

文章编号: 1000-0615(2018)02-0186-10

DOI: 10.11964/jfc.20170110684

剑尾鱼趋化因子CCL4和CCL19基因的克隆及嗜水气单胞菌感染对其组织表达的影响

朱成科¹, 王建¹, 陈灵涵¹, 周朝伟¹, 雷骆¹,
邓星星¹, 刘春², 郑宗林^{1*}

(1. 西南大学荣昌校区水产系, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室,
水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆 402460;
2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

摘要: 趋化因子是一类能够吸引白细胞移行到感染部位的低分子量(8~10 ku)蛋白质, 在炎症反应、非特异性免疫反应中具有重要作用。实验克隆了剑尾鱼2个趋化因子基因(CCL4、CCL19)cDNA序列, 运用荧光定量PCR技术检测其在健康组织和嗜水气单胞菌感染后肝、脾中的表达情况。结果显示, 剑尾鱼CCL4和CCL19开放阅读框长度分别为294和333 bp, 分别编码97和110个氨基酸, 推导氨基酸序列均含有趋化因子CC家族标志性的4个半胱氨酸残基, 与其他物种尼罗罗非鱼、鼠、狗、人、鸡的氨基酸序列相似性比较, CCL4相似度分别为71.1%、33%、33%、31%、23.5%; CCL19相似度分别为62%、26.9%、24.5%、26.6%、27.8%。在检测的健康剑尾鱼8个组织中, CCL4和CCL19均有表达, 其中CCL4和CCL19均在脾脏中表达量最高; CCL4在肌肉和肠中表达量较低, 而CCL19则在心脏中表达量较低。经嗜水气单胞菌感染后, CCL4在剑尾鱼头肾中12 h表达量达到最高, 在肝脏中24 h表达量最高; CCL19在头肾和肝脏中均在24 h时表达量最高。研究表明, 趋化因子CCL4和CCL19可能参与剑尾鱼机体免疫调节反应, 在抗嗜水气单胞菌感染过程中发挥了重要作用。

关键词: 剑尾鱼; CCL4; CCL19; 嗜水气单胞菌; 克隆; 表达分析

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

趋化因子(chemokine)是一系列分子量约8~10 ku的小分子的细胞因子或信号蛋白^[1-2], 它的名字来自于其具有诱导邻近的应答细胞定向趋化的能力。趋化因子的主要作用是趋化细胞的迁移, 细胞沿着趋化因子浓度增加的信号向趋化因子处迁移, 其主要通过受体介导粒细胞、单核/巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞的趋化性迁移和活化, 从而使细胞在炎症部位聚集、活化以及修复组织损伤等^[3], 趋化因子是机体先天免疫至关重要的组成部分。根据趋化因子近N-端半胱氨酸(Cys)的位置、排列方式和数量,

可分为CC、CXC、C、CX3C四个亚家族: 其中, CC趋化因子大多含有4个保守的半胱氨酸残基, 在前2个半胱氨酸间没有插入其他任何氨基酸残基, 有20余个成员, 主要趋化和激活单核细胞和某些T细胞亚群, 也可趋化活化B细胞、嗜酸性粒细胞、DC细胞和NK细胞, 对中性粒细胞无作用^[4-7]。CCL4和CCL19是CC家族的一员, CCL4在受体介导下能吸引单核细胞、T淋巴细胞和嗜酸性粒细胞^[8-9], 有助于机体清除有害微生物^[10]; CCL19对淋巴样细胞转运和淋巴组织结构形成至关重要, 另外它还在黏膜免疫中发挥重

收稿日期: 2017-01-10 修回日期: 2017-05-13

资助项目: 重庆市生态渔业技术体系建设专项(40800115, 40800216); 西南大学荣昌校区青年基金(20700913)

通信作者: 郑宗林, E-mail: zhengzonglin@126.com

要作用^[11]。

剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、花鲈科(Cyprinodontidae)、剑尾鱼属(*Xiphophorus*), 有体型小、繁殖力强、易辨别雌雄、便于在实验室饲养等特点。剑尾鱼的实验动物化研究历经多年, 是中国首个通过审定的鱼类实验动物, 应用于水环境监测、水产药物安全性评价、动物疾病模型等不同领域^[12]。剑尾鱼作为实验动物, 在应用中具有良好的反应一致性和可重复性, 从而保证实验结果的准确性、可靠性和可比性。自从1998年第一条硬骨鱼类趋化因子基因CK1在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中报道以来^[13], 大量不同类型的趋化因子在鱼类中被发现。然而, 作为模式动物的剑尾鱼, 尚无趋化因子基因相关的研究报告。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)广泛存在于淡水、污水及土壤中, 是我国淡水养殖鱼类细菌性败血症的主要病原。本研究以剑尾鱼为实验材料, 在克隆趋化因子基因CCL4和CCL19的基础上, 通过研究趋化因子基因在剑尾鱼体内的组织表达情况及嗜水气单胞菌感染后的表达变化规律, 进一步揭示剑尾鱼CCL4和CCL19的功能, 为深入研究鱼类非特异性免疫的分子机制以及建立标准化的剑尾鱼水生动物感染模型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

剑尾鱼5~6月龄, 体长(6.0±1.0) cm, 体质量(4.0±0.5) g, 由中国水产科学研究院珠江水产研究所培育, 暂养2周后实验, 养殖玻璃缸体积为100 L, 按常规饲养方法管理, 每天用经24 h曝气的自来水换水1/4, 水温控制在(28±2) °C。嗜水气单胞菌菌株由本实验室保存。Trizol Reagent (Invitrogen); PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ II、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0与PMD18-T Vector、MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0均为宝生物工程(大连)有限公司产品; 2000 bp DNA ladder Marker、Taq DNA Polymerase、大肠杆菌DH5α感受态细胞和普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒均为天根生化科技(北京)有限公司产品; 低熔点琼脂糖为Sigma公司产品; 其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

总RNA提取 选取3尾健康剑尾鱼, 腹腔注射嗜水气单胞菌60~80 μL (菌悬液浓度10⁴ cfu/mL), 1 d后取脾脏按照试剂盒方法提取RNA, 用于CCL4和CCL19基因cDNA的克隆。RNA提取过程中进行DNA消化, 提取后取2 μL总RNA样品通过1%琼脂糖凝胶电泳检测其质量和完整性, 用核酸蛋白测定仪测定RNA样品的浓度和纯度。

CCL4和CCL19基因序列 利用引物设计软件Primer Premier 5.0, 参照剑尾鱼EST库的基因序列和已知鱼类斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(登录号: AFN58329)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)(登录号: AM490064)的CCL4基因, 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)(登录号: AB524336)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(登录号: XM_003444469)的CCL19基因序列, 分别设计CCL4和CCL19扩增引物C4和C19(表1)。PCR扩展使用rTaq DNA Polymerase, 扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳后, 切下目的条带用DNA凝胶回收试剂盒纯化, 纯化产物连接到pMD18-T载体后转化进大肠杆菌感受态细胞DH5α, 37 °C倒置培养过夜, 挑取阳性克隆测序。

生物信息学分析 利用vector VTI Suite 10.0分析软件对测序结果进行分析; 用ExPASy-Tools (<http://www.expasy.ch/tools/>)对翻译蛋白的生化特性和蛋白质功能位点进行预测和分析; 通过NCBI中的Blast程序进行同源序列查找及结构组成分析; 应用Clustalx进行多序列比对, 根据氨基酸序列, 用MEGA 4.0中的邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建进化树。

剑尾鱼CCL4和CCL19 mRNA组织表达分析

采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测CCL4和CCL19基因在8个组织中相对表达量。根据已知剑尾鱼β-actin序列(登录号: DQ060278)和获得的CCL4和CCL19基因cDNA序列分别设计内参引物β-actin F、β-actin R和检测引物QC4、QC19(表1)。选取3尾健康的剑尾鱼, 分别取其鳃、脑、心脏、肝、脾、头肾、肠、肌肉8个组织, 按照试剂盒方法提取RNA, 提取后RNA样品同上进行电泳检测及浓度测定。RNA按照PrimeScript™ RT reagent Kit进行反转录, 合成cDNA第一链。以合成的cDNA第一链为模板, 按照SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒说明在ABI

表 1 剑尾鱼 *CCL4* 和 *CCL19* 基因扩增和定量检测所用引物

引物名称 primer name	序列 (5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
C4F	TCGCAGACAGAACAAGACGAGCCATCC	CCL4-PCR
C4R	AGGATGGCTCGTCTTGTCTGTCTGCG	
C19F	GAAAACCCCACTCCTTGACCATCCA	
C19R	CTGGATGGTCAGAGGAGTGGGGTTTTC	CCL19-PCR
QC4F	CACCCACTTTTCTCTCTTAG	CCL4-QPCR
QC4R	ACACTCAGTAGCGTTACCCAT	
QC19F	ACTCACCTCAGGATGGCT	
QC19R	AGATGGCAGGGTTGGA	CCL19-QPCR
β -actin F	TGCTATGTTGCACTGGACTTTGAG	β -actin-QPCR
β -actin R	CCTCTCGTTTCCGATGGTGATGAC	

7500(Applied Biosystems)实时荧光定量PCR仪上进行荧光定量PCR检测。反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 35 s, 扩增 40 个循环, 60 °C 延伸时采集荧光信号, 并对扩增产物进行溶解曲线分析, 以确保特异性扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算样品中 mRNA 的相对表达量。

嗜水气单胞菌对剑尾鱼体内 *CCL4* 和 *CCL19* mRNA 表达的影响 选取 120 尾健康的剑尾鱼, 分为 3 个平行实验组和 1 个对照组, 每组 30 尾, 室温保持在 (28±2) °C。实验组每尾鱼腹腔注射嗜水气单胞菌 1×10^4 cfu/g, 对照组注射等量 0.65% 的生理盐水。感染后分别在 3、6、12、24、48 和 96 h 每组取 3 尾鱼的肝和脾 2 个组织, 采用 qRT-PCR 检测各组织不同时间点 *CCL4* 和 *CCL19* 基因 mRNA 的相对表达量, 检测方法同上。

2 结果

2.1 剑尾鱼 *CCL4* 和 *CCL19* 基因的克隆及序列分析

经过 PCR 扩增、克隆、测序和序列分析, 结果表明, 克隆的 2 条 cDNA 序列分别为 687 和 892 bp, 一条序列与斜带石斑鱼和舌齿鲈的 *CCL4* 相似性为 61.8% 和 58.5%; 另一条序列与红鳍东方鲀和尼罗罗非鱼的 *CCL19* 相似性为 56.9% 和 57.5%, 因此将 2 个基因分别命名为 *CCL4* 和 *CCL19*。剑尾鱼 *CCL4* 开放阅读框位于 22~315 bp, 编码 97 个氨基酸, N-端有 1 个 21 aa 信号肽(图 1); *CCL19* 开放阅

读框位于 201~529 bp, 编码 110 个氨基酸, N-端有 1 个 24 aa 的信号肽(图 2)。

选取剑尾鱼 *CCL4* 和 *CCL19* 及已报道的其他 5 个物种的 *CCL4* 和 *CCL19* 基因推测氨基酸序列, 运用 Clustalx 进行多序列比对。与其他物种如尼罗罗非鱼、小鼠 (*Mus musculus*)、狗 (*Canis lupus familiaris*)、人 (*Homo sapiens*)、鸡 (*Gallus gallus*) 的氨基酸相似性比较, *CCL4* 相似度分别为 71.1%、33%、33%、31%、23.5%; *CCL19* 相似度分别为 62%、26.9%、24.5%、26.6%、27.8%(图 3)。所有序列均含有趋化因子 CC 家族标志性的 4 个半胱氨酸残基, 以及一些完全保守和部分保守氨基酸位点。其中, 2 种鱼类 *CCL4* 的 C-端比高等脊椎动物多 9 个氨基酸; 2 种鱼类 *CCL19* 的 C-端比高等脊椎动物多 4~10 个氨基酸。

2.2 *CCL4* 和 *CCL19* 的系统进化分析

选择公开发表的不同物种的 18 种 *CCL4*、13 种 *CCL19* 序列和剑尾鱼的 *CCL4*、*CCL19* 序列, 利用邻接法构建系统发生树。不同物种的 *CCL4* 和 *CCL19* 均分为两大支, 其中, 鱼类 *CCL4* 和 *CCL19* 分别聚为一支, 其他物种的 *CCL4* 和 *CCL19* 各聚为另一支(图 4)。

2.3 *CCL4* 和 *CCL19* 基因 mRNA 的组织分布

QRT-PCR 结果显示 *CCL4* 在肌肉、肠、心脏、肝、鳃、脑、脾、头肾中均能检测到表达, 在脾中表达量最高, 其次为头肾、肝、鳃、心脏、脑, 肌肉、肠中有微量表达;

```

1  CACCAACAACTCACCTCAGGATGCTCGTCTTGTCTGTCTGCGATTGTGATGATGATGGCCTTCATCGCTCTCACTGAAGGCCTGCGT
    M A R L V L S A I V M M M A F I A L T E G L R
91  GGAGTTGGCCAAAGAAGTGCTGCTTCAAATTCATGACAAGCCGGTGTCAAAAAGATAAAGTTGTGAGCTACATCAGAACCAGTCAGCGC
    G V G P K K C C F K F N D K P V S K D K V V S Y I R T S Q R
181 TGCTCAAACCTGCCATCTTGTGAATACAGTGGCCGGCGTCAGATGTGTGTCAGACCTTCAGCCTCCTGGGTGAAGGATCTCATCAGC
    C S N P A I L L N T V A G R Q M C V R P S A S W V K D L I S
271 TACCTGGAGACCAAAGATGTTTCTGGTGCAAACACCAACCTGTAACCTGACAATAATATGCCAACACTCCAGCTTACATAAATATGTAG
    Y L E T K D V S G A N T N L *
361 GTTGTGATGCTACAGTTTCTTACTGAATACAGCAGCTCTCTTCCATGATATTTATCAAATGTTCTAATATTTTATGGTATACTACCAAG
451 ATGAGATGAAGCAGAATCTAATTTTTTTCATATAAATGAAATATGTTTTATTATGGTTGTATGGAACAACAAGAGAATTTTTGTAA
541 ATTCAACACTTAAGTTCAACCATCAACACTGTAAGTTTGATTGTAGTTTTAACTAACCAGATAAAGTATCTATTGTAAAGACAAATG
631 TCTTCAAATAAAACAAAGTCGTCATCTTTATTAATAAGCTAGGGTCTGTTGCACTT

```

图 1 剑尾鱼 *CCL4* 基因部分序列及其推导的氨基酸序列

阴影中标识的分别为相应的起始密码子(ATG)、终止密码子(TAA); 水平下划线标记N端信号肽

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *CCL4* from *X. helleri*

The letter in the shadow indicates the start codon (ATG), the stop codon (TAA); horizontal lines under the sequences indicate N-end signal peptide

```

1  AGAGTTCTGTAAGGGGAAATGTCTGCCTGGATGGTCAGAGGAGTGGGGTTTTCCACAGGGACCATATTATTGTAAAAGGAACTGAAAGTCT
93  CCAACGCTATAAAGCCACAAGCCCGTGCTCAGCGCCGGGAGTTGCCGATTTCTTTTGTGTTGCTAGGGGAAGCGAGTTCGTCAGCC
183  TCCAGAGCGACTGCAGACTGACTCCCTTGGCGATGCCAAGCTCTTCTTCTGCATCTTTTCATCATCTGCTGCTCCACAGTGACTGAG
    M T P F G D A K L F F C I F F I I C C S T V T E
273  GCTCAGGTTCTGTGACTGCTGCTGTGCGGTAGCAAACAAACCAATCAGCAAAAACTAGTTGCAGATTACCGTGAACAGATCAAGGC
    A Q V P V D C C L S V A N K P I S K K L V A D Y R E Q D Q G
363  TGCTCGATTGATGCCAATCTGGTGACCAGACGTGGGTAAAACCTCTGCGCCCGACTAAGGAAGAAAAGTGGGTGGAAGACGTGATG
    C S I D A T I L V T R R G L K L C A P T K E E K W V E D V M
453  ACGCAGTGGATCACCTGAAGAAAAATGCAAAACGGAGAACTACCAGGCAATCGCTGTTTGGAGTGAAGCCTGAAATAAAAAGCCTC
    T H V D H L K K K C K T E N Y Q G N R C F G V K P E *
543  TGGTCCCTGAGAACCAAGTGATTGACAAAATCCAGCTAAACGTTTCTCCTGTTACCGAAATAAACCTTTTGTTTTTTCATTTC
633  TCTTTATAAAAATCTATGTTAATTTGAGCTGCAATCTAAAAACAACATCCTGAAGGAATTTTATTTTTTACTGCTTTTCTGTTGTAA
723  AGTCTTTCAGAGAGATAATATGCTATATGTGTAGCCATTAAGCTAACACATGTGTAGCCACATAAGCTAGCCTATGTTTTAGTCAGA
813  GAAAGTTTTATTGTAACCTTAATGTGAATTTTTATCTCTAATTAACCTTTTTATTTTCTCAGTATGCTCGTTATTTG

```

图 2 剑尾鱼 *CCL19* 基因部分序列及其推导的氨基酸序列

阴影中标识的分别为相应的起始密码子(ATG)、终止密码子(TAA); 水平下划线标记N端信号肽

Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequences of *CCL19* from *X. helleri*

The letter in the shadow indicates the start codon (ATG), the stop codon (TAA); horizontal lines under the sequences indicate N-end signal peptide

*CCL19*在8个组织中也都能检测到表达, 其中在脾中表达量最高, 其次为肝、鳃、头肾, 肌肉、肠、脑, 心脏中有微量表达(图5)。

2.4 嗜水气单胞菌刺激下 *CCL4* 和 *CCL19* 在肝和脾中的表达变化特征

剑尾鱼在感染嗜水气单胞菌后, 肝中 *CCL4* 的表达在 12 h 开始升高, 在 24 h 时达到峰值

(4倍, $P < 0.01$), 随后逐渐降低, 96 h 仍显著高于对照组($P < 0.05$)。脾中 *CCL4* 的表达水平在 12 h 时突然升高(2.9倍, $P < 0.01$), 24 h 时仍显著高于对照组($P < 0.05$), 随后降至与对照组相当水平。肝中 *CCL19* 的表达水平逐渐升高, 在 24 h 时达到极高值(89倍, $P < 0.01$), 随后逐渐降低, 96 h 时仍显著高于对照组($P < 0.01$)。脾中 *CCL19* 的表达水

<i>Xiphophorus helleri</i> CCL4	..MARLVLSAIVMMAFIALT..EGLRGVGFKKCFKFNKPVSKDKVVSYI..RTSQRC	54
<i>Oreochromis niloticus</i> (XP_003439451)	LAAPRLASVVVLMVAIVAVT..EGMRGAGPKKCFRFNDQEVVPGKGVVSYI..KTSQRC	56
<i>Gallus gallus</i> (NP_990051)	MKLSAVVVAL..IASFCSRASSAPVGPVPT..CCTTYITHKIPRNLIQRHY..STSTSC	55
<i>Mus musculus</i> (NP_038680)	MKLCVSAISLLLVAAFCAFGESAPMGSDPPTSCEFYSYTSRQLHRSEFMDYY..ETSSLC	58
<i>Canis lupus familiaris</i> (NP_001005250)	MKLCVIVLSLLVVAAFCSFALSAPMGSDPPTACCFYSYTLRKRIPRNFVADYF..ETSSLC	58
<i>Homo sapiens</i> (NP_002975)	MKLCVIVLSLLMVAAFCSFALSAPMGSDPPTACCFYSYTARKLPRNFVVDYY..ETSSLC	58
<i>Xiphophorus helleri</i> CCL19	MPFGDAKLFFCFEIIICST..VTEAQVPVDCLSVANKPISKKLIADYR..EQDQGC	55
<i>Oreochromis niloticus</i> (NP_003444517)	MAPRGDGRFLSLFIACYCT..VTLAQVPADCLEVAKKPIEKGLVANYRLQVQGGGC	57
<i>Gallus gallus</i> (NP_001289097)	..MQRLHVLCLSLVLRVCLH..VYAGNNVLDCLRTSEKPIPWRIVQDYRMQLVQDGC	55
<i>Mus musculus</i> (NP_036018)	MAPRVTELLAFSLVLRVTFPPAP.TLGGANDAEDCLSVTQRPPIPGNIKAFRYLLNEDGC	59
<i>Ganis lupus familiaris</i> (NP_001005256)	MASQAVALLALSLLLWTSPA..LGGANDAEDCLSVTQRPPIPGNIKAFHYLLIKDGC	57
<i>Homo sapiens</i> (NP_006265)	...MALLLALSLLVLRVTFPPAP.TLGGANDAEDCLSVTQRPPIPGNIKAFHYLLIKDGC	55
<i>Xiphophorus helleri</i> CCL4	SNPAILLNTVAGRQMCVRFPS.ASWVRDLISYLETKDVSANTNL.....	97
<i>Oreochromis niloticus</i> (XP_003439451)	SKPAILLNTVAGRQLCVRFPS.AFWVRQLISYLDKAVPGQTSNL.....	99
<i>Gallus gallus</i> (NP_990051)	SKPAIIFITKKEREVCAFPS.DFWVQRYLQSVKRD.....	89
<i>Mus musculus</i> (NP_038680)	SKPAVVELRRRGRQICAFPS.EFWVTEYMSDEELN.....	92
<i>Canis lupus familiaris</i> (NP_001005250)	SCPAVVEQTRRRGRQVCAFPS.EFWVQEYMDDEELN.....	92
<i>Homo sapiens</i> (NP_002975)	SCPAVVEQTRRSKQVCAFPS.EFWVQEYVYDEELN.....	92
<i>Xiphophorus helleri</i> CCL19	SIDATILVTRRGLKLCAPTKEEKWVEDVMTHVDHLKKRCKTENYQGNRCFVGVK	109
<i>Oreochromis niloticus</i> (NP_003444517)	AIDATILVTRRGRITMCAFPVN.EKVVENLKRHYDQLKKCKKQNYKPKRRCFVGVK	110
<i>Gallus gallus</i> (NP_001289097)	DIPATVETLAKGRKLCAPFPQ.AFWVLRRLREKLDTSARKVFNQGN.....	99
<i>Mus musculus</i> (NP_036018)	RVEAVVETLRSYQLCAFPD.QFWVDRIIRRLKSSAKNKGNSRRSPVS....	108
<i>Ganis lupus familiaris</i> (NP_001005256)	RVEAVVETLTKGRQLCAFPD.QFWVDRIIRRLQKNSAKNKGHSS.....	100
<i>Homo sapiens</i> (NP_006265)	RVEAVVETLRSRQLCAFPD.QFWVERIIQLRQTSARKMRSS.....	98

图3 剑尾鱼CCL4和CCL19氨基酸序列与其他物种的比较

方框标出趋化因子家族中4个保守的半胱氨酸残基；黄色背景表示完全保守氨基酸位点；绿色背景表示部分保守氨基酸位点

Fig. 3 Alignment of the deduced amino acid sequence of *X. helleri* CCL4 and CCL19 with other known vertebrate orthologues

The four conserved cysteine residues are indicated by a box; the identical residues are shown with yellow background; the similarity residues are shown with green background

平在12 h时突然升高(2.3倍, $P < 0.01$), 24 h时达到峰值(2.9倍, $P < 0.01$), 随后逐渐降低, 48 h降至对照组水平(图6)。

3 讨论

本研究从剑尾鱼脾脏中克隆了CCL4和CCL19两种趋化因子cDNA序列, 它们的开放阅读框长度分别为294和333 bp, 各编码97和110个氨基酸残基。氨基酸序列分析发现这2种CC型趋化因子与其他动物的CC型趋化因子类似, 拥有4个保守的半胱氨酸残基, 并且N-端2个半胱氨酸残基相邻。这4个半胱氨酸残基对于蛋白质三级结构的稳定以及功能的行使具有重要的作用: 其第1和第3、第2和第4半胱氨酸残基之间会形成2个二硫键, 起稳定构象的作用^[14-15]。另外, 氨基酸序列比对发现, 剑尾鱼和尼罗罗非鱼两种鱼类CCL4的C-端比高等脊椎动物多9个氨基酸; 两种鱼类CCL19的C-端比高等脊椎动物多4~10个氨基酸, 这与草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)CCL4的研究结果相似^[16]。

趋化因子种间保守性很低^[17-18]。如人、鼠等

哺乳类IL-1 β 同源性平均值仅为46.6%, 而进化关系很近的鸭(*Anas platyrhynchos*)和鸡CC趋化因子的氨基酸同源性平均值甚至只有36%左右^[19]。氨基酸序列比对发现剑尾鱼CCL4和CCL19与哺乳动物的CC型趋化因子相似性很低, 但是与其他鱼类的CC型趋化因子相似性较高, 例如剑尾鱼CCL4与舌齿鲈CCL4的核苷酸序列的相似性为51%, 氨基酸序列的相似性为66%; CCL19与尼罗罗非鱼CCL19核苷酸序列相似性为37%, 氨基酸序列的相似性为61%。本研究将剑尾鱼2种趋化因子与其他物种CCL4和CCL19做了系统进化分析, 通过这2个受体氨基酸序列的比较得出的亲缘关系与这些物种的进化地位相符(图4)。

趋化因子在炎症反应、非特异性免疫反应中具有重要作用, 对趋化因子基因的表达研究是阐明机体免疫应答和疾病控制的一个重要方式^[3, 20]。在哺乳动物中, 有关趋化因子的表达已有较多的报道, 通过对趋化因子的表达和功能分析, 人们对其作用已经有了较深入的了解。近年来, 鱼类非特异性免疫系统的研究取得了较大的进展, 但鱼类趋化因子的研究主要集中在CXC型和CC型2类, 仍处于起步阶段, 多数是

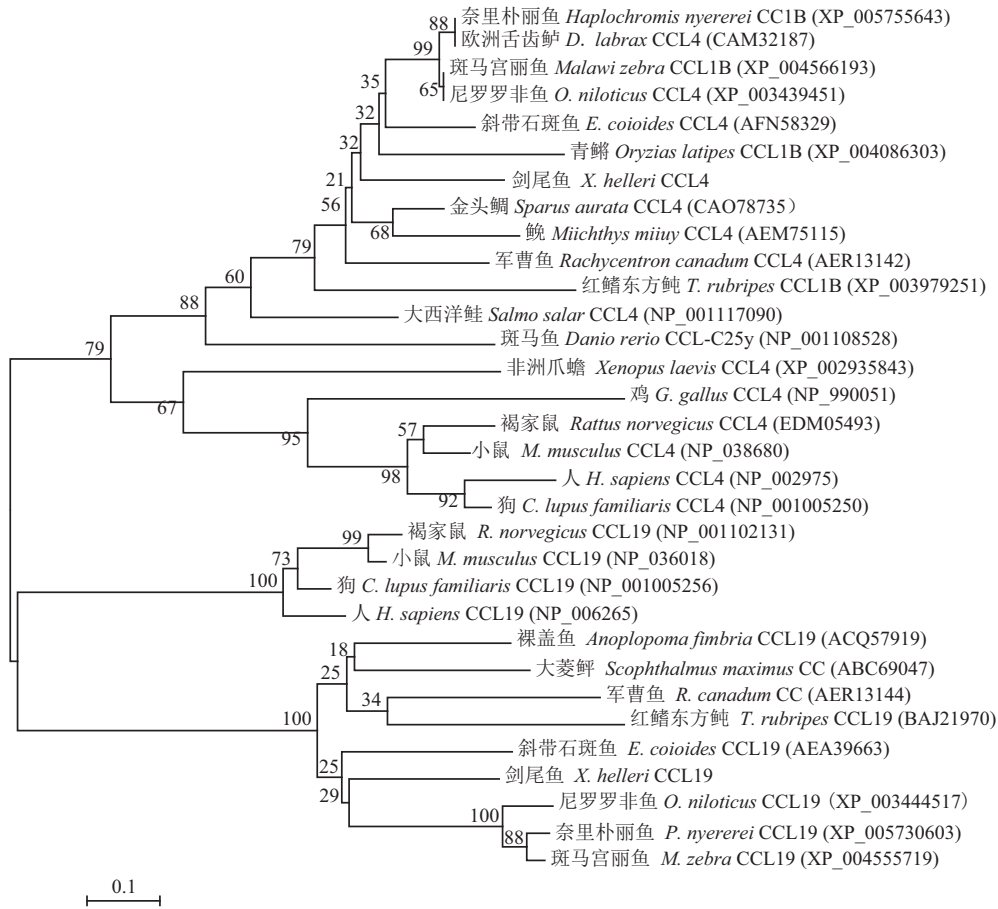


图 4 基于剑尾鱼和其他物种 *CCL4* 和 *CCL19* 蛋白序列的系统进化树

节点处数值为自展置信值, 自展重复 1000 次

Fig. 4 Phylogenetic analysis of deduced amino acid sequence of *X. helleri* CCL4 and CCL19 with other known vertebrate orthologues

The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrap analysis (1000 repetitions)

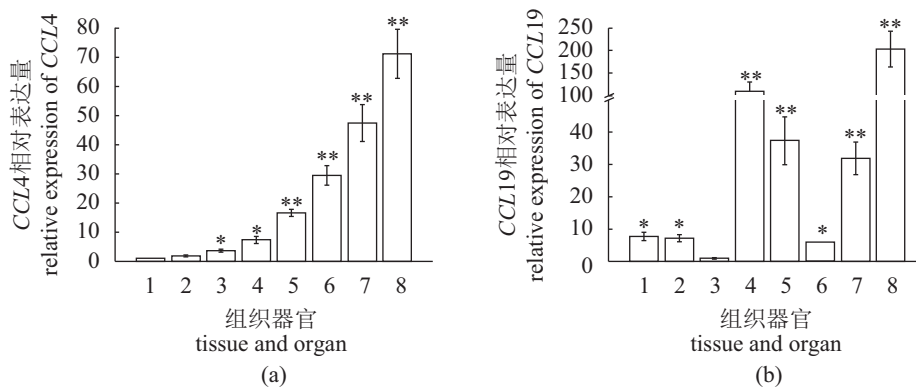


图 5 剑尾鱼不同组织中 *CCL4* 和 *CCL19* 基因的特异性表达

(a) *CCL4* 在剑尾鱼不同组织中的特异性表达; (b) *CCL19* 在剑尾鱼不同组织中的特异性表达; $n=3$ /组/时间点。“*、**”分别表示与相应对照组比有显著或极显著差异 ($P<0.05$, $P<0.01$), 下同。1. 肌肉, 2. 肠, 3. 心脏, 4. 肝脏, 5. 鳃, 6. 脑, 7. 头肾, 8. 脾脏

Fig. 5 Relative expression of the *CCL4* and *CCL19* genes in different tissues of *X. helleri*

(a) *CCL4* gene expression in various tissues of *X. helleri*; (b) *CCL19* gene expression in various tissues of *X. helleri*. Each experiment was performed at least in triplicate; deviation bars represent the standard errors of three experiments at each time point. * $P<0.05$; ** $P<0.01$, the same below. 1. muscle; 2. intestine; 3. heart; 4. liver; 5. gill; 6. brain; 7. head kidney; 8. spleen

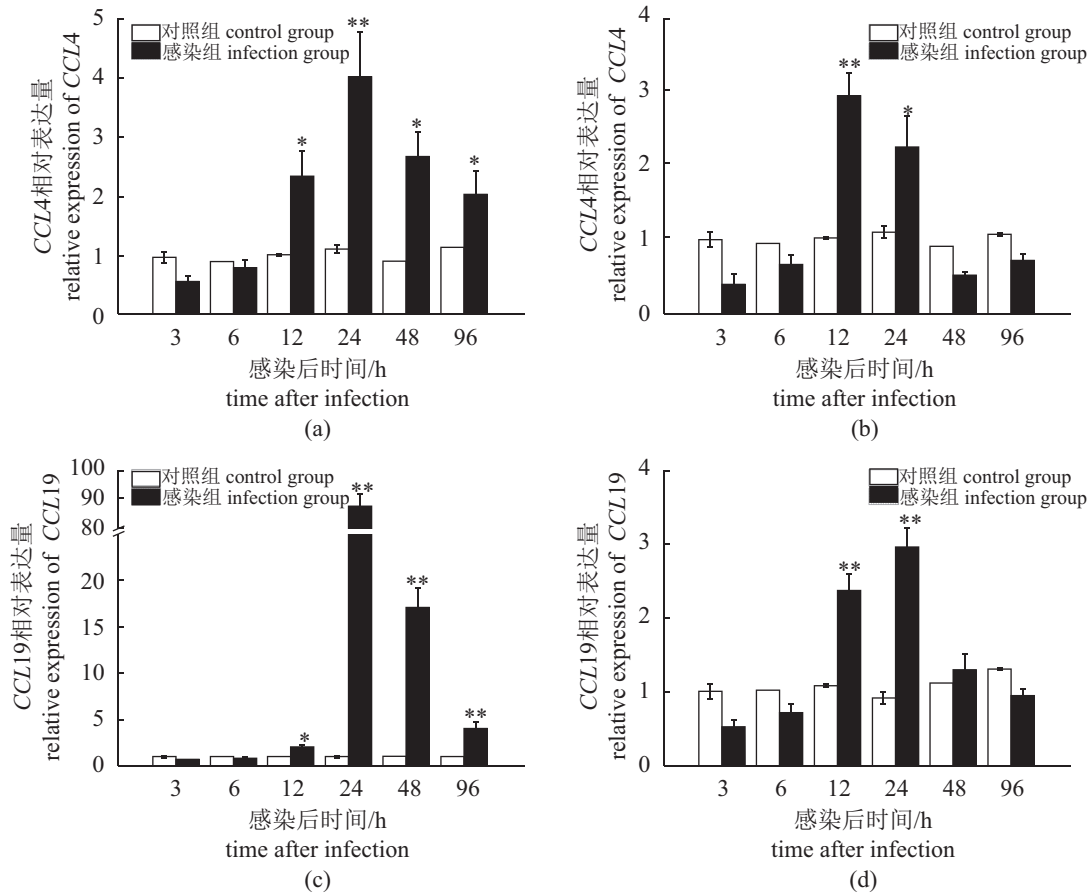


图6 嗜水气单胞菌刺激后CCL4和CCL19在肝、脾中的表达变化

(a) CCL4在肝中的表达; (b) CCL4在脾中的表达; (c) CCL19在肝中的表达; (d) CCL19在脾中的表达; n=3/组/时间点

Fig. 6 Expression analysis of CCL4 and CCL19 by relative quantitative Real-time PCR in liver, and spleen during 96 h after induction with *A. hydrophila*

(a) expression level of CCL4 in liver; (b) expression level of CCL4 in spleen; (c) expression level of CCL19 in liver; (d) expression level of CCL19 in spleen. Each experiment was performed at least in triplicate; deviation bars represent the standard errors of three experiments at each time point

对趋化因子克隆和特性分析的报道, 涉及功能的研究较少^[15-16]。趋化因子的组织特异性表达研究发现, 军曹鱼(*Rachycentron canadum*)的*RcCC1*基因在鳃、血液、肾、脾、头肾、肌肉、肝、胃、皮肤、肠、脑、心等12个组织中均有表达^[21]; 斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)的*CXCL12*和*CXCL14*也在检测的9种组织中的都有表达^[22], 这种趋化因子在多数组织中表达的现象也存在于草鱼^[16]、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)^[23]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[24]和鲢(*Miichthys miiuy*)^[25]的CC型趋化因子组织表达分布研究中。本实验中, 剑尾鱼CCL4和CCL19在肌肉、肠、心脏、肝、鳃、脑、脾、头肾中也均能检测到表达。这些研究表明多数鱼类趋化因子为广谱性表达, 说明鱼类趋化因子不仅在免疫相关组织内

发挥作用, 在体内也可能参与其他生理活动。不同类型的趋化因子组织分布有所不同, 但大多数的趋化因子主要在鳃和免疫相关组织中(肝脏、肾脏和脾脏)具有较高的表达, 这也与本实验中CCL4和CCL19在剑尾鱼组织中的表达情况相符。由于鱼类肝脏、肾脏和脾脏具有大量的免疫细胞, 如巨噬细胞和淋巴细胞, 所以在肝脏、肾脏和脾脏中趋化因子表达量高^[26-29]。而鳃作为鱼类的天然免疫屏障, 含有较多白细胞, 可以产生免疫应答, 所以表达量也高^[21, 30]。

嗜水气单胞菌是革兰氏阴性菌, 是近几十年来淡水养殖动物主要病原菌之一, 剑尾鱼对嗜水气单胞菌比较敏感^[31-32], 在嗜水气单胞菌疫苗效果评价中也有较好的应用^[33]。本研究通过剑尾鱼人工感染嗜水气单胞菌后发现, CCL4和

CCL19 基因的 mRNA 表达均与此病原菌感染剑尾鱼过程紧密相关, 暗示 *CCL4* 和 *CCL19* 可能参与到鱼类抗细菌侵染的免疫反应中。目前的大量研究表明, 趋化因子在抵抗外界病原菌入侵引发的组织损伤即所谓的炎症反应中发挥着重要作用。例如, 条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) 的 *RbCC1*、*CXCR1* 和 *CXCR2* 均在迟缓爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*) 和海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 感染免疫中发挥了重要作用, 其肾和脾中 *RbCC1*、*CXCR1* 和 *CXCR2* 的 mRNA 水平呈现上升趋势^[34-35]。炎症、LPS、poly (I : C) 和细菌疫苗刺激等可以激活 CC 趋化因子招募单核/巨噬细胞和 T 淋巴细胞等定向迁移至损伤或感染部位, 发挥吞噬作用消除病原体^[21, 36-37]。本研究显示, 剑尾鱼人工感染嗜水气单胞菌后, 肝、脾中 *CCL4* 和 *CCL19* 基因 mRNA 的表达量在 12 h 开始有显著上调, 表明 2 个基因对感染刺激呈快速反应。从 2 个组织内的表达时效分析, 肝中的 *CCL4* 和 *CCL19* 基因均在 24 h 表达量最高, 表达上调持续时间较长, 到 96 h 时仍有显著变化; 而脾中表达上调持续时间相对较短, 48 h 表达恢复到正常水平, 这可能主要是因为人工感染方式为腹腔注射, 病原菌在腹腔内大量繁殖, 而肝脏与腹腔直接接触, 在长时间内有足量的病原菌持续刺激诱导 CC 趋化因子表达, 另外本研究中肝中 *CCL19* 在感染后 24 h 表达量极高 (为对照组的 89 倍), 这也表明肝是非特异性免疫发生的重要场所; 而脾是特异性免疫的主要场所, 在病原菌感染后, CC 趋化因子表达上调, 参与非特异性免疫抵抗病原, 持续一段时间后, 脾脏内特异性免疫应答逐渐发挥作用, CC 趋化因子恢复正常表达水平。

参考文献:

- [1] Esche C, Stellato C, Beck L A. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005, 125(4): 615-628.
- [2] Kim C H, Broxmeyer H E. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1999, 65(1): 6-15.
- [3] Alejo A, Tafalla C. Chemokines in teleost fish species[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1215-1222.
- [4] Mackay C R. Chemokine receptors and T cell chemotaxis[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1996, 184(3): 799-802.
- [5] Ahuja S K, Murphy P M. The CXC Chemokines Growth-regulated Oncogene (GRO) α , GRO β , GRO γ , Neutrophil-activating Peptide-2, and Epithelial Cell-derived Neutrophil-activating Peptide-78 Are Potent Agonists for the Type B, but Not the Type A, Human Interleukin-8 Receptor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(34): 20545-20550.
- [6] Howlett A C, Barth F, Bonner T I, et al. International union of pharmacology. XXVII. classification of cannabinoid receptors[J]. *Pharmacological Reviews*, 2002, 54(2): 161-202.
- [7] Nomenclature IWSO. Chemokine/chemokine receptor nomenclature[J]. *Cytokine*, 2003, 21(1): 48-49.
- [8] Glass W G, Rosenberg H F, Murphy P M. Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection[J]. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2003, 3(6): 467-473.
- [9] Ebert L M, Schaerli P, Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues[J]. *Molecular Immunology*, 2005, 42(7): 799-809.
- [10] Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36(10): 1882-1886.
- [11] Sepahi A, Tacchi L, Lapatra S E, et al. *CCL19-1* A mucosal chemokine specialized in rainbow trout nasal immunity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 53:98.
- [12] 吴淑勤, 黄志斌, 石存斌, 等. 水生实验动物: 剑尾鱼 [M]. 中国农业出版社, 2005: 7-9.
- Wu S Q, Huang Z B, Shi C B, et al. Aquatic laboratory animals-swordtail fish [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 7-9 (in Chinese).
- [13] Dixon B, Shum B, Adams E J, et al. CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Immunological Reviews*, 1998, 166: 341-348.
- [14] Laing K J, Secombes C J. Chemokines[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2004, 28(5): 443-460.
- [15] 张金洲, 陈新华. 鱼类趋化因子的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2006(z1): 129-132.
- Zhang J Z, Chen X H. Research progress on chemokines in fish[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2006(z1): 129-132(in Chinese).

- [16] 王丽坤, 王娜, 马梅生, 等. 草鱼CCL4基因的克隆及表达[J]. 南昌大学学报(理科版), 2009, 33(2): 181-184.
Wang L K, Wang N, Ma M S, *et al.* Cloning and expression of CCL4 in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2009, 33(2): 181-184(in Chinese).
- [17] Hurst L D, Smith N G C. Do essential genes evolve slowly?[J]. Current Biology, 1999, 9(14): 747-750.
- [18] Harrison G A, Wedlock D N. Marsupial cytokines. Structure, function and evolution[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2000, 24(5): 473-484.
- [19] Sreekumar E, Premraj A, Arathy D S, *et al.* Identification, sequence characterization, and analysis of expression profiles of three novel CC chemokines from domestic duck (*Anas platyrhynchos*)[J]. Immunogenetics, 2005, 57(5): 364-373.
- [20] Feng J, Su Y, Guo Z, *et al.* Identification and expression analysis of a CC chemokine from cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2013, 39(3): 459-469.
- [21] Su Y, Guo Z, Xu L, *et al.* Identification of a cobia (*Rachycentron canadum*) CC chemokine gene and its involvement in the inflammatory response[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(1): 204-210.
- [22] Baoprasertkul P, He C, 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.
- [23] 杨旦阳, 陈炯, 陆新江, 等. 香鱼CCL4-like基因的克隆、序列分析及免疫相关性表达变化分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(5): 676-683.
Yang D Y, Chen J, Lu X J, *et al.* Molecular Cloning, sequences analysis and immune-related expression changes of a CCL4-like gene from Ayu (*Plecoglossus altivelis*)[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2013, 35(5): 676-683(in Chinese).
- [24] Zhang J, Chen X. Molecular characterization of a novel CC chemokine in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and its involvement in modulation of MHC class I antigen processing and presentation pathway[J]. Molecular Immunology, 2008, 45(7): 2076-2086.
- [25] Cheng Y Z, Wang R X, Sun Y N, *et al.* Molecular characterization of miiuy croaker CC chemokine gene and its expression following *Vibrio anguillarum* injection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(1): 148-154.
- [26] Cuesta A, Dios S, Figueras A, *et al.* Identification of six novel CC chemokines in gilthead seabream (*Sparus aurata*) implicated in the antiviral immune response[J]. Molecular Immunology, 2010, 47(6): 1235-1243.
- [27] Dutsch R, Wohlfarth G, Buckel P, *et al.* Cloning and sequencing of the genes of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*[J]. European Journal of Biochemistry, 1989, 181(3): 741-746.
- [28] Chaves-Pozo E, Munoz P, Lopez-Munoz A, *et al.* Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*[J]. Cell and Tissue Research, 2005, 320(1): 61-68.
- [29] Trede N S, Langenau D M, Traver D, *et al.* The use of zebrafish to understand immunity[J]. Immunity, 2004, 20(4): 367-379.
- [30] Press C M, Evensen. The morphology of the immune system in teleost fishes[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9(4): 309-318.
- [31] 任燕, 孙承文, 石存斌, 等. 嗜水气单胞菌毒力因子检测及不同毒力基因型菌株对剑尾鱼的致病性研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(17): 113-117.
Ren Y, Sun C W, Shi C B, *et al.* Detection of virulence genes in *Aeromonas hydrophila* and the pathogenicity of different genotype isolates to swordtail[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(17): 113-117(in Chinese).
- [32] 杜雄伟, 常藕琴, 王晓辉, 等. 嗜水气单胞菌对剑尾鱼的致病性及组织病理学研究[J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2005, 2(2): 53-56.
Du X W, Chang O Q, Wang X H, *et al.* Study on pathogenicity and histopathology of *Aeromonas hydrophila* to *Xiphophorus helleri*[J]. Journal of Yangtze University (National Science Edition), 2005, 2(2): 53-56(in Chinese).
- [33] 王片片, 刘春, 李凯彬, 等. 剑尾鱼IgZ基因的克隆及疫苗免疫对其在组织中表达的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(3): 318-326.
Wang P P, Liu C, Li K B, *et al.* Identification and expression analysis of IgZ gene in swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) responses to vaccine challenges[J]. Journal of fisheries of China, 2015, 39(3): 318-326(in

- Chinese).
- [34] Umasuthan N, Wan Q, Revathy K S, *et al.* Molecular aspects, genomic arrangement and immune responsive mRNA expression profiles of two CXC chemokine receptor homologs (CXCR1 and CXCR2) from rock bream, *Oplegnathus fasciatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 304-318.
- [35] Kim J, Kim E, Kim D, *et al.* Molecular identification and expression analysis of the CC chemokine gene in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and the biological activity of the recombinant protein[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(3): 892-901.
- [36] Wan X, Chen X. Molecular cloning and expression analysis of a CXC chemokine gene from large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, 127(1-2): 156-161.
- [37] Hsu Y, Hou C, Lin S, *et al.* The biofunction of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) CC chemokine ligand 4 (*CCL4*) in innate and adaptive immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(6): 1891-1898.

Identification and expression analysis of two CC chemokines in swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) responses to *Aeromonas hydrophila* challenges

ZHU Chengke¹, WANG Jian¹, CHEN Linghan¹, ZHOU Chaowei¹, LEI Luo¹,
DENG Xingxing¹, LIU Chun², ZHENG Zonglin^{1*}

(1. Key Laboratory of Aquatics Science of Chongqing, Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, Department of Fisheries in Rongchang Campus, Southwest University, Chongqing 402460, China;

2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Chemokines are a large group of small proteins involved in migration, activation, and differentiation of leukocytes and are key regulators of the immune response and inflammatory response. In this study, we cloned and sequenced the cDNA of two CC chemokines (*CCL4* and *CCL19*) from swordtail fish (*X. helleri*). The ORF-length of *CCL4* is 294 nucleotides (nt) encoding a protein of 97 amino acids (aa), and the ORF-length of *CCL19* is 333 nucleotides (nt) encoding a protein of 110 amino acids (aa). Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) analysis revealed both two CC chemokines were constitutively expressed in all tissues examined. The *CCL4* was highly expressed in the spleen, lowly in the muscle and intestine; the *CCL19* had the highest expression in the spleen and the relatively lower level in the heart. After challenge with bacteria, the *CCL4* and *CCL19* shared the same expression trend. In the spleen and liver, the mRNA level increased remarkably at 12 h, which suggested that the two CC chemokines may be involved in the *X. helleri* defense against *A. hydrophila* infection. In summary, this study demonstrates the basic profiles of two CC chemokines in *X. helleri* and chemokines take an important part in inflammatory and immune responses to bacteria. Together, our results also indicate that the *X. helleri* could be utilized as a useful fish model for the research of fish diseases.

Key words: *Xiphophorus helleri*; *CCL4*; *CCL19*; gene cloning; *Aeromonas hydrophila*; expression analysis

Corresponding author: ZHENG Zonglin. E-mail: zhengzonglin@126.com

Funding projects: The Ecological Fishery Industry Technology System of Chongqing (40800115, 40800216); The Youth Foundation of Southwest University Rongchang Campus (20700913)