

## 鳊 T 细胞表面受体 CD4 分子的克隆与表达分析

郭政<sup>1,2</sup>, 聂品<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 克隆了鳊 T 细胞表面受体 CD4 分子的 cDNA 序列并对其在组织/器官的表达进行了分析。鳊 CD4 分子的 cDNA 序列全长为 2 356 bp, 编码 469 个氨基酸。该 CD4 分子由 4 个免疫球蛋白样结构域(V1-C1-V2-C2)构成的胞外区、一个跨膜区和一个包含保守的 CXC 基序的胞内区组成。系统进化分析表明, 鳊 CD4 分子与同属于鲈形目的鲈 CD4 分子聚为一支, 与鲈的相似性最高(57%), 与鲤的相似性较低(34%)。序列比对分析显示, CD4 分子胞外区存在多个保守性位点, 如: C1 结构域中的 WTC 基序、V2 和 C2 结构域中的 N-糖基化位点等。同鸟类和哺乳类不同的是, 鳊 CD4 分子在 V1 结构域中缺少由半胱氨酸(Cys)残基对形成的二硫键, 而在 V2 结构域中存在一个额外的二硫键, 这可能会改变 CD4 分子的空间构象, 进而影响到 CD4 与 MHC II 的结合以及后续的抗原诱导的 T 细胞活化等。荧光定量 PCR 分析表明, CD4 mRNA 在鳊的胸腺中表达量最高, 在脾脏中表达量最低。脂多糖腹腔注射 8 h 后, CD4 mRNA 在鳊的胸腺、脾脏和头肾中都呈显著的上调表达( $P < 0.05$ )。

**关键词:** 鳊; T 细胞; CD4; 表达

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

在哺乳动物中, 至少存在 2 种表面标记与表达谱系不相同的 T 细胞亚群, 即 CD4 + 和 CD8 + T 细胞<sup>[1]</sup>。CD4 + 细胞主要是辅助性 T 细胞(helper T cell, Th), 为 MHC II 类限制性, 几乎参与免疫应答的全部过程<sup>[2]</sup>; CD8 + 细胞主要是细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL), 为 MHC I 类限制性, 是细胞免疫的主要效应细胞。CD4 分子属于免疫球蛋白中的跨膜蛋白, 胞外区有 4 个 Ig 样(immunoglobulin-like)结构域组成, 第一个和第三个结构域为 IgV 样结构域(V1 和 V2), 第二个和第四个结构域为 IgC 样结构域(C1 和 C2)。其中 V1 和 C1 是 CD4 与 MHC II 的主要结合位点<sup>[3]</sup>。不同物种的 CD4 分子中存在多个保守的氨基酸位点和基序, 例如: 胞外区中用来形成二硫键的 Cys 残基、WTC 基序(C1 结构域)和 N-糖基化位点(V2 和 C2 结构域), 以及胞质区中的 CXC 基序。

鱼类中也存在与哺乳动物类似的 CD4 + Th 细胞和 CD8 + CTL 细胞<sup>[4-7]</sup>, 可行使类似于哺乳动物 T 细胞的功能, 如同种异体移植排斥、混合淋巴细胞反应和迟发型超敏反应等<sup>[4,8]</sup>。目前, 鱼类中许多免疫相关分子被克隆出来, 包括 TCR<sup>[8]</sup>、CD3<sup>[10-12]</sup>、CD8<sup>[13-14]</sup>、MHC<sup>[15-16]</sup>等, 这些分子与哺乳动物的同源基因在氨基酸序列上都有一定的保守性, 如 CD3 分子中的免疫受体酪氨酸蛋白激酶激活基序(ITAM)、CD8 分子胞内区存在的 p56Lck 蛋白激酶结合位点等, 表明 T 细胞的活化过程在从鱼类到哺乳动物中都非常保守。近来, CD4 分子已在多种鱼类中得到了克隆<sup>[17-22]</sup>。与哺乳动物不同的是, 鱼类中还发现一种胞外区只包含 2 个或者 3 个结构域的 CD4 分子, 即 CD4REL<sup>[18,20,23-24]</sup>。在染色体上, 这些 CD4REL 分子与 CD4 分子呈线性排列, 分布在 *COSPS7A* 和 *PEX5* 基因之间<sup>[23]</sup>。序列分

收稿日期:2011-04-19 修回日期:2011-06-06

资助项目:国家自然科学基金委与广东省联系基金(U0631010)

通讯作者:聂品, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

析发现,只包含两个结构域的 CD4 分子和 4 个结构域的 CD4 分子在结构上有很多的共同点<sup>[18]</sup>。因此,CD4REL 可能是通过基因复制的方式产生的。2004 年,在无颌类七鳃鳗 (*Petromyzon marinus*) 中发现只包含两个结构域的 CD4 分子,推测该分子可能是现存物种 CD4 分子的原始形式<sup>[25]</sup>。

硬骨鱼类是脊椎动物中一个大的类群,对鱼类免疫系统的研究有助于了解免疫系统的多样性以及脊椎动物免疫系统的进化;另一方面很多鱼类也是重要的水产养殖对象,对他们免疫系统的研究在水产病害的防治方面亦具有重要的意义。鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是我国重要的淡水养殖鱼类,具有较高的经济价值。近年来,高密度的养殖模式导致病害的频繁发生,给养殖业造成了经济损失。病害的免疫防治受到了较高的重视。目前,已在鳊的免疫细胞<sup>[26]</sup>、免疫球蛋白<sup>[27-28]</sup>和一些非特异性免疫因子<sup>[29-31]</sup>方面取得了一些进展,但对其适应性免疫中的 T 淋巴细胞的研究还未见报道。本研究克隆了鳊的 CD4 分子,并通过荧光定量 PCR 分析了 CD4 分子在健康鳊和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激下各个器官和组织中的表达变化,期望可以为鱼类病害的免疫防治提供理论基础,完善对鳊免疫系统的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 总 RNA 提取

实验用鳊(体质量:400~500 g)均来自武汉市江夏区牛山湖渔场,室内水簇箱驯养 1 周以上。用 MS222 (Tricaine methanesulfonate) 麻醉后对各个组织和器官进行采样,按 Trizol (Invitrogen) 说明书提取总 RNA,用于反转录合成 cDNA 第一链。

### 1.2 鳊 CD4 全长 cDNA 扩增

根据已知鱼类 CD4 的序列设计简并引物 CD4-1 和 CD4-2。按照 SMART cDNA Synthesis Kit (Clontech) 操作手册,将提取的鳊胸腺总 RNA 反转录为 cDNA 第 1 链。根据已获得的 CD4 基因片段设计 5' 和 3' RACE 引物(表 1),与 UPM 扩增鳊 CD4 cDNA 的 5' 和 3' 端。PCR 反应条件为 94 °C 变性 5 min; 94 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 45 s, 5 个循环; 94 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶纯化试剂盒 (Omega) 纯化后与 pMD-18T 载体 (TaKaRa) 连接,转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  株,PCR 检测阳性克隆后,用 ABI PRISM 377 自动测序仪对阳性克隆测序。最后,对所获得的序列进行拼接,获得完整的 CD4 全长 cDNA。

表 1 实验中所用的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence	用途 application
CD4-1	GG(G/A)CC(G/A)TGG(A/G)(G/A)(G/A)TGTGAGCTGTGG	正向简并引物
CD4-2	AA(G/T)CCTT(T/C)G(A/G)GCT(T/G)TGGG(T/G)TTTTG	反向简并引物
CD4F1	ATATGTAGTGTCATAGTCATCGCAATCCT	3' RACE-PCR
CD4F2	CTCCTCGTACTCATTTTCATCCTCTACCG	
CD4gsp1	GACGCAAACAACGGAAGATGAGGT	5' RACE-PCR
CD4gsp2	CGCTATCTCCTGTCCCACTTCC	
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	扩增 5' 和 3' 末端的通用引物
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
RT-CD4-F	ATGTAGTGTCATAGTCATCGCAATCC	CD4 Real-time PCR 上游引物
RT-CD4-R	CTGTAGAATCCTTTGGGCTTTGG	CD4 Real-time PCR 下游引物
actinF	GAGAGGGAAATCGTGCGTGA	Actin Real-time PCR 上游引物
actinR	CATACCGAGGAAGGAAGGCTG	Actin Real-time PCR 下游引物

### 1.3 序列分析

氨基酸序列的推断通过 EXPASY 网站的

Translate 程序完成 (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>); CD4 分子中的 4 个 Ig 样结构域

<http://www.scxuebao.cn>

的预测采用 SMART 软件进行预测 ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1));不同物种 CD4 分子之间的同一性比较在 NCBI 中 Blastp 中进行 ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST\\_PROGRAMS=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome));氨基酸序列的多重比对采用 CLUSTAL W 2.0 程序完成 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>);信号肽、跨膜区以及 N-糖基化位点的预测分别采用 CBS Prediction Servers 中的 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)、NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 程序进行。基于氨基酸全序列构建的系统发育树由 Clustal X 和 MEGA 4.0 程序中的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建。

#### 1.4 Real-time PCR 分析

组织总 RNA 的抽提和反转录合成 cDNA

为检测 CD4 在不同组织和器官中的表达水平,取 3 尾健康鳊 (体质量 400 ~ 500 g),驯养 1 周后分别取其胸腺、脾脏、头肾、肝脏、小肠、鳃。参照 Trizol 试剂盒说明书提取组织总 RNA,经 DNase I RNase-free (Fermentas) 处理后,分别测量 RNA 样品在 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光度值,计算 RNA 样品的浓度和纯度。取 2  $\mu$ g 处理的 RNA 样品在 20  $\mu$ L 反应体系中用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 进行反转录。

为了更好的了解细菌内毒素对鳊免疫系统的影响,将 24 尾健康鳊随机分成 2 组,其中一组为空白对照 (注射 PBS),另外一组为实验组 (注射 LPS),注射剂量参照鱼体质量进行 (每千克体质量注射 400  $\mu$ g LPS)。注射后分别在 0、4、8、12 h 进行采样。RNA 提取和反转录的方法同上。

标准曲线绘制 根据鳊 CD4 基因序列设计引物 RT-CD4-F 和 RT-CD4-R,内参基因  $\beta$ -actin 的引物为 ActinF 和 ActinR (表 1)。分别用上述的 2 对引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 凝胶回收试剂盒 (BioDev) 对目的片段进行纯化,连接到 pMD-18T 载体 (TaKaRa) 中,通过测序来检验 cDNA 的正确

性。提取含有插入目的片段的质粒进行  $10^{-1}$  ~  $10^{-5}$  梯度稀释,绘制标准曲线。

荧光定量 PCR 和数据分析 荧光定量 PCR 用 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒 (TOYOBO) 在 Chromo4 Real-Time Detection System (MJ Research) 上进行,扩增条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 20 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,42 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 结束后对扩增产物进行溶解曲线分析,以确保特异性扩增。根据标准曲线计算样品中 *mIgD* 基因的相对拷贝数,每个样品设 3 个重复,以未加模板的 PCR 反应样品作为阴性对照。PCR 结果用 Opticon Monitor Software 2.03 Version (MJ Research) 进行分析。

## 2 结果

### 2.1 鳊 CD4 cDNA 序列和预测的氨基酸序列

利用简并引物扩增到鳊 CD4 基因片段,通过 RACE-PCR 的方法获得其 cDNA 全长 (GenBank 登录号为 GU550706),共包含 2 356 bp,其编码区有 1 410 bp,编码 469 个氨基酸 (图 1),胞外区有 4 个结构域 (V1-C1-V2-C2) 构成。

鳊 CD4 分子由 21 个氨基酸组成的信号肽 (最可能剪切位点是 Gly20 与 Thr21 之间)、396 个氨基酸形成的 4 个结构域、23 个氨基酸构成跨膜区和 29 个氨基酸构成的胞内区组成 (图 1)。胞外区包含 5 个潜在的 N-糖基化位点,其中在 V2 和 C2 结构域中的 N-糖基化位点 (Asn289-Leu290-Thr291 和 Asn343-Leu344-Thr345) 普遍存在于所有的脊椎动物中。通过对部分已知物种的 CD4 分子进行多序列比对发现,鸟类和哺乳类 V1 结构域中都存在保守的 Cys 残基对,可在结构域内形成二硫键。但是,在所有硬骨鱼类中都不存在这样的一个 Cys 残基,因此无法形成二硫键。在 C1 结构域中,鱼类同小鼠 (*Mus musculus*)、人 (*Homo sapiens*) 一样存在两个 Cys 残基。但是,在鸡 (*Gallus gallus*)、狗 (*Canis lupus familiaris*)、猫 (*Felis catus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、白鲸 (*Delphinapterus leucas*) 中缺少一个 Cys 残基,表明这些物种 CD4 分子 C1 结构域中可能不存在二硫键。在 V2 结构域中,不同于高等脊椎动物的是,鱼类中存在两个 Cys 残基,可在结构域内形成一个二硫键连接。在 C2 结构域中,所有物种都

存在两个 Cys 残基。总的来说,由于不同结构域中形成二硫键的不同,鳊 CD4 分子可能在构象上与高等脊椎动物不同,这种不同可能对 CD4 的表达和功能有一定的影响。另外,在鱼类中,还存在一类只有包含 2 个或者 3 个结构域的 CD4 分子,其每个结构域中都存在形成二硫键的 Cys 残基对。跨膜区在所有物种中都不保守,但是胞内区

CXC 基序普遍存在于所有物种中。该基序是酪氨酸蛋白激酶 p56lck 的结合位点,可通过 TCR-CD3 复合体诱导 T 淋巴细胞活化<sup>[32]</sup>。高等脊椎动物的 CD4 分子胞内区的 CXC 基序前面还包括 di-leucine 基序,该基序参与抗原诱导的 CD4 分子内化,但是鱼类中缺失该基序<sup>[21]</sup>。

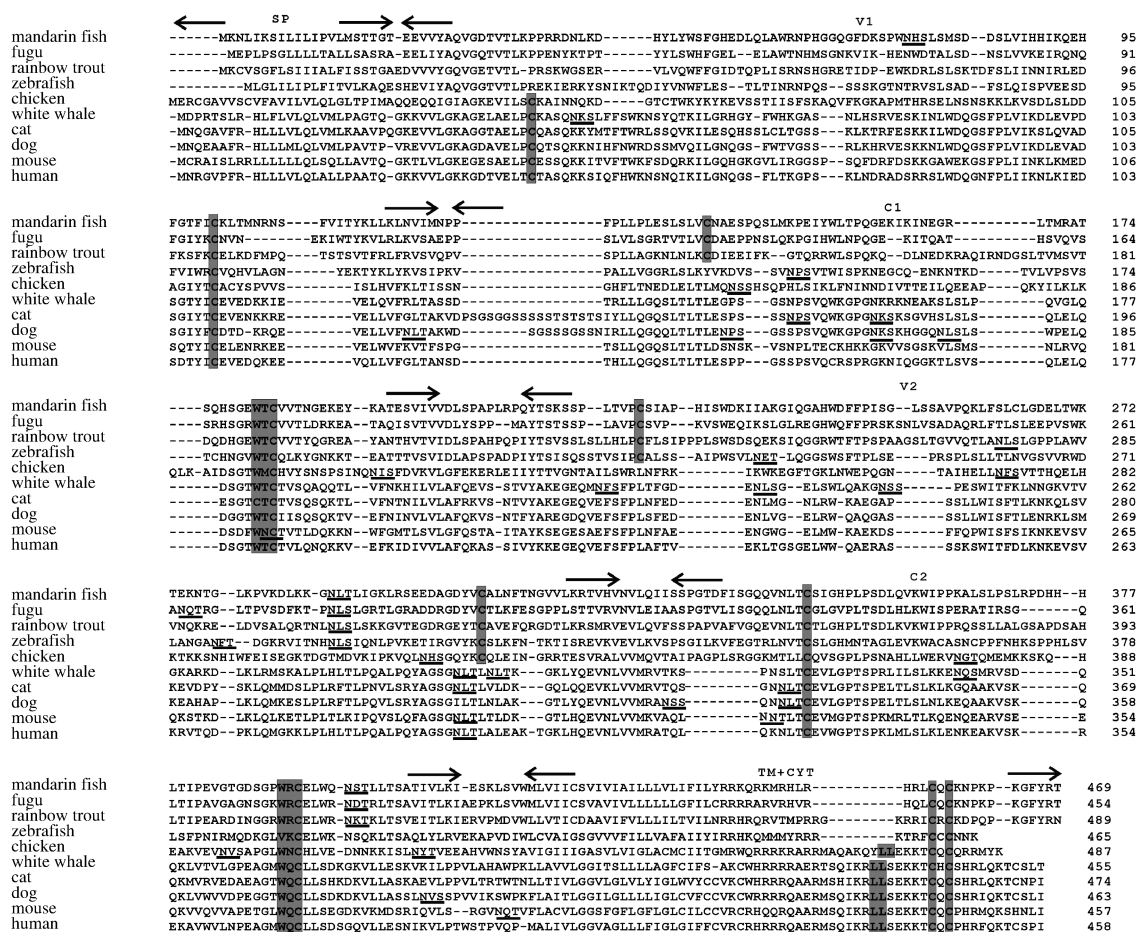


图 1 鳊 CD4 与其他物种 CD4 氨基酸序列比较

用于比较的 CD4 在 GenBank 中序列号分别为鳊 GU550706;红鳍东方鲀 AB164055;虹鳟 AY973030;斑马鱼 NM\_001135096;白鲟 AF071799;鸡 NM\_204649;猫 NM\_001009250;狗 NM\_001003252;小鼠 NM\_013488;人 NP\_000607。氨基酸之间的间隔采用“-”表示,保守氨基酸和基序用灰色突出显示,预测的 N-糖基化位点用下划线进行标示。

Fig. 1 Comparison of alignment of mandarin fish CD4 with other species

Alignment of mandarin fish CD4 with corresponding sequences from fugu (*Takifugu rubripes*) (AB164055), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (AY973030), zebrafish (*Danio rerio*) (NM\_001135096), white whale (*Delphinapterus leucas*) (AF071799), chicken (*Gallus gallus*) (NM\_204649), cat (*Felis catus*) (NM\_001009250), dog (*Canis lupus familiaris*) (NM\_001003252), mouse (*Mus musculus*) (NM\_013488) and human (*Homo sapiens*) (NP\_000607). Gaps are indicated by hyphens and conservation amino acids and regions are shaded in gray. N-glycosylation sites are underlined.

将鳊 CD4 分子与已知物种的 CD4 分子进行同一性比较,同一性从高到低依次为鲈 (*Takifugu rubripes*) (53%)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (43%)、斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*) (57%)、红鳍东方鲀 (39%)、鲤 (*Cyprinus carpio*) (34%) 等。基于

CD4 分子氨基酸序列构建的系统发育树显示,鳊 CD4 分子与鲈的 CD4 分子聚为一支,而七鳃鳗的 CD4 分子则处于进化树的根部,表明该分子可能是已知 CD4 分子的原始形式(图 2)。

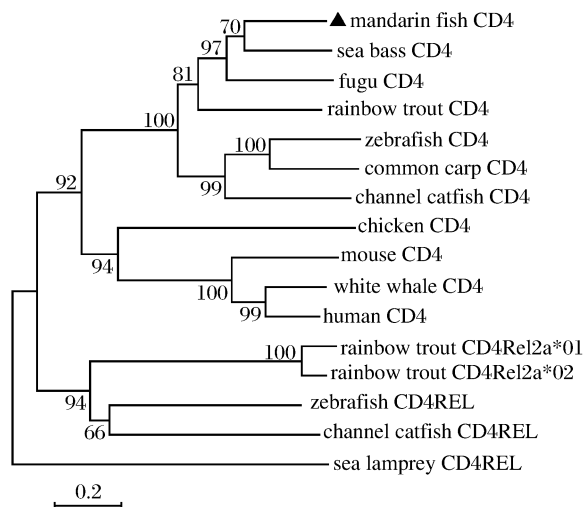


图 2 基于已知物种 CD4 分子的氨基酸序列构建的系统进化树

系统进化树中所用的序列在 GenBank 中的登录号分别是鲈 CD4 AM849811; 斑点叉尾鲷 CD4 DQ435301; 鲤 CD4 DQ400124; 虹鳟 CD4REL AY899931 和 AY772711; 斑马鱼 CD4REL NM\_001135137; 斑点叉尾鲷 CD4REL DQ435302; 七鳃鳗 AY686862。节点上的数字表示分支可信度的百分比(1000 bootstrap)。其它所用的序列为图 1 中用到的序列。

Fig. 2 Phylogenetic tree showing the relationship between the amino acid sequences of CD4 and CD4REL

The phylogram topology represented here replications for 1000 bootstrap iterations. The sequences were aligned by CLUSTALW2 program and the phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining methods using MEGA version 4.0. GenBank accession numbers: sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (AM849811); channel chatfish (*Ictalurus punctatus*) (DQ435301); common carp (*Cyprinus carpio*) (DQ400124); rainbow trout CD4REL (*Oncorhynchus mykiss*) (AY772711 and AY899931); sea lamprey CD4REL (*Petromyzon marinus*) (AY686862), other sequences used is the same with sequences of figure 1.

## 2.2 CD4 基因的表达

以梯度稀释的含有鳊  $\beta$ -actin 和目的基因的质粒建立标准曲线,设定鳊 CD4 在脾脏中的表达量为 1,根据 CD4 在各个组织中的相对表达量作柱形图。从图中可以看出,CD4 在胸腺中表达量较高;其次为肠、鳃、肝脏、头肾(图 3)。

以 LPS 刺激的 0 h 为对照组,刺激后 4 h 的

胸腺 CD4 mRNA 表达量显著上升( $P < 0.05$ ),8 h 后 CD4 在胸腺、脾脏和头肾中都有显著性的上调表达,但在肠道中的表达没有显著性差异,表明 LPS 作用于主要淋巴器官中的淋巴细胞(图 4)。

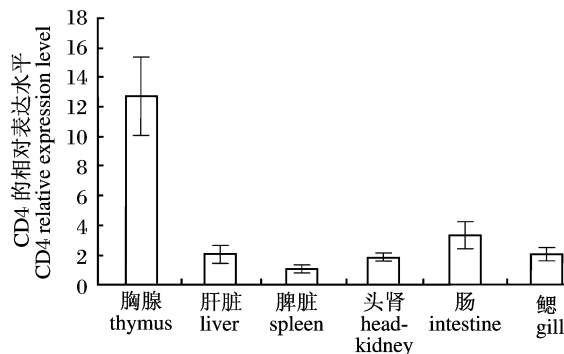


图 3 鳊 CD4 在不同组织/器官中的表达情况  
Fig. 3 The relative expression of mandarin fish CD4 gene in different tissues or organs

Expression levels of CD4 gene was calculated as a ratio relative to  $\beta$ -actin in the same sample of three individuals, and as fold expression based on spleen. Data were expressed as the mean  $\pm$  SD.

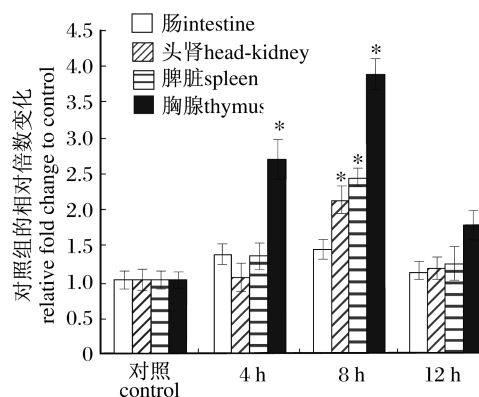


图 4 LPS 刺激后,CD4 在胸腺、脾脏和头肾中的表达情况

Fig. 4 The expression of CD4 at mRNA level in thymus, spleen and head kidney of mandarin fish following LPS stimulation

The data (mean  $\pm$  SD) were expressed as ratio relative to  $\beta$ -actin level and normalised against the 0 h control. Asterisks indicate the significant difference at  $P < 0.05$  with respect to control.

## 3 讨论

鳊 CD4 分子同大多数鱼类 CD4 分子一样,在其胞外区结构域中,除 V1 结构域外,其它 3 个结构域中都存在用于形成结构域内二硫键的 Cys 残基对。而鸟类和哺乳类 V1 结构域中都存在 2

个保守的 Cys 残基。也就是说,鱼类 CD4 分子 V1 结构域中不能形成二硫键。然而,在 C1 结构域中,大部分鱼类和人类的 Cys 高度保守,但是在白鲸、鸡、猫和狗中缺少一个 Cys 残基。Cys 残基的缺失意味着结构域内不能形成二硫键连接,这可能会改变不同物种 CD4 分子的构象<sup>[33-36]</sup>。由于 V1 与 C1 是 CD4 分子与 MHC II 分子在抗原识别过程中主要结合部位,不同 CD4 分子 V1 和 C1 的不同构象可能影响 CD4 分子与 MHC II 分子的结合。不同于哺乳动物和鸟类,鱼类中 V2 结构域中存在两个 Cys 残基,可形成一个额外二硫键,这可能导致鱼类 CD4 分子在构象上不同于高等脊椎动物的 CD4 分子<sup>[17]</sup>,当然这些都有待进一步的实验证明。在胞内区,CXC 基序在所有物种中都非常保守。表明鳊 CD4 同哺乳动物 CD4 一样,可结合 p56Lck 蛋白激酶而行使其功能。

小鼠 CD4 分子中存在 4 个 N-糖基化位点,只有当糖基化位点全部被糖基化后,CD4 分子才能正确折叠,表达于细胞膜上<sup>[37]</sup>。同时,糖基化在 T 淋巴细胞抗原识别方面也起到非常重要的作用<sup>[38]</sup>。鱼类 CD4 分子上存在多个 N-糖基化位点,而且在 V2 和 C2 结构域中存在的糖基化位点在所有物种中都非常保守<sup>[21]</sup>,表明所获得的鳊 CD4 分子与同哺乳动物的 CD4 分子具有相同或相似的功能。

利用 RT-PCR 技术检测鳊 CD4 基因的表达,发现其主要在胸腺中表达,表明胸腺是鱼类 T 细胞主要的发生、成熟和分化的场所。其次 CD4 基因在小肠和鳃中都有一定量的表达,而在脾脏中最低,这种表达模式同鲤很相近<sup>[19]</sup>,但是同红鳍东方鲀、斑点叉尾鮰和虹鳟不同<sup>[17-18,20]</sup>。硬骨鱼类肠道含有由淋巴细胞、巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞、浆细胞等构成的多种白细胞群<sup>[39]</sup>,其上层是 T 细胞主要聚集的场所<sup>[40-42]</sup>。鳃中也存在淋巴细胞、巨噬细胞、粒细胞、杯状细胞、上皮细胞,二者都具有一定抗原处理、提呈的功能,可产生一定的免疫反应<sup>[43]</sup>。CD4 分子在肠和鳃中的表达证实淋巴细胞(Th 细胞)存在于这些组织。LPS 刺激后,CD4 分子在胸腺、脾脏和头肾中都有显著性上调表达,表明这 3 个组织/器官都有为 T 淋巴细胞的存在,且具有功能性的 CD4 T 淋巴细胞的存在。

系统进化分析显示,鳊与鲈的 CD 分子聚在一起,他们都属于鲈形目鱼类。对鱼类的 CD4REL 分子的序列特征分析表明,CD4REL 与 CD4 分子具有很多的相同点,CD4 可能是 CD4REL 通过基因复制产生的<sup>[18]</sup>。尽管鳊与哺乳动物的 CD4 分子的氨基酸序列的同源性非常低,但是在用于糖基化和信号转导的氨基酸却非常保守,这说明鳊 CD4 T 淋巴细胞存在。CD4 分子是良好的 Th 细胞表面标志分子,本研究克隆到的鳊 CD4 分子,加上已经获得的 CD3 和 CD8 分子,为制备抗鳊 CD 分子的单克隆抗体,分析 T 淋巴细胞亚群的分类及不同亚群的功能提供了便利,也为更深层次地了解鱼类免疫系统,特别是 T 淋巴细胞的结构和功能打下了基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] BENOIST M, MATHIS D. T-lymphocyte differentiation and biology [ M ] // PAUL W E, Eds. Fundamental immunology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999:367 - 410.
- [ 2 ] JANKOVIC D, LIU Z, GAUSE W C. Th1-and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways [ J ]. Trends Immunology, 2001, 22(8):450 - 477.
- [ 3 ] MOEBIUS U, PALLAI P, HARRISON S C, *et al.* Delineation of an extended surface contact area on human CD4 involved in class II major histocompatibility complex binding [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(17):8259 - 8263.
- [ 4 ] NAKANISHI T, FISCHER U, DIJKSTRA J M, *et al.* Cytotoxic T cell function in fish [ J ]. Developmental & Comparative Immunology, 2002, 26(2):131 - 139.
- [ 5 ] CASTRO R, BERNARD D, LEFRANE M P, *et al.* T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, doi:10.1016/j.fsi.2010.08016.
- [ 6 ] TODA H, SAITO Y, KOIKE T, *et al.* Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish [ J ]. Developmental & Comparative Immunology, 2011, 35(6):650 - 660.
- [ 7 ] TODA H, SHIBASAKI Y, KOIKE T, *et al.* Alloantigen-specific killing is mediated by CD8 - positive T cells in fish [ J ]. Developmental & Comparative Immunology, 2009, 33(4):646 - 652.

- [ 8 ] FISCHER U, UTKE K, SOMAMOTO T, *et al.* Cytotoxic activities of fish leucocytes [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(2) : 209 – 226.
- [ 9 ] NAM B H, HIRONO I, AOKI T. The four TCR genes of teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese flounder ( *Paralichthys olivaceus* ) TCR alpha-, beta-, gamma-, and delta-chains [ J ]. *The Journal of Immunology*, 2003, 170 ( 6 ) : 3081 – 3090.
- [ 10 ] LIU Y, MOORE L, KOPPANG E O, *et al.* Characterization of the CD3 $\zeta$ , CD3 $\gamma/\delta$  and CD3 $\epsilon$  subunits of the T cell receptor complex in Atlantic salmon [ J ]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(1) : 26 – 35.
- [ 11 ] SHANG N, SUN X F, HU W, *et al.* Molecular cloning and characterization of common carp ( *Cyprinus carpio* L. ) TCR $\gamma$  and CD3 $\gamma/\delta$  chains [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24 ( 4 ) : 412 – 425.
- [ 12 ] OVERGÅRD A C, HORDVIK I, NERLAND A H, *et al.* Cloning and expression analysis of Atlantic halibut ( *Hippoglossus hippoglossus* ) CD3 genes [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27 ( 6 ) : 707 – 713.
- [ 13 ] PATEL S, OVERGÅRD A C, NERLAND A H. CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$  in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: cloning, characterization and gene expression during viral and bacterial infection [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25 ( 5 ) : 570 – 580.
- [ 14 ] XU S W, WU J Y, HU K S, *et al.* Molecular cloning and expression of orange-spotted grouper ( *Epinephelus coioides* ) CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$  genes [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30 ( 2 ) : 600 – 608.
- [ 15 ] XU T J, CHEN S L, JI X S, *et al.* Molecular cloning, genomic structure, polymorphism and expression analysis of major histocompatibility complex class II A and IIB genes of half-smooth tongue sole ( *Cynoglossus semilaevis* ) [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2) : 192 – 201.
- [ 16 ] YU S, AO J, CHEN X. Molecular characterization and expression analysis of MHC class II alpha and beta genes in large yellow croaker ( *Pseudosciaena crocea* ) [ J ]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37 ( 3 ) : 1295 – 1307.
- [ 17 ] SUETAKE H, ARAKI K, SUZUKI Y. Cloning, expression, and characterization of fugu CD4, the first ectothermic animal CD4 [ J ]. *Immunogenetics*, 2004, 56(5) : 368 – 374.
- [ 18 ] LAING K J, ZOU J J, PURCELL M K, *et al.* Evolution of the CD4 family: teleost fish possess two divergent forms of CD4 in addition to lymphocyte activation gene-3 [ J ]. *The Journal of Immunology*, 2006, 177(6) : 3939 – 3951.
- [ 19 ] SUN X F, SHANG N, HU W, *et al.* Molecular cloning and characterization of carp ( *Cyprinus carpio* L. ) CD8beta and CD4-like genes [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(6) : 1242 – 1255.
- [ 20 ] EDHOLM E S, STAFFORD J L, QUINIQU S M, *et al.* Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, CD4-like molecules [ J ]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31(2) : 172 – 187.
- [ 21 ] BUONOCORE F, RANDELLI E, CASANI D, *et al.* A CD4 homologue in sea bass ( *Dicentrarchus labrax* ): molecular characterization and structural analysis [ J ]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(11) : 3168 – 3177.
- [ 22 ] PATEL S, OVERGÅRD A C, NERLAND A H. A CD4 homologue in Atlantic halibut ( *Hippoglossus hippoglossus* ): molecular cloning and characterization [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26 ( 3 ) : 377 – 384.
- [ 23 ] DIJKSTRA J M, SOMAMOTO T, MOORE L, *et al.* Identification and characterization of a second CD4-like gene in teleost fish [ J ]. *Molecular Immunology*, 2006, 43(5) : 410 – 419.
- [ 24 ] ØVERGÅRD A C, NERLAND A H, PATEL S. Cloning, characterization, and expression pattern of Atlantic halibut ( *Hippoglossus hippoglossus* L. ) CD4-2, Lck, and ZAP-70 [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(6) : 987 – 997.
- [ 25 ] PANCER Z, MAYER W E, KLEIN J, *et al.* Prototypic T cell receptor and CD4-like coreceptor are expressed by lymphocytes in the agnathan sea lamprey [ J ]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101 ( 36 ) : 13273 – 13278.
- [ 26 ] TIAN J Y, SUN B J, LUO Y P, *et al.* Distribution of IgM, IgD and IgZ in mandarin fish, *Siniperca chuatsi* lymphoid tissues and their transcriptional changes after *Flavobacterium columnare* stimulation [ J ]. *Aquaculture*, 2009, 288(1–2) : 14 – 21.
- [ 27 ] ZHANG Y A, NIE P, WANG Y P, *et al.* cDNA sequence encoding immunoglobulin M heavy chain of the mandarin fish *Siniperca chuatsi* [ J ]. *Fish &*

- Shellfish Immunology, 2003, 14(5):477-480.
- [28] ZHANG Y A, NIE P, LUO H Y, *et al.* Characterization of cDNA encoding immunoglobulin light chain of the mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2003, 95(1-2):81-90.
- [29] SUN B J, NIE P. Molecular cloning of the viperin gene and its promoter region from the mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2004, 101(3-4):161-170.
- [30] SUN B J, WANG G L, XIE H X, *et al.* Gene structure of goose-type lysozyme in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with analysis on the lytic activity of its recombinant in *Escherichia coli* [J]. Aquaculture, 2006, 252(2-4):106-113.
- [31] SUN B J, XIE H X, SONG Y, *et al.* Gene structure of an antimicrobial peptide from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), suggests that moronecidins and pleurocidins belong in one family: the piscidins [J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(6):335-343.
- [32] VEILLETTE A, BOOKMAN M A, HORAK E M, *et al.* The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine protein kinase p56lck [J]. Cell, 1988, 55(2):301-307.
- [33] NORIMINE J, MIYAZAWA T, KAWAGUCHI Y, *et al.* A cDNA encoding feline CD4 has a unique repeat sequence downstream of the V-like region [J]. Immunology, 1992, 75(1):74-79.
- [34] MILDE K, CONNER G E, MINTZ D H, *et al.* Primary structure of a canine CD4 antigen [J]. Biochim et Biophysica Acta, 1993, 1172(3):315-318.
- [35] ROMANO T A, RIDWAY S H, FELTEN D L, *et al.* Molecular cloning and characterization of CD4 in an aquatic mammal, the white whale *Delphinapterus leucas* [J]. Immunogenetics, 1999, 49(5):376-383.
- [36] KOSKINEN R, LAMMINMAKI U, TREGASKES C A, *et al.* Cloning and modeling of the first nonmammalian CD4 [J]. The Journal of Immunology, 1999, 162(7):4115-4121.
- [37] 章晓联. 蛋白糖基化与免疫 [J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20(4):290-293.
- [38] PAULINE M R, TIM E, PETER C, *et al.* Glycosylation and the immune system [J]. Science, 2001, 291(5512):2370-2376.
- [39] GEORGOPOULOU U, VERNIER J M. Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules [J]. Developmental & Comparative Immunology, 1986, 10(4):529-537.
- [40] ABELLI L, PICCHIETRI S, ROMANO N, *et al.* Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1997, 7(4):235-245.
- [41] MCMILLAN D N, SECOMBES C J. Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1997, 7(8):527-541.
- [42] ROMANO N, ROSSI F, ABELLI L, *et al.* Majority of TcRbeta(+) T-lymphocytes located in the thymus and midgut of the bony fish, *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. Cell and Tissue Research, 2007, 329(3):479-489.
- [43] 巩华, 吴淑勤, 潘厚军. 硬骨鱼类黏膜免疫机理研究概况 [J]. 动物医学进展, 2006, 27(6):24-28.



## The cDNA sequence and expression analysis of CD4 in mandarin fish(*Siniperca chuatsi*)

GUO Zheng<sup>1,2</sup>, NIE Pin<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** The cDNA sequence of CD4 homologue was cloned from the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. It consists of 2 356 bp, encoding 469 amino acids, and this molecule has a typical four Ig-like domains (V1-C1-V2-C2) and shares some fundamental conserved structures, i. e. WTC motif in D2 domain, N-glycosylation site in D4 domain and the CXC motif in the cytoplasmic tail. Unlike avian and mammalian CD4 molecules, the mandarin fish CD4 sequence lacks the Cys pairs in the first Ig-like domain, but has a unique possible disulfide bond in the third domain. These differences suggest that mandarin fish CD4 molecule may have a different structure, which may in turn influence its binding with MHC II molecule and probably subsequent T-cell activation. The CD4 was expressed mainly in thymus, and following stimulation with LPS, its significant increase ( $P < 0.05$ ) at mRNA level was observed 8 hours post injection in thymus, spleen and head-kidney. The mandarin fish CD4 shared a relatively high level of similarity (57%) with that in sea bass *Dicentrarchus labrax*, and in the phylogenetic tree, the mandarin CD4 was clustered with that in sea bass. The cloning of CD4 in the mandarin fish may serve as a basis for further functional characterization of fish T lymphocytes.

**Key words:** mandarin fish (*Siniperca chuatsi*); T lymphocyte; CD4; expression

**Corresponding author:** NIE Pin. E-mail: pinnie@ihb.ac.cn