiopicus*) 和鲤中还有 N-糖基化位点。这类分子在所有真核细胞表面都有表达,具有高度多态性。此外,鲨鱼、鲤、虹鳟等都克隆到非经典的 MHC Ib 分子,多为假基因,与 MHC Ia 序列和功能有明显不同,多态现象也不明显,分布具有组织特异性,但在大西洋鳕 (*Gadus morhus* Linnaeus) 中克隆的 MHC Ib 分子在进化上却与经典分子的亲缘关系较近^[67]。对青鳉 (*Oryzias latipes*)、河豚 (*Fugu rubripes*) 和斑马鱼 MHC I 基因中大约 400 kb 区段的研究表明,该区都包含了多个 MHC Ia 基因和少量的假基因,浓缩了人 3 Mb 相应区段中几乎全部与主要组织相容性抗原相关的基因,说明 MHC I 在从鱼类到哺乳类进化过程中的保守性和在免疫系统中的特殊作用^[68,69]。

鱼类 MHC II 基因包括 MHC IIA 和 MHC IIB,分别编码 MHC II 蛋白质的 α 链和 β 链。两条多肽链都包含前导肽、两个胞外结构域 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ / $\beta 1$ 、 $\beta 2$)、连接肽/跨膜区和胞质区,在结构上具有保守的半胱氨酸残基、多肽结合区、N-糖基化位点等。哺乳动物 MHC II 基因由 4~6 个外显子组成,鱼类中也是如此。鲶的 MHC IIA 基因有 5 个外显子,斑马鱼有 4 个,它们在编码连接肽/跨膜区、胞质区和 3' UTR 的外显子有差别。在已知的多种鱼的 MHC IIB 基因中,一个胞外结构域往往由一个外显子编码,但在热带鱼丽鱼科中, $\beta 2$ 结构域对应的外显子被内含子隔开,而由两个外显子编码。对多种鱼的进化和群体遗传学研究发现,II 类 MHC 多态现象主要在 $\beta 2$ 结构域,但是条斑鱼和鳅

MHC IIA 基因也存在多个不同的座位^[70]。

8 结语

近年来,越来越多的鱼类免疫因子相继被发现,其基因结构和生物学功能也逐步得到阐释,这些研究成果不仅丰富了鱼类免疫学内容,对鱼类病害防治具有重要的指导意义,而且为揭示免疫因子的分子起源与进化以及免疫系统的发生提供了科学依据。可以预示,随着结构与功能基因组学等新兴学科的发展,鱼类分子免疫学必将取得更大的进展。

参考文献:

- [1] Caspi R R, Avtalion R R. Evidence for the existence of an IL-2 like lymphocyte growth promoting factor in bony fish, *Cyprinus carpio* [J]. Dev Comp Immunol, 1984, 8(1): 51-60.
- [2] Kusuda R, Xia C. Lymphocyte growth-promoting factor (S) produced by the leukocytes of eel *Anguilla japonica* [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58 (9): 1667-1671.
- [3] 郭琼林. 草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液 IL-2 物质的检测 [J]. 水生生物学报, 2001, 25 (1): 21-27
- [4] 郭琼林. 草鱼、中华鳖 IL-2 活性影响因素的研究 [J]. 水生生物学报, 2001, 25(4): 311-316.
- [5] Blohm U, Siegl E, Köllner B. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sIgM⁺ leucocytes secrete an interleukin-2 like growth factor after mitogenic stimulation *in vitro* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2003, 14: 449-466.
- [6] Tamai T, Murakami H, Shirahata S. DNA encoding flatfish interleukin-2 [Z]. JP 1993294997-A 1 09-NOV-1993.
- [7] 夏春. 鲤鱼存在 T 细胞增殖因子类基因 [J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(2): 128.
- [8] Sigel M M, Hamby B A, Huggins E M, et al. Phylogenetic studies on lymphokines. Fish lymphocytes respond to human IL-1 and epithelial cells produce an IL-1 like factor [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1986, 12(1-4): 47-58.
- [9] Zou J, Cunningham C, Secombes C J, et al. The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Interleukin-1 beta gene has a different organization to mammals and undergoes incomplete splicing [J]. Eur J Biochem, 1999, 259 (3): 901-908.
- [10] Pleguezuelos O, Zou J, Cunningham C, et al. Cloning, sequencing, and analysis of expression of a second IL-1 beta gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Immunogenetics, 2000, 51 (12): 1002-1011.
- [11] Zou J, Grabowski P S, Cunningham C, et al. Molecular cloning of interleukin 1 beta from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site [J]. Cytokine, 1999, 11 (8): 552-560.
- [12] Zou J, Holland J, Pleguezuelos O, et al. Factors influencing the expression of interleukin-1 beta in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes [J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24(6-7): 575-582.
- [13] Sangrador-Vegas A, Martin S A M, O'Dea P G, et al. Cloning and characterization of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA [J]. Eur J Biochem, 2000, 267 (24): 7031-7037.
- [14] Subramaniam S, Stansberg C, Olsen L, et al. Cloning of a *Salmon salar* interleukin-1 receptor-like cDNA [J]. Dev Comp Immunol, 2002, 26 (5): 415-431.
- [15] Fujiki K, Nakao M, Dixon B, et al. Molecular cloning and characterization of a carp (*Cyprinus carpio*) cytokine-like cDNA that shares sequence similarity with IL-6 subfamily cytokines CNTF, OSM and LIF [J]. Dev Comp Immunol, 2003, 27(2): 127-136.

- [16] 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 (2): 237-243.
- [17] Laing K J, Zou 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 (5):433-444.
- [18] Inoue Y, Haruta C, Usui K, *et al*. Molecular cloning and sequencing of the banded dogfish (*Triakis scyllia*) interleukin-8 cDNA [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2003, 14 (3):275-281.
- [19] Gravel M, Malsberger R G. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1965, 126:555-565.
- [20] Beasley, A R, Sigel M M, Clem L W, *et al*. Latent infection in marine fish cell tissue cultures [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1966, 121:1169-1174.
- [21] Oie H K, Loh P C. Reovirus type 2: Induction of viral resistance and interferon production in fathead minnow cells [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1971, 136:369-373.
- [22] Graham, Secombes C J. Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma [J]. *J Fish Biol*, 1990, 36 (4):563-573.
- [23] Tamai T, Shirahata S, Sato N, *et al*. Purification and characterization of interferon-like antiviral protein derived from flatfish (*Paralichthys olivaceus*) lymphocytes immortalized by oncogenes [J]. *Cytotechnology*, 1993, 11(2):121-131.
- [24] Lêong, Jo-Ann C, Trobridge G D, *et al*. Interferon-inducible Mx proteins in fish [J]. *Immunol Rev*, 1998, 166:349-363.
- [25] 张义兵, 王铁辉, 李戈强, 等. 鲫鱼囊胚细胞干扰素的诱导及部分特性 [J]. *中国病毒学*, 2000, 15(2): 163-169.
- [26] 邵健忠, 项黎新. 草鱼干扰素的免疫调节功能 [J]. *动物学报*, 2001, 47(4): 404-411.
- [27] 邵健忠, 项黎新. 草鱼干扰素的体外诱导及其组织细胞的来源 [J]. *动物学报*, 2001, 47(6):677-683.
- [28] 邵健忠, 项黎新, 闫春兰. 草鱼 γ -干扰素的体内诱导 [J]. *水产学报*, 2001, 25(1): 38-42.
- [29] 邵健忠, 项黎新. PHA 体外诱导草鱼白细胞产生 γ -干扰素的研究 [J]. *海洋与湖泊*, 2001, 32(2): 117-124.
- [30] Tamai T, Shirahata S, Noguchi T, *et al*. Cloning and expression of flatfish (*Paralichthys olivaceus*) interferon cDNA [J]. *Biochem Biophys*, 1993, 1174:182-186.
- [31] Stephen M, Altman, Mark T, *et al*. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *J Virol*, 2003, 77(3):1992-2002.
- [32] Scott L, Melane W, Eva B, *et al*. Identification of a cDNA encoding channel catfish interferon [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28:97-111.
- [33] 张义兵, 张奇亚, 徐德全, 等. 活病毒诱导的培养细胞中鉴定鱼类抗病毒相关基因 [J]. *科学通报*, 2003, 48 (5):457-463.
- [34] Nygaard R, Husgard S, Sommer A I, *et al*. Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2000, 10 (5): 435-450.
- [35] Trobridge G D, LaPatra S E, Kim C H, *et al*. Mx mRNA expression and RFLP analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* genetic crosses selected for susceptibility or resistance to IHNV [J]. *Dis Aquat Organ*, 2000, 40(1): 1-7.
- [36] Trobridge G D, Chiou P P, Leong J A. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells [J]. *J Virol*, 1997, 71 (7):5304-5311.
- [37] Lee J Y, Hirono I, Aoki T. Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24 (4): 407-415.
- [38] Jensen V, Robertsen B. Cloning of an Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, 20 (8):701-710.
- [39] Leong J A C, Trobridge G D, Kim C H Y, *et al*. Interferon-inducible Mx proteins in fish [J]. *Immunol Rev*, 1998, 166:349-363.
- [40] Collet B, Guido C J H, Mazzoni D. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interferon regulatory factor 1 and 2 (IRF-1 and IRF-2) [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27(2):111-126.
- [41] Zhang Y B, Hu C Y, Zhang J, *et al*. Molecular cloning and characterization of crucian carp (*Carassius auratus* L.) interferon regulatory factor 7 [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2003, 15(5):453-466.
- [42] Jang S I, Handie L J, Secombes C J. Effects of transforming growth factor- β 1 on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity [J]. *Dev Comp Immunol*, 1994, 18(4): 315-323.
- [43] Hardie L J, Laing K J, Daniels G D, *et al*. Isolation of the first piscine transforming growth factor beta gene; analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Cytokine*, 1998, 10 (8):555-563.
- [44] Harms C A, Kennedy-Stoskopf S, Home W A, *et al*. Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis* \times *M. chrysops*) transforming growth factor-beta (TGF-beta), and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay to measure TGF-beta mRNA of teleost fish [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2000, 10 (1):61-85.
- [45] Zhan Y, Jimmy K. Molecular isolation and characterisation of carp transforming growth factor beta 1 from activated leucocytes [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2000, 10 (4): 309-318.
- [46] Laing K J, Pilstrom L, Cunningham C, *et al*. TGF-beta 3 exist in bony fish [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999, 72 (1-2):45-53.
- [47] Laing K J, Cunningham C, Secombes C J. Gene of three different isoforms of transforming growth factor beta are present in plaice (*Pleuronectes platessa*) DNA [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2000, 10 (3): 261-271.
- [48] Hirono I, Nam B H, Kurobe T, *et al*. Molecular cloning, characterization and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Immunol*, 2000, 165:4423-4427.
- [49] Hirono I, Nam B H, Kurobe T, *et al*. Cloning of cDNA and gene of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24(Suppl):62.
- [50] Nam B H, Yamamoto E, Hirono I, *et al*. A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with *Hirane rhabdovirus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24(1):13-24.
- [51] Laing K J, Wang T, Zou J, *et al*. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- α [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(5):1315-1322.
- [52] Jeroen J P, Stet R J, de Vries B J, *et al*. Molecular and functional characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypanotolerance [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27 (1):29-41.
- [53] Dixon B, Shum B P, Adams E J, *et al*. Isolation of a beta-chemokine like cDNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1997, 21(2):187-197.
- [54] Zhang H, Evenhuis J P, Thorgaard G H, *et al*. Cloning, characterization and genomic structure of the natural killer cell enhancement factor (NKEF)-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25 (1):25-35.
- [55] Shin D H, Fujiki K, Nakao M, *et al*. Organization of the NKEF gene and its expression in the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25 (7):597-606.
- [56] Hashimoto K, Nakanishi T, Kurosawa Y, *et al*. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:6863-6867.

- [57] van Erp S H M, Dixon B, Figueroa F, *et al*. Identification and characterization of new major histocompatibility complex class I gene in carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Immunogenetics, 1996, 44(1):49-61.
- [58] van Erp S H M, Egberts E, Stet R J. Characterization of major histocompatibility complex class II A and B genes in gynogenetic carp clone [J]. Immunogenetics, 1996, 44(3):192-202.
- [59] Persson A C, Stet R J M, Pilstrom L, *et al*. Characterisation of MHC class I and beta2-microglobulin sequences in Atlantic cod revealing an unusual high number of expressed class I genes [J]. Immunogenetics, 1999, 50(1):49-59.
- [61] Grimholt U, Hordvik I, Fosse V M, *et al*. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNA from Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Immunogenetics, 1993, 37(6):469-473.
- [62] Hordvik I, Grimholt U, Fosse V M, *et al*. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the MHC class II beta chain in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Immunogenetics, 1993, 37(6):437-441.
- [63] Sultmann H, Mayer W E, Mayer F. Organization of MHC class II B genes in the zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. Genomics, 1994, 23(1):1-4.
- [64] Takeuchi H, Figueroa F, O'hUigin C, *et al*. Cloning and characterization of class I Mhc genes of the zebrafish, *Brachydanio rerio* [J]. Immunogenetics, 1995, 42(1):77-84.
- [65] Dorschner M O, Duris T, Bront C R, *et al*. High levels of MHC class II allelic diversity in lake trout from lake superior [J]. J Heredity, 2000, 91(5):359-363.
- [66] Hansen J D, Strassburger P, du Pasquier L. Conservation of an alpha 2 domain within the teleostean world, MHC class I from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Dev Comp Immunol, 1996, 20(6):417-425.
- [67] Clark M S, Shaw L, Kelly A, *et al*. Characterization of the MHC I region of the Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) [J]. Immunogenetics, 2001, 52(7):174-185.
- [68] Michalova V, Murray B W, Sultmann H, *et al*. A contig map of MHC class I genomic region in zebrafish reveals ancient synteny [J]. J Immunol, 2000, 164(11):5296-5305.
- [69] Matsuo M Y, Asakawa S, Shimizu N, *et al*. Nucleotide sequences of the MHC class I genomic region of a teleost the medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Immunogenetics, 2002, 53(10-11):930-940.
- [70] Godwin U B, Flores M, Quiniou S, *et al*. MHC class II A gene in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24(6-7):609-622.