

尼罗罗非鱼 *Foxp1a/b* 的 cDNA 克隆及 表达模式研究

魏 静, 于林田, 周林燕, 张小萍, 王德寿*

(西南大学生命科学学院,淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室,重庆 400715)

摘要:为探讨低等脊椎动物 *Foxp1* 与免疫细胞活化及机体雌激素水平的相关性,本研究首次分离克隆了尼罗罗非鱼 *Foxp1* 的开放阅读框序列,并通过 Real-time PCR 对其 mRNA 表达水平进行检测。结果显示,尼罗罗非鱼具有 2 种不同基因编码的 *Foxp1* 分子,分别命名为 *OnFoxp1a* 与 *OnFoxp1b*; *OnFoxp1a* 为 1 710 bp,由 15 个外显子编码 569 个氨基酸,*OnFoxp1b* 为 2 040 bp,由 16 个外显子编码 679 个氨基酸;*OnFoxp1a/b* 均含有 Foxp 亚家族的特征性结构,即锌指结构、亮氨酸拉链样结构和叉状螺旋结构;与 *OnFoxp1a* 相比,*OnFoxp1b* 与高等脊椎动物 *Foxp1* 具有更近的亲缘关系。Real-time PCR 检测结果显示,*OnFoxp1a* 在精巢中有高水平表达,*OnFoxp1b* 在心脏中有高水平表达,同时在免疫相关组织如鳃、脾脏、肾脏、肠等均有中等水平表达;淋巴细胞多克隆刺激剂 PHA、PMA、LPS 刺激尼罗罗非鱼外周血单个核细胞(PBMC),结果显示,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA 和 50 ng/mL PMA 分别刺激 6、12、24 h 均显著增强 *OnFoxp1b* 的表达 ($P < 0.05$),20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 刺激后,*OnFoxp1b* 的表达出现先降低后升高的趋势 ($P < 0.05$);而 *OnFoxp1a* 的表达除 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA 刺激 24 h 后有所升高,其余均无显著变化 ($P > 0.05$);雌激素处理 6 月龄雄性尼罗罗非鱼 48 h,*OnFoxp1a/b* 在肠、肾脏中的表达显著上调 ($P < 0.05$),而脾脏中无显著变化 ($P > 0.05$)。综上所述,低等脊椎动物硬骨鱼类 2 种不同基因编码的 *Foxp1a/b* 均为哺乳动物 *Foxp1* 的同源分子,但其序列、结构特征、表达模式迥异,提示其功能发生歧化;同时两者的表达与淋巴细胞活化及机体雌激素水平密切相关。

关键词: 尼罗罗非鱼; *Foxp1*; 雌激素; 淋巴细胞

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

Foxp 是近年来备受关注的 Fox 亚家族成员,在脊椎动物的发育、生理、免疫等方面具有重要作用^[1-3]。哺乳动物研究显示,Foxp 由 4 个成员组成,即 *Foxp 1-4*。不同于多数其他 Fox 成员,Foxp 亚家族成员可以通过保守的锌指结构和亮氨酸拉链形成同源或异源二聚体,并以二聚体的形式行使转录调控功能^[3]。*Foxp1* 是最早分离的 Foxp 亚家族成员,是小鼠心脏、脑、肾脏、肠、性腺等发育的重要调控因子^[4-5]。研究显示,*Foxp1* 可通过抑制 IL-7 受体 α 链的表达或结合 Erag 增

强子,调节 T、B 细胞的发育,同时 *Foxp1* 的表达直接与弥漫大 B 细胞淋巴瘤的发生及预后密切相关^[6-9],从而表明 *Foxp1* 在免疫系统的发育及功能发挥方面具有重要作用;此外,有研究显示,雌激素水平与 *Foxp1* 表达水平存在明显正相关,提示 *Foxp1* 可通过雌激素等内分泌干扰物参与机体调节过程^[10-13]。

低等脊椎动物硬骨鱼类是同时拥有天然免疫与特异性免疫的最原始脊椎动物。目前,仅在斑马鱼 (*Danio rerio*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon*

收稿日期:2015-04-08 修回日期:2015-09-09

资助项目:国家自然科学基金(31201979,31201986);重庆市自然科学基金(cstc2012jjA80041,cstc2012jjA80005)

通信作者:王德寿,E-mail:wadeshou@swu.edu.cn

idella)中分离鉴定了2种具有不同编码阅读框的 *Foxp1* 基因,分别命名为 *Foxp1a/b* [14-15]。尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 隶属鲈形目 (Perciformes)、丽鱼科 (Cichlidae),食性杂,生长快,对环境因子耐受能力强,是联合国粮农组织向世界各国推荐的优良养殖对象及我国农业部重点推广的水产养殖主导品种之一。然而,目前对罗非鱼免疫方面的相关研究极其匮乏,除 *Foxp3* 外,尚未见 *Foxp* 亚家族成员的相关报道 [16-17]。在低等脊椎动物硬骨鱼类,*Foxp1* 是否参与了机体的免疫相关过程,雌激素等内分泌干扰物是否参与其表达调控,目前均待进一步研究。该研究拟分离、鉴定尼罗罗非鱼 *Foxp1* 的 cDNA 序列,并在检测其组织表达模式基础上,探讨其与免疫细胞活化及机体雌激素水平的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

尼罗罗非鱼于2007年从日本国立基础生物学研究所引进,在西南大学(重庆北碚)本实验室培育建系,饲养于26℃循环水中。

RNA提取试剂 RNAiso Plus、第一链 cDNA 合成试剂盒、Real-time PCR 试剂盒 (SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, Perfect Real Time)、Taq 酶、DNase I (RNase free)、pMD-19T 载体购自 TaKaRa 公司, Smart[™] Race cDNA Amplification kit 试剂盒购自 Clontech 公司(美国),胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司(美国),大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存,本研究用 PCR 引物由上海英骏生物技术公司(中国)合成,PHA、LPS、PMA、雌激素 (17 β -estradiol, E₂) 购自 Sigma 公司(美国),胎牛血清、1640 培养基购自 Gibco 公司(美国),鱼淋巴细胞分离液购自天津 TBD 公司(中国)。

1.2 方法

cDNA 克隆 分析本实验室构建的尼罗罗非鱼性腺转录组数据,获得 *Foxp1* 的编码区序列,结合 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公布序列进行 Blast 分析,设计其特异性引物(表1),然后以尼罗罗非鱼脾脏 cDNA 为模板,通过 Real-time (RT-PCR) 获得 *Foxp1a/b* 开放阅读框序列,PCR 产物经胶回收后,用 T₄ 连接酶将其与 pMD-19T 进行连接,转染大肠杆菌 DH5 α ,经菌落 PCR,挑选阳性克隆送北京华大基因研究中心测序验证其正

确性。

序列分析用 PredictProtein Program (<http://www.expasy.org/tools>) 进行蛋白结构预测,用 ClustalW 及 Genedoc 进行氨基酸序列多重序列比对,用 MegAlign 进行氨基酸一致性分析,用 MEGA 5.0 中的 Neighbour-Joining 进行系统进化树的构建。

组织表达模式 根据测序得到的序列,设计 *Foxp1a/b* 基因特异性引物用于组织表达模式的检测(表1)。取性成熟的雌、雄罗非鱼不同的组织放入液氮中,最后于 -80℃ 保存。组织材料包括脑、鳃、心脏、脾脏、肝脏、肠、卵巢、精巢、肾脏、头肾、肌肉。按照 RNAiso PLUS 操作说明进行 RNA 提取。在提取上述组织总 RNA 过程中用 DNase I 处理以避免基因组 DNA 的污染,取 1 μ g RNA 并用基因特异引物扩增,作为阴性对照,理论上不能扩增出任何条带,并以此作为基因组 DNA 处理质量的参照,另取总 RNA (约 500 ng) 反转录合成 cDNA,然后通过 RT-PCR 检测 *Foxp1a/b* 在各组织中的表达情况。

淋巴细胞多克隆刺激剂刺激外周血单个核细胞 (peripheral blood mononucleated cells, PBMCs)

用准备有肝素抗凝剂(约 300 IU/mL)的注射器从尼罗罗非鱼(已用 75% 酒精擦洗)尾静脉抽取外周血,加入等量组织稀释液稀释;移液管吸取上述稀释血 3 mL,沿着试管壁缓慢叠加于等体积的鱼淋巴细胞分离液(密度 1.080)上,二者形成明显界面;2 000 r/min 水平离心 20~30 min,吸取中间白色雾状的单个核细胞层至新的离心管,加入 5 倍以上体积的 PBS 洗涤,重复 2 次,用 1 mL 1640 培养基(含 10% 的胎牛血清)重悬沉淀,吹打混匀后,取少许细胞计数,调整细胞浓度至 1 \times 10⁶ cells/mL;以 1 mL/孔接种于 24 孔板,于 28℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,分别加入 50 μ g/mL PHA、20 μ g/mL LPS、50 ng/mL PMA 刺激细胞,分别于 6、12、24 h 后收集细胞,每个样品做 3 个重复,同上合成 cDNA,用于 RT-PCR 检测,同时以未刺激组为阴性对照。

体内 E₂ 水平对 *Foxp1a/b* mRNA 表达的影响用 100 ng E₂ (溶解于香油,浓度为 2 ng/mL) 腹腔注射 6 月龄雄性尼罗罗非鱼,对照组腹腔注射等量芝麻油,48 h 后取脾脏、肠及肾脏组织,提取总 RNA,反转成 cDNA,用于 RT-PCR 检测的模板。

RT-PCR 所用引物根据软件 Primer Premier 5.0 进行设计,引物跨内含子,防止基因组污染(表 1)。每对引物的特异性均经 RT-PCR 验证,RT-PCR 在 ABI 公司的 Step one Plus (美国)上完成。反应体系:20 μ L PCR 反应液包括 1 μ L cDNA 模板,10 μ L SYBR Green Mix,各 0.3 μ L 的引物和 8.4 μ L H₂O。反应条件是:95 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后,94 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40

个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,溶解曲线从 65 $^{\circ}$ C 至 95 $^{\circ}$ C,每 5 s 上升 0.5 $^{\circ}$ C。mRNA 的相对丰度由公式 $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。数据以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。

1.3 数据处理

用 SPSS 13.0 软件中单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 方法进行显著性差异分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著。

表 1 本研究所用引物名称和序列

Tab.1 The names and sequences of primers used in the present study

引物名称 primer names	序列 sequences	目的 purpose
Tila-Foxp1a-ORF-F1	ATGCATGAGTCTCGGTCAGATC	ORF amplification
Tila-Foxp1a-ORF-R1	TCAGAGGGAAGGCACACGGTC	
Tila-Foxp1b-ORF-F1	ATGATGCAAGAATCTGGGACGGAG	
Tila-Foxp1b-ORF-R1	TTACAGCATGTCTCGTGGCC	
Tila-Foxp1a-RT-F1	TCCAGTCAACAATCTACCACCAA	Real-time PCR
Tila-Foxp1a-RT-R1	CAGCGGACCACTGTCTTTCC	
Tila-Foxp1b-RT-F1	ATGATGACGCACCTTCATGT	
Tila-Foxp1b-RT-R1	TACTAGGTTGAGCGGCTGTG	
Tila- β -actin -F	GGCATCACACCTTCTACAACGA	
Tila- β -actin -R	ACGCTCTGTCAGGATCTTCA	

2 结果

2.1 *OnFoxp1a/b* 序列及其分析

采用生物信息学分析与 RT-PCR,克隆得到 *OnFoxp1a* 开放阅读框 1 710 bp,编码 569 个氨基酸(图 1-a); *OnFoxp1b* 开放阅读框 2 040 bp,编码 679 个氨基酸(图 1-b)。基因组结构分析显示, *OnFoxp1a/b* 位于基因组的不同位置, *OnFoxp1a* 位于基因组 chrLG20,大小为 8.055 kb,由 15 个外显子组成(图 1-a); *OnFoxp1b* 位于基因组 chrLG5,大小为 75.938 kb,由 16 个外显子组成,除 N 端的锌指结构前比 *OnFoxp1a* 多一个外显子之外,其余基因结构两者类似(图 1-b)。

蛋白质结构预测及多重序列比对结果显示, *OnFoxp1a/b* 均含有 Foxp 亚家族的特征性结构,即高度保守的锌指结构、亮氨酸拉链样结构和叉状螺旋结构,与此同时, *OnFoxp1b* 的 N 端拥有短的多聚谷氨酸结构及 PLNLV 的超二级结构(图 1,2)。氨基酸序列一致性分析结果显示, *OnFoxp1a/b* 之间的一致度仅为 54.5%, *OnFoxp1a* 与其他动物 Foxp1 一致度在 55.0% 左右,而 *OnFoxp1b* 与其他高等脊椎动物 Foxp1 一致度却高达 77.4% 以上(图 2)。

系统进化分析显示, *OnFoxp1a/b* 与斑马鱼 Foxp1a/b 分别聚为 2 个不同的分类亚枝,然后进一步与其他物种的 Foxp1 聚为一枝,最后与 Foxp 亚家族的其他几个成员 (Foxp1/2/4) 各聚为不同的分类枝(图 3)。从系统进化树分析结果显示, *OnFoxp1a* 与 *OnFoxp1b* 均为高等脊椎动物 Foxp1 的同源分子,但鱼类 Foxp 在其与四足类动物分离之前就发生了复制,其中 *OnFoxp1b* 与高等脊椎动物 Foxp1 具有更近的亲缘关系(图 3)。

2.2 *OnFoxp1a/b* 的组织分布

RT-PCR 检测结果显示, *OnFoxp1a/b* 几乎在所有组织中均有表达,其中 *OnFoxp1a* 在精巢中的表达水平最高,头肾中的表达水平最低,中等表达水平的是脑和卵巢,其次是肾脏和肝脏(图 4-a); *OnFoxp1b* 在心脏中的表达水平最高,肌肉和头肾中的表达水平最低,中等表达水平的是肾脏、肝脏、脑和卵巢,其次是鳃、肠、脾脏和精巢(图 4-b)。

2.3 淋巴细胞多克隆刺激剂刺激 PBMCs 后 *OnFoxp1a/b* 的表达

淋巴细胞多克隆刺激剂 PHA、LPS、PMA 刺激尼罗罗非鱼 PBMCs,不同时间后 RT-PCR 检测 *OnFoxp1a/b* 的 mRNA 表达水平,结果表明,除

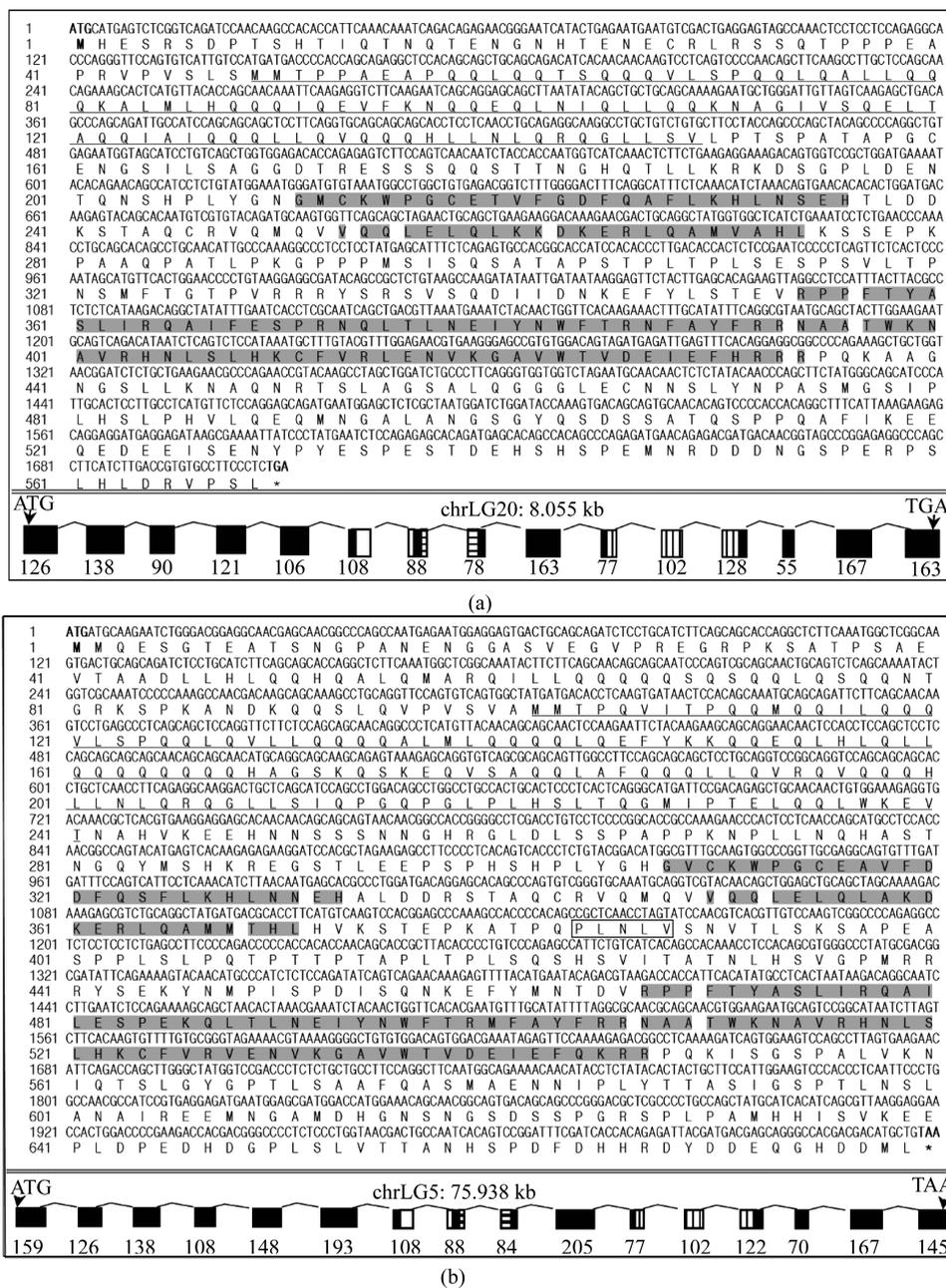


图 1 *OnFoxp1a* (a) 与 *OnFoxp1b* (b) 序列及基因组结构

蛋白结构域用 PredictProtein Program (<http://www.PredictProtein.org>) 预测。序列框中的锌指结构域、亮氨酸拉链链结构域、叉状螺旋结构域用灰色底纹标出 (a,b), C 末端结合蛋白 1 的超二级结构用方框框出 (b); 序列框下方为该基因的基因组结构示意图 (a, b), 其中条形框, 编码序列, 外显子大小在条形框下方显示, 所在基因组位置及其大小在条形框上方显示, 锌指结构域, 亮氨酸拉链结构域, 叉状螺旋结构的编码序列分别用无填充、横纹、竖纹条形框标出

Fig. 1 The sequences and genomic structures of *OnFoxp1a* (a) and *OnFoxp1b* (b)

The protein domains are predicted by the Predict Protein Program (<https://www.predictprotein.org/>). The ZnF_C2H2 domain, the Leucine zipper-like domain and FKH domain are shaded (a,b), and the conserved motif (PLNLV) that could bind CtBP1 is boxed (b); the genomic structure diagram of *OnFoxp1a/b* is below the sequence box. Rectangles indicate coding sequences. Exon size in base pair is designated below each exon, and the genomic location and size in kilobase is indicated above the rectangles. The coding sequences of ZnF_C2H2 domain, Leucine-zipper liked domain and FKH domain are illustrated as no-filling, vertical-grey-filling rectangles, respectively

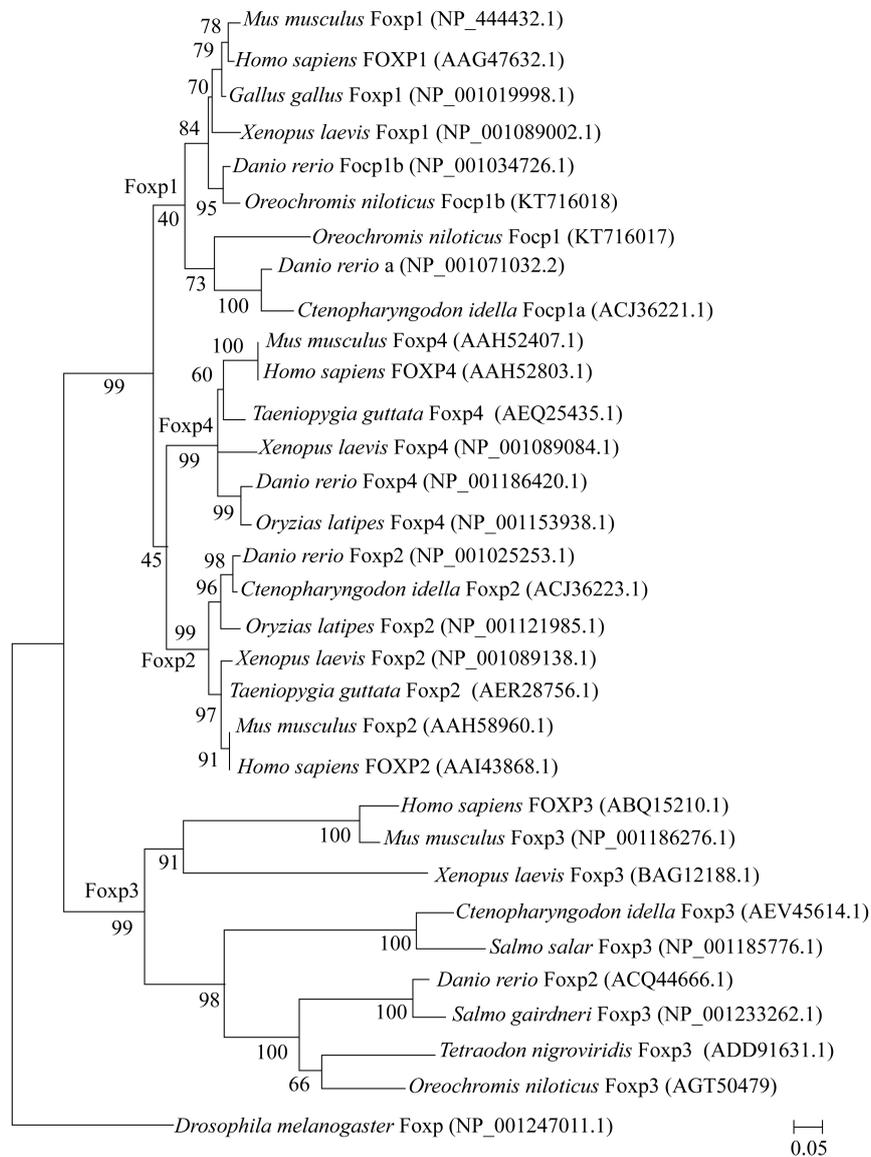


图 3 脊椎动物 Foxp 亚家族成员的系统进化分析

用 MEGA 5.0 软件中的 Neighbor-Joining 构建。线的长度与该物种到分支点的进化距离成正比。人, *Homo sapiens*; 小鼠, *Mus musculus*; 鸡, *Gallus gallus*; 非洲爪蟾, *Xenopus laevis*; 斑马鱼, *Danio rerio*; 尼罗罗非鱼, *Oreochromis niloticus*; 草鱼, *Ctenopharyngodon idella*; 斑胸草雀, *Taeniopygia guttata*; 青鳉, *Oryzias latipes*; 大西洋鲑, *Salmo salar*; 黑青斑河豚, *Tetraodon nigroviridis*; 虹鳟, *salmo gairdeneri*; 黑腹果蝇, *Drosophila melanogaster*

Fig. 3 Phylogenetic tree of Foxp subfamily members from vertebrates

The tree was constructed using the neighbor-joining method within the MEGA5.0 program. Node values represent percent bootstrap confidence derived from 20 000 replicates. The GenBank accession number follows the gene name of the organism. Human, *Homo sapiens*; mouse, *Mus musculus*; chicken, *Gallus gallus*; frog, *Xenopus laevis*; zebrafish, *Danio rerio*; Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*; grass carp, *Ctenopharyngodon idella*; zebra finch, *Taeniopygia guttata*; medaka, *Oryzias latipes*; Atlantic salmon, *Salmo salar*; pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*; rainbow trout, *salmo gairdeneri*; fruitfly, *Drosophila melanogaster*

肠、肾脏中的 *OnFoxp1a/b* 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。值得注意的是,脾脏中的 *OnFoxp1a/b* 表达水平均无显著差异 ($P > 0.05$) (图 6-a, b)。

3 讨论

低等脊椎动物硬骨鱼类是同时拥有天然免疫和特异性免疫的最原始脊椎动物,在研究免疫分

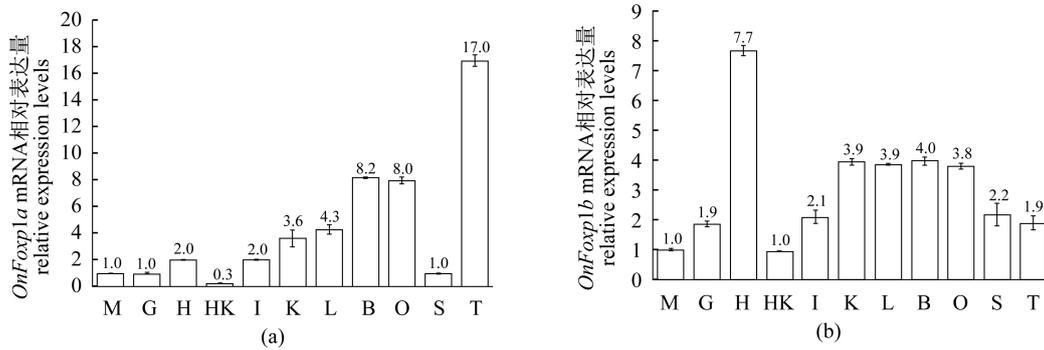


图 4 *OnFoxp1a* (a) 和 *OnFoxp1b* (b) 在不同组织中的 mRNA 表达水平

mRNA 表达水平用 RT-PCR 测量,并用 $\Delta\Delta Ct$ 法进行计算,组别上的数值表示 mRNA 的相对值。实验结果以平均值 \pm 标准误 ($n = 3$) 表示。M,肌肉; G,鳃; H,心脏; HK,头肾; I,肠; K,肾脏; L,肝脏; B,脑; O,卵巢; S,脾脏; T,精巢

Fig. 4 The mRNA expression levels of *OnFoxp1a* (a) and *OnFoxp1b* (b) in different tissues

The mRNA expression levels of *OnFoxp1a/b* were quantified by Real-time PCR using $\Delta\Delta Ct$ calculations. The values were given as the average \pm SEM ($n = 3$) and indicated at individual groups. M, muscle; G, gill; H, heart; HK, head kidney; I, intestine; K, kidney; L, liver; B, brain; O, ovary; S, spleen; T, testis

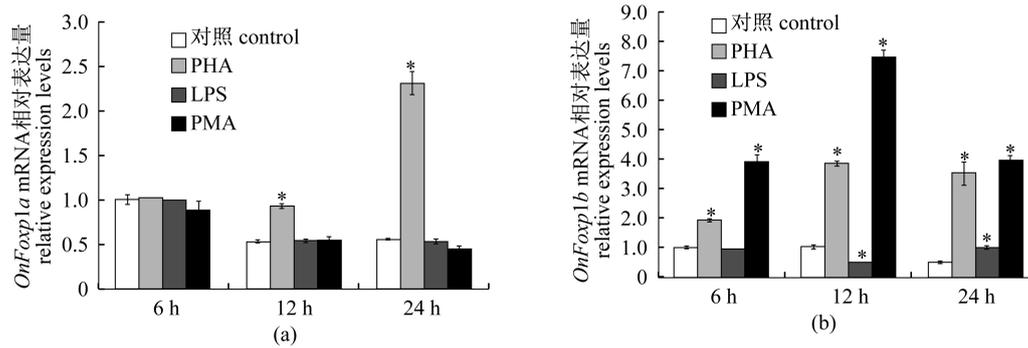


图 5 淋巴细胞多克隆刺激剂刺激 PBMCs 后 *OnFoxp1a* (a) 和 *OnFoxp1b* (b) mRNA 表达水平

PHA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 PMA (50 ng/mL) 刺激 PBMCs,在 6、12、24 h 后分别用 RT-PCR 进行检测,实验结果以平均值 \pm 标准误 ($n = 3$) 表示,星号表示与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 5 The mRNA expression levels of *OnFoxp1a* (a) and *OnFoxp1b* (b) in

PBMCs with or without lymphocyte polyclonal activators

Freshly prepared PBMCs were stimulated with PHA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or PMA (50 ng/mL) for 6, 12 and 24 h. The expression levels of *Foxp1b* were quantified by Real-time PCR. The results represented the average \pm SEM ($n = 3$). Stars indicated significant differences from the control at $P < 0.05$

子的系统进化方面占有特殊地位,与此同时,研究显示,在大约 350 万年前,鱼类发生了特异的第 3 次基因组复制,从而在多数基因家族中,鱼类中的基因成员明显多于高等脊椎动物^[18-19]。在本研究中,我们从尼罗罗非鱼中分离、鉴定了 2 个不同基因编码的 *Foxp1* 分子,分别命名为 *OnFoxp1a*、*OnFoxp1b*。从蛋白结构、序列比对、系统进化分析等方面均显示,*OnFoxp1a/b* 同为高等脊椎动物 *Foxp1* 的同源分子,但 *OnFoxp1a* 与 *OnFoxp1b* 在

序列、结构特征、表达谱等方面均存在明显差异,提示两者的功能可能发生了歧化,其中 *OnFoxp1b* 与哺乳动物具有更近的亲缘关系,可能具有哺乳动物同源分子的类似功能。

人的 *Foxp1* 位于染色体 7q31 位点,编码 715 个氨基酸,除含有 *Foxp* 亚家族的特征性结构(锌指结构、亮氨酸链样结构和叉状螺旋结构)外,还含有多聚谷氨酸结构域及 PLNLV 的超二级结构,这 2 个结构域与 *Foxp1* 的转录抑制调控功能

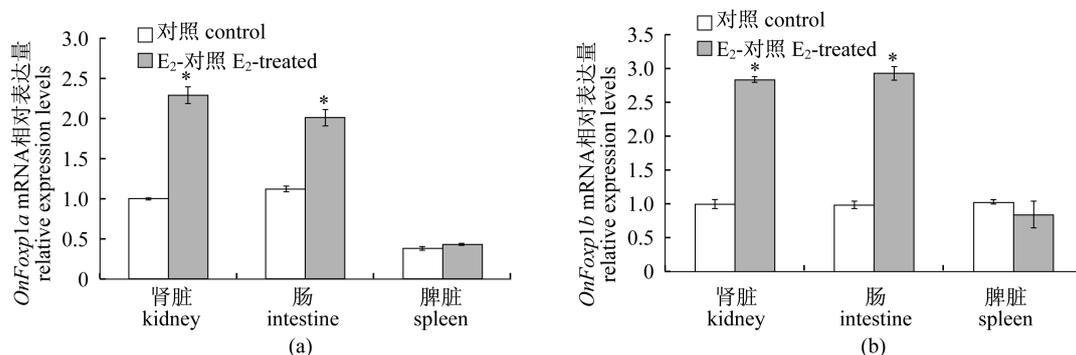


图6 体内 E₂ 水平对 *OnFoxp1a* (a) 和 *OnFoxp1b* (b) mRNA 表达影响

用 100 ng E₂ 腹腔注射 6 月龄雄性罗非鱼(XY), 对照组注射等量芝麻油, 48 h 后 Real-time PCR 检测肾脏、肠和脾脏中 *OnFoxp1a/b* 的表达, 实验结果以平均值 ± 标准误 ($n=3$) 表示, 组别上星号表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 6 E₂ on the mRNA expression levels of *OnFoxp1a* (a) and *OnFoxp1b* (b) *in vivo*

After 6-month-old males were administrated with 100 ng E₂ or the same volume sesame as the control, the mRNA expression levels of *OnFoxp1a* (a) and *OnFoxp1b* (b) in kidney, intestine and spleen were examined by Real-time PCR. The values were given as the average ± SEM ($n=3$). Data presented were representative results from three individual experiments. Groups denoted by stars represent significant difference at $P < 0.05$

密切相关^[4,20-21]。蛋白结构及序列比对分析结果显示, *OnFoxp1b* 而非 *OnFoxp1a* 拥有短的多聚谷氨酸结构及 PLNLV 的超二级结构, 提示 *OnFoxp1b* 而非 *OnFoxp1a* 可能具有与哺乳动物类似的转录抑制调控作用。

大量研究表明, 哺乳动物 Foxp1 参与了单核细胞、T 细胞、B 细胞的发育, 其表达与弥散大 B 细胞淋巴瘤等密切相关^[8,22-24]。研究显示, Foxp1 通过抑制 IL-7 受体 α 链的表达, 使初始 T 细胞维持在静息状态, 其缺陷可引起 T 细胞活化分子 CD44 表达上调, 发生增殖并产生相应的细胞因子, 最后发生凋亡^[22,24]; 同时 Foxp1 可结合 Erag 增强子, 特异性抑制 B 细胞免疫球蛋白重链 V 区基因片段的重排, 其缺陷可导致早期 B 细胞发育障碍, 胚胎肝细胞 B 细胞谱系基因 B220 表达下调, 原 B 细胞到前 B 细胞转换障碍, *Rag1/2* 表达下调^[8,23-24]; 在单核细胞分化至巨噬细胞的过程中, Foxp1 可抑制 *C-fms* 的表达, 从而抑制单核细胞向巨噬细胞、树突状细胞方向的分化^[25]。低等脊椎动物硬骨鱼类 Foxp1 分子是否参与了机体的免疫相关过程, 值得进一步探讨。在本研究中, 组织分布检测结果显示, *OnFoxp1a/b* 在免疫相关组织均有表达, 且 *OnFoxp1b* 明显高于 *OnFoxp1a*, 提示 *OnFoxp1b* 与机体的免疫细胞活化具有更为密切的相关性。众所周知, 植物血凝素 (PHA) 及佛波醇酯 (PMA) 通常为哺乳动物 T

淋巴细胞的多克隆刺激剂, 可分别作用于 TCR-CD3 复合体及细胞活化信息传导通路上的蛋白激酶 C, 引起多克隆的 T 淋巴细胞活化; LPS 通常为 B 淋巴细胞的多克隆刺激剂^[16]。大量研究显示, 硬骨鱼类同样拥有引起特异性免疫应答的 T、B 淋巴细胞亚群, PHA、PMA 可引起 T 细胞的活化、增殖, 而 LPS 可引起 B 细胞的活化、增殖。在本研究中, PHA、PMA、LPS 均可调节 *OnFoxp1b* 的表达, 特别是 PHA、PMA 在刺激 6 h 后即可显著增强其 mRNA 水平的表达。上述研究结果提示, 低等脊椎动物硬骨鱼类 Foxp1 同样参与了机体免疫细胞的活化过程。

大量研究表明, 雌激素等内分泌干扰物除了影响生物体的生殖发育, 还对其免疫功能具有明显影响。研究显示, 雌激素可明显上调人乳腺癌细胞系 MCF-7 的 *Foxp1* mRNA 表达, 同时在多种细胞系和肿瘤细胞中都检测到了 *Foxp1* 和 ER 的共表达, 表明在乳腺癌等细胞中 *Foxp1* 的表达受到了雌激素的调控^[10-13]。在本研究中, 雌激素处理 6 月龄雄性尼罗罗非鱼 48 h, 其肠、肾脏中的 *OnFoxp1a/b* 均显著上调, 而脾脏中的表达未显著变化, 提示在低等脊椎动物硬骨鱼类 *Foxp1* 的表达同样受到雌激素的调控, 而不同组织中的表达变化差异是否与机体不同组织中雌激素受体的分布及表达量的差异有关, 尚待进一步探讨。

参考文献:

- [1] DasGupta S, Ferreira C H, Miesenbock G. FoxP influences the speed and accuracy of a perceptual decision in *Drosophila* [J]. *Science*, 2014, 344 (6186) :901 – 904.
- [2] Schon C, Wochnik A, Rossner A, *et al.* The FoxP subclass in *Xenopus laevis* development [J]. *Development Genes and Evolution*, 2006, 216 (10) : 641 – 646.
- [3] Takahashi H, Takahashi K, Liu F C. FOXP genes, neural development, speech and language disorders [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2009, 665 :117 – 129.
- [4] Banham A H, Beasley N, Campo E, *et al.* The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p [J]. *Cancer Research*, 2001, 61 (24) :8820 – 8829.
- [5] Tamura S, Morikawa Y, Iwanishi H, *et al.* Foxp1 gene expression in projection neurons of the mouse striatum [J]. *Neuroscience*, 2004, 124 (2) : 261 – 267.
- [6] Hu C R, Wang J H, Wang R, *et al.* Both FOXP1 and p65 expression are adverse risk factors in diffuse large B-cell lymphoma: A retrospective study in China [J]. *Acta histochemica*, 2013, 115 (2) : 137 – 143.
- [7] Yu B, Zhou X, Li B, *et al.* FOXP1 expression and its clinicopathologic significance in nodal and extranodal diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Annals of Hematology*, 2011, 90 (6) :701 – 708.
- [8] Hu H, Wang B, Borde M, *et al.* Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development [J]. *Nature Immunology*, 2006, 7(6) :819 – 826.
- [9] Walker M P, Stopford C M, Cederlund M, *et al.* FOXP1 potentiates Wnt/beta-catenin signaling in diffuse large B cell lymphoma [J]. *Science Signaling*, 2015, 8 (362) :ra12.
- [10] Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, *et al.* FOXP1 and estrogen signaling in breast cancer [J]. *Vitamins & Hormones*, 2013, 93 :203 – 212.
- [11] Shigekawa T, Ijichi N, Ikeda K, *et al.* FOXP1, an estrogen-inducible transcription factor, modulates cell proliferation in breast cancer cells and 5-year recurrence-free survival of patients with tamoxifen-treated breast cancer [J]. *Hormones & Cancer*, 2011, 2 (5) :286 – 297.
- [12] Hu Z, Zhu L, Tan M, *et al.* The expression and correlation between the transcription factor FOXP1 and estrogen receptors in epithelial ovarian cancer [J]. *Biochimie*, 2015, 109 :42 – 48.
- [13] Fox S B, Brown P, Han C, *et al.* Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated with estrogen receptor alpha and improved survival in primary human breast carcinomas [J]. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10(10) :3521 – 3527.
- [14] Cheng L, Chong M, Fan W, *et al.* Molecular cloning, characterization, and developmental expression of foxp1 in zebrafish [J]. *Development Genes and Evolution*, 2007, 217(10) :699 – 707.
- [15] Yang M, Wang Y, Wang X, *et al.* Characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Foxp1a/1b/2: Evidence for their involvement in the activation of peripheral blood lymphocyte subpopulations [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28 (2) :289 – 295.
- [16] Wei J, Yu L T, Sun L N, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of Foxp3 from Nile tilapia [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 155 (1 – 2) :48 – 56.
- [17] Jia C, Zhou Y, Huang X, *et al.* The cellular protein expression of Foxp3 in lymphoid and non-lymphoid organs of Nile tilapia [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2) :300 – 306.
- [18] Sano K, Kawaguchi M, Watanabe S, *et al.* Neofunctionalization of a duplicate hatching enzyme gene during the evolution of teleost fishes [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2014, 14 :221 – 235.
- [19] Wang D S, Zhou L Y, Kobayashi T, *et al.* Doublesex- and Mab-3-Related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(3) :1331 – 1340.
- [20] Bacon C, Rappold G A. The distinct and overlapping phenotypic spectra of FOXP1 and FOXP2 in cognitive disorders [J]. *Human Genetics*, 2012, 131 (11) :1687 – 1698.
- [21] Li S R, Weidenfeld J, Morrissey E E. Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(2) :809 – 822.
- [22] Feng X, Ippolito G C, Tian L, *et al.* Foxp1 is an essential transcriptional regulator for the generation of quiescent naive T cells during thymocyte development [J]. *Blood*, 2010, 115(3) :510 – 518.
- [23] Sagardoy A, Martinez-Ferrandis J I, Roa S, *et al.* Downregulation of FOXP1 is required during

- germinal center B-cell function[J]. *Blood*, 2013, 121 (21): 4311–4320.
- [24] Feng X, Wang H, Takata H, *et al.* Transcription factor Foxp1 exerts essential cell-intrinsic regulation of the quiescence of naive T cells [J]. *Nature Immunology*, 2011, 12(6): 544–550.
- [25] Shi C, Sakuma M, Mooroka T, *et al.* Down-regulation of the forkhead transcription factor Foxp1 is required for monocyte differentiation and macrophage function [J]. *Blood*, 2008, 112 (12): 4699–4711.

Molecular cloning and expression analysis of *Foxp1a/b* from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

WEI Jing, YU Lintian, ZHOU Linyan, ZHANG Xiaoping, WANG Deshou*

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: To investigate whether the mRNA expression of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Foxp1a and Foxp1b are involved in the lymphocyte activation and regulated by 17 β -estradiol (E2) level in vivo, the coding sequences and mRNA expression patterns of *OnFoxp1a* and *OnFoxp1b* were characterized and analyzed by Real-time PCR. *OnFoxp1a* has an open reading frame 1 710 bp encoding 569 aa, while *OnFoxp1b* with 2 040 bp encoding 679 aa. Both of the putative OnFoxp1a/b contain a C2H2 zinc finger domain, a leucine zipper-like domain (V-x(6)-L-x(6)-L-x(6)-L) and a winged-helix/fork head domain, which are typical motifs of Foxp subfamily. Compared with OnFoxp1a, OnFoxp1b shows a higher amino acid identity (77.4% versus 55.0%) to mammalian Foxp1. Phylogenetic analysis reveals that OnFoxp1a/b together with the other known vertebrate Foxp1 form a different clade from Foxp2, Foxp3 and Foxp4. Meanwhile, OnFoxp1a/b separately form a fish-specific clade and OnFoxp1b is further clustered with Foxp1 from the higher vertebrates, which supports that OnFoxp1b has a closer relationship with mammalian Foxp1. The expressions of *OnFoxp1a/b* were detectable in all examined tissues. The highest mRNA expression of *OnFoxp1a* was observed in the testis, while *OnFoxp1b* in the heart. Moreover, the moderate expression of *OnFoxp1b* was also observed in the immune-related tissues, such as spleen, kidney, gills and intestine. Stimulation of peripheral blood mononuclear cells with PHA (50 μ g/mL) and PMA (50 ng/mL) led to a significant increase of *OnFoxp1b* mRNA expression at 6, 12 and 24 h, respectively, while no significant changes of *OnFoxp1a* mRNA expression were observed except stimulation of PHA at 24 h. These results imply that the homologous Foxp1 in lower vertebrate is involved in lymphocyte activation. After 24 h treatment of 6-month male (XY) tilapias with estrogen (17-beta-estradiol, E2), the expressions of *OnFoxp1a/b* were significantly up-regulated in the intestine and kidney but not in the spleen. Taken together, our results suggest that both of OnFoxp1a/b coded by two different genes are the orthologues of mammals and have potential disproportionate functions. Moreover, the mRNA expression patterns of *OnFoxp1a/b* are related with the lymphocyte activation and regulated by E2 level in vivo. This study not only provides scientific data for the research on the molecular evolution of Foxp subfamily members in lower vertebrates, but also will promote further study of the fish molecular immune response.

Key words: Nile tilapia; *Foxp1*; lymphocyte activation; estrogen

Corresponding author: WANG Deshou. E-mail: wdshou@swu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(31201979, 31201986); Natural Science Foundation of Chongqing, China(cstc2012jjA80041, cstc2012jjA80005)