



中华鲟 *ASDIGIRR* 与 *ASTRAF6* 基因的克隆与表达

张利凤¹, 汤东东¹, 郑楚文¹, 邓丹¹, 郭慧芝^{1,2},
张书环³, 张文兵¹, 许巧情^{1*}, 李宁求^{2*}

(1. 长江大学动物科学学院, 湖北 荆州 434020;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380;

3. 贵州中医药大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 中华鲟是处在硬骨鱼类与软骨鱼类之间的中国古老的珍稀鱼类之一, 但在人工繁殖和养殖过程中, 容易受到不同疾病的危害, 因此, 需要深入研究其免疫调控, 为其疾病预防提供理论依据。单个免疫球蛋白白细胞介素-1受体相关分子(SIGIRR)和肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAFF6)是 toll 样受体(TLR)信号通路的2个重要的信号转导元件。本研究鉴定了中华鲟的 *SIGIRR* 和 *TRAFF6* 的同源物, 分别命名为 *ASDIGIRR* (*Acipenser sinensis* DIGIRR) 和 *ASTRAF6* (*A. sinensis* TRAFF6), 并研究它们在正常组织中的表达和 Poly(I:C) 诱导后的表达模式。结果显示, *ASDIGIRR* 和 *ASTRAF6* 在健康鲟的10个组织中均有表达, 且分别在肠道和头肾组织中表达量最高; 用 Poly(I:C) 孵育中华鲟脾脏细胞后, *ASDIGIRR* 在3h时的表达量显著下调, 在6h时恢复至正常水平, 后在24h显著上调达到最高值, 随后开始下调, 至48h时仍显著高于对照组, 而 *ASTRAF6* 在6h达到最高表达量, 维持到24h后再下调, 48h时下降至最低水平。研究表明, *ASDIGIRR* 和 *ASTRAF6* 在中华鲟抵御病原入侵的免疫防御过程中起着重要作用。

关键词: 中华鲟; *ASDIGIRR*; *ASTRAF6*; Poly(I:C); 基因克隆; 基因表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

SIGIRR(singleimmunoglobulininterleukin-1receptor related molecule) 又称白细胞介素-1受体8(IL-1R8), 属于 IL-1R 家族。细胞外的免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 和细胞内的 Toll/白细胞介素-1受体结构域 (toll/Interleukin-1 receptor domain, TIR) 是 IL-1R 家族成员的共同特征^[1-4]。与 IL-1R 家族的其他成员不同, *SIGIRR* 只有一个胞外 Ig 结构域, 且是 IL-1R 和 TLR 下游信号通路的负调节因子^[4-5]。研究发现, *SIGIRR* 在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中可以通过竞争性募集 TLR3/TLR22 受体上的 β 干扰素

诱导型含 TIR 结构域的接头分子 (TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β , TRIF) 接头蛋白, 在 TRIF 介导的炎症反应中发挥抑制作用^[6]。研究者用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 原代脾脏白细胞时发现, *SIGIRR* 和 *IL-1R10* 的表达模式相似, 都显著下调^[7]。有研究表明, 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、小黄鱼 (*L. polyactis*)^[8]、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、斑绿色河鲀 (*Tetraodon nigroviridis*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[9] 等鱼类中的 *SIGIRR*

收稿日期: 2020-08-24 修回日期: 2020-11-02

资助项目: 农业农村部渔用药物创制重点实验室开放课题 (201906)

第一作者: 张利凤 (照片), 从事鱼类免疫学方向研究, E-mail: 1368674029@qq.com

通信作者: 许巧情, E-mail: xuqiaoqing@yangtzeu.edu.cn; 李宁求, E-mail: liningq@126.com



同源物双个免疫球蛋白白细胞介素-1受体相关分子(double immunoglobulin interleukin-1 receptor related molecule, DIGIRR)的胞外区含有2个Ig样结构域,胞内区含有1个Arg-Tyr突变的TIR结构域,且在高尔基体内有独特的亚细胞分布,并提出“DIGIRR是IL-1R和SIGIRR之间进化的过渡分子,代表了受体和负调控因子之间的联系”这一观点。另外,研究显示,鱼类的DIGIRR是SIGIRR的同源物,也是IL-1介导的信号转导的负调控因子,但在蛋白质结构和亚细胞定位上存在差异^[10]。而TRAF家族的TRAF6(tumor necrosis factor receptor related factor 6)是Toll样受体信号转导中的关键接头分子,参与先天免疫下游信号转导通路^[11-12]。在斑马鱼体内发现,乌鳢弹状病毒(snakehead rhabdovirus, SHRV)可以诱导TRAF6基因表达上调,而迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)可以诱导TRAF6基因的表达^[13]。另外,在青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)等鱼类中,TRAF6可以激活核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)信号转导途径^[13-14]。有研究发现,在石斑鱼(*Epinephelus* sp.)中,过表达TRAF6可以抑制病毒诱导的I型干扰素(IFNs)的产生,调节病毒触发的信号通路和细胞死亡途径^[12]。研究发现,TRAF6基因在草鱼感染多丝线虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)后表达显著上调,表明其可能在草鱼对多丝线虫的防御中起重要作用^[15]。总而言之,SIGIRR对上游的免疫基因起着负调控作用,TRAF6对下游信号通路起着正调控作用,而且两个基因在鱼类免疫中都担任着重要的角色。

现阶段,免疫相关基因SIGIRR和TRAF6在哺乳动物中得到了广泛的研究,但是在鱼类中的研究涉及并不多。中华鲟(*Acipenser sinensis*)是我国一级保护动物,由于人类过度捕捞、建设水利工程等行为,野生中华鲟的数量不断减少,因此,人工增殖放流活动是保护中华鲟的必要途径^[16]。研究发现,中华鲟不仅受分枝杆菌(*Mycobacterium*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)、迟缓爱德华氏菌等细菌性病原的威胁^[17-18],而且对呼肠弧病毒(aquareovirus)、高首鲟腺病毒(white sturgeon adenovirus 1, WSAV-1)、高首鲟虹彩病毒(white sturgeon iridovirus, WSIV)、蛙病毒3(frogvirus3, FV3)等鲟源病毒易感^[19]。本实验主要是通过通过对中华鲟

的ASDIGIRR与ASTRAF6基因克隆及分析、实时荧光定量PCR检测其在不同器官中的表达情况及用双链DNA病毒模拟物Poly(I:C)刺激中华鲟脾脏细胞表达其mRNA,深入探讨中华鲟的ASDIGIRR与ASTRAF6的特征,为中华鲟的免疫性疾病的预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用中华鲟来自中国水产科学研究院长江水产研究所太湖基地,3龄。实验前暂养在水温为20℃左右的循环水系统中2周,每天早晚各投喂2次。中华鲟的脾脏细胞系由本实验室建立并保存。

1.2 实验方法

DNA、RNA提取及反转录 中华鲟的组织样品(如脾脏、头肾)的DNA按照总DNA提取试剂盒(TaKaRa)的方法提取。选取健康中华鲟作为实验材料,分别采集5尾中华鲟的脾脏、血液、鳃、皮肤、脑、心脏、头肾、中肾、肝脏以及肠组织样品,提取RNA并反转录。总RNA的提取按照总RNA提取试剂盒(Solarbio)说明书操作,检测纯度后使用反转录试剂盒制备cDNA,保存于-80℃备用。

基因克隆及序列验证 中华鲟DIGIRR和TRAF6的基因序列来自中华鲟的转录组文库,使用Primer 6.0软件设计中华鲟的DIGIRR与TRAF6基因的特定引物(表1),以验证序列的正确性。以cDNA为模板进行PCR扩增,扩增产物纯化回收后连接至pMD19-T载体(TaKaRa),转入大肠杆菌DH5α(上海生工生物工程有限公司),挑选阳性克隆测序。

基因序列分析 多重序列比对,基因的相似性和一致性分析,预测信号肽、开放阅读框(open reading frame, ORF)和氨基酸序列、蛋白质的二级结构和特定结构域,构建系统发育树,蛋白质理化性质分析等方法均参考已发表文献^[20-21]。

Poly(I:C)诱导细胞 挑选生长状态良好的中华鲟脾脏细胞培养瓶,去除培养基后用1×PBS清洗,实验组加入Poly(I:C),对照组加入1×PBS,放入细胞培养箱中进行诱导,时间设

表 1 本研究所用的主要引物
Tab. 1 Primers used in this study

名称 name	引物序列(5'-3') primer sequences	用途 usage
DIGIRR-F1/R1	ATGGGACGCAAGCCACG/GCCATCGGGGTGGCAGAG	cloning
DIGIRR-F2/R2	GACTGTACAGCACCG/GGTCCACGCATGATGCCG	cloning
DIGIRR-F3/R3	CTGTGAGGATCAGCATGGCAG/GGCGCGGCTGCATGGGCTGT	cloning
DIGIRR-F4/R4	CTGTGAACTCCAAGTCCATG/ATAAATAGGCACTCGAATGC	cloning
TRAF6-F1/R1	ATGGCTAGCTGTGACACAGAGTC/CCTCAGGGATGCAGGACAG	cloning
TRAF6-F2/R2	AGTGTGTCTTTGCCACTGTGGA/TGAGCTCCTCGAACACGATG	cloning
TRAF6-F3/R3	CAGTACACACAGTGGCAGTGCT/AGGTCAAACGTTATGCAGTTG	cloning
DIGIRR-qF/R	AGACCAGGGACAGCAAGC/GGAGACATAGGCATCATAGA	qRT-PCR
TRAF6-qF/R	GCAGGATTACACGCAGAT/ACGGGGCGAAGTGGAGAT	qRT-PCR
β -actin-qF/R	CCTTCTGGGTATGGAATCTTGC/CCCACCTGAGCGTAAATACTCTG	qRT-PCR

置为 3、6、24 和 48 h, 收集样品后提取 RNA 并反转录成 cDNA。

荧光定量分析与检测 以上述反转录的 cDNA 为模板, 按照染料法荧光定量试剂盒说明书 (TaKaRa) 进行 qPCR, 特定的荧光定量引物见表 1, 以中华鲟的 β -actin 为内参基因。

数据分析 用 SPSS 24.0 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 处理荧光定量数据, 数据显示为平均值 \pm 标准差。*代表差异显著 ($P < 0.05$), **代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

2 结果

2.1 中华鲟 ASDIGIRR 与 ASTRAF6 的 cDNA 与氨基酸序列

ASDIGIRR 的 cDNA 全长为 2 368 bp, 包括 324 bp 的 5'非翻译区 (UTR)、400 bp 的 3'-UTR 和 1 644 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 547 个氨基酸。ASTRAF6 的 cDNA 全长为 3 851 bp, 由 526 bp 的 5'-UTR、1 657 bp 的 3'-UTR 和 1 668 bp 的 ORF 组成, 编码 555 个氨基酸。中华鲟的 ASDIGIRR 基因与 ASTRAF6 基因的蛋白质分子量分别为 61.96 和 62.54 ku, 理论等电点 (pI) 分别为 5.10 和 5.64。

2.2 中华鲟 ASDIGIRR 和 ASTRAF6 同源比较与系统进化分析

与其他物种的相似性和一致性比对结果显示, 中华鲟 ASDIGIRR 和 ASTRAF6 的氨基酸序

列都与斑点雀鳢 (*Lepisosteus oculatus*) 的相似性和一致性最高, 表明这两个基因在中华鲟与斑点雀鳢之间的同源性最高。中华鲟 ASDIGIRR 与斑点雀鳢 SIGIRR 的相似性和一致性最高, 达到了 58.4% 和 79.6%, 与其他物种的 SIGIRR (DIGIRR) 的相似性和一致性分别达 40.9% 和 66.7% 以上。中华鲟 ASTRAF6 也与斑点雀鳢 TRAF6 的相似性和一致性最高, 分别为 66.4% 和 73.7%, 与其他物种的 SIGIRR (DIGIRR) 相比, 相似性和一致性分别大于 53.9% 和 63.2%。结果说明 ASDIGIRR 与 ASTRAF6 基因都比较保守 (表 2, 表 3)。

利用 Mega 7.0 软件进行氨基酸序列多重比对和构建系统进化树 (图 1, 图 2)。结果表明, ASDIGIRR 与 ASTRAF6 的氨基酸序列都比较保守, 系统进化树中 ASDIGIRR 和 ASTRAF6 都与鱼类的 SIGIRR (DIGIRR) 和 TRAF6 聚为一支, 并且与斑点雀鳢的亲缘关系最近, 其他物种之间也都符合传统分类学的进化关系。

2.3 中华鲟 ASDIGIRR 与 ASTRAF6 基因结构分析

对中华鲟 ASDIGIRR 与 ASTRAF6 基因 cDNA 与 DNA 进行比对, 绘制 ASDIGIRR 与 ASTRAF6 基因结构框架图, 并计算内含子时相。结果显示, ASDIGIRR 基因含有 10 个外显子与 9 个内含子, ASTRAF6 基因含有 6 个外显子与 5 个内含子 (图 3, 图 4)。中华鲟 ASDIGIRR 基因的外显子和内含子的个数及内含子时相与部分带有的双

表 2 中华鲟 *ASDIGIRR* 与其他物种 *SIGIRR* 或 *DIGIRR* 的相似性 (右上) 和一致性 (左下)Tab. 2 Similarity (top right) and identity (bottom left) of *ASDIGIRR* of *A. sinensis* and *SIGIRR* or *DIGIRR* of other animals

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	%
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>		66.8	75.4	76.2	54.9	49.4	41.3	41.0	40.3	42.4	40.4	41.4	
欧洲鲈 <i>Perca fluviatilis</i>	87.7		77.7	65.5	72.9	45.2	56.3	49.7	54.5	54.4	53.2	52.1	
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	88.7	85.4		73.9	64.8	57.6	48.6	45.3	47.3	48.8	46.1	46.8	
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	81.6	86.4	86.3		54.8	50.4	42.2	40.9	41.3	42.1	42.5	43.3	
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	79.7	80.9	76.7	77.7		64.7	55.0	48.6	53.2	51.9	50.2	52.6	
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	75.1	73.4	71.0	73.6	71.0		55.1	49.3	50.2	54.8	52.4	52.1	
斑点雀鲷 <i>Lepisosteus oculatus</i>	80.0	76.0	72.4	74.3	72.0	72.6		58.4	49.9	51.3	50.1	52.2	
中华鲟 <i>Acipenser sinensis</i>	78.7	79.3	76.4	77.5	74.6	76.4	79.6		48.1	49.1	46.7	48.5	
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	71.7	65.9	66.7	70.8	67.2	65.4	71.2	77.7		58.1	58.3	49.8	
鸡 <i>Gallus gallus</i>	73.8	67.8	70.0	73.1	68.5	69.0	75.3	78.7	70.0		53.5	54.2	
小鼠 <i>Mus musculus</i>	73.6	67.5	69.1	72.7	67.2	66.7	71.4	66.7	67.5	74.2		80.7	
人 <i>Homo sapiens</i>	68.4	71.7	68.9	72.5	67.4	66.1	70.7	76.5	66.8	74.7	88.5		

注: 表中中华鲟与其他物种比对数据加粗, 表头数字编号与第一列物种名依次对应, 下同

Notes: comparison data between (*A. sinensis*) and other species in the table are bolded, and the number of the table head corresponds to the species name in the first column in turn. The same below

表 3 中华鲟 *ASTRAF6* 与其他物种 *TRAF6* 的相似性 (右上) 和一致性 (左下)Tab. 3 Similarity (top right) and identity (bottom left) of *ASTRAF6* of *A. sinensis* and other animals

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>		89.4	85.2	62.8	54.4	54.7	50.9	52.1	47.7	50.9	
橙点石斑鱼 <i>Epinephelus bleekeri</i>	92.7		88.5	63.3	54.2	54.1	48.6	52.4	48.0	51.4	
狭鳞庸鲷 <i>Hippoglossus stenolepis</i>	89.6	91.6		62.4	52.8	54.1	49.3	52.4	48.4	50.1	
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	73.2	73.9	72.7		55.8	57.0	53.8	55.0	50.3	53.2	
斑点雀鲷 <i>Lepisosteus oculatus</i>	64.9	64.3	63.7	63.9		66.4	52.3	54.1	48.6	53.1	
中华鲟 <i>Acipenser sinensis</i>	66.2	65.5	65.7	66.8	73.7		56.4	59.4	53.9	58.1	
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	62.9	61.2	61.6	65.6	62.6	67.4		68.3	60.6	63.8	
鸡 <i>Gallus gallus</i>	63.8	63.7	62.6	63.5	63.6	69.5	76.0		68.1	71.9	
小鼠 <i>Mus musculus</i>	58.2	59.0	58.1	50.5	57.6	63.2	69.9	74.3		82.3	
人 <i>Homo sapiens</i>	62.8	63.7	62.3	63.6	61.9	67.4	74.0	80.6	86.0		

Ig 结构域的鱼类的 *DIGIRR* 基因一致, 且外显子的碱基数目相差不大。而与具有单 Ig 结构域的 *SIGIRR* 基因相比多了第 3 个外显子及内含子, 且第 2~3 个内含子时相存在差异。而 *ASTRAF6* 基因的外显子个数及内含子时相与其他物种完全一致, 第 2~5 个外显子的碱基数目与其他鱼类和哺乳类也完全相同, 其他的外显子碱基数目也

相差不多, 表示其在物种进化上高度保守。

2.4 中华鲟 *ASDIGIRR* 与 *ASTRAF6* 的蛋白质二级结构预测

利用 SMART 预测 *ASDIGIRR* 与 *ASTRAF6* 的蛋白质二级结构 (图 5), *ASDIGIRR* 蛋白质二级结构中含有 2 个 Ig 结构域 (15~133 aa、151~248

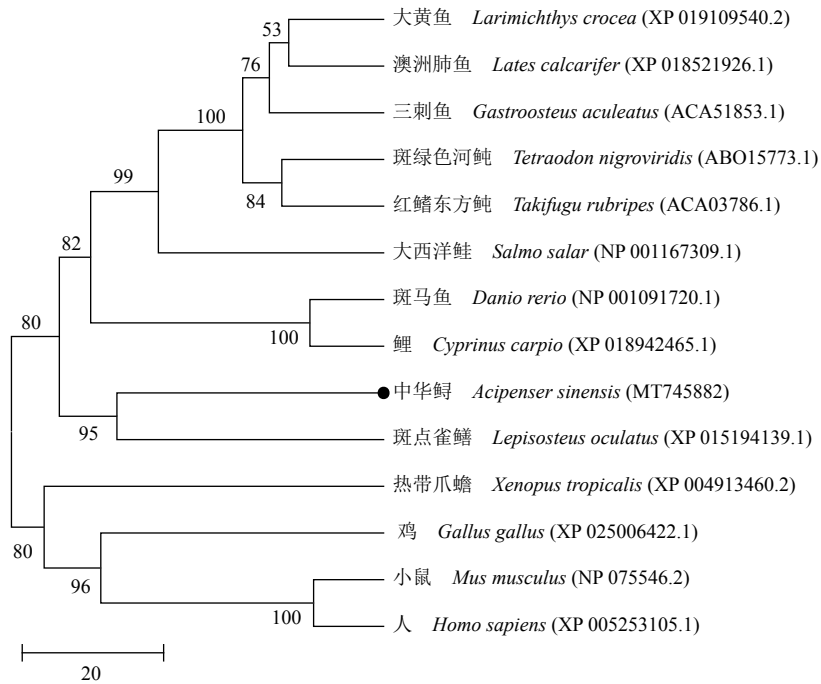


图 1 ASDIGIRR 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of ASDIGIRR amino acid sequences

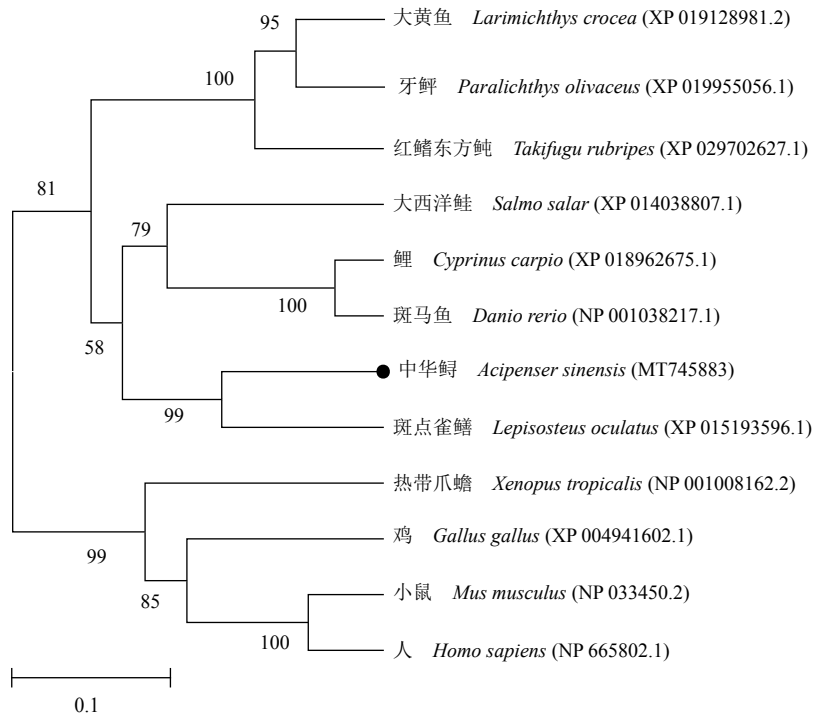


图 2 ASTRAF6 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ASTRAF6 amino acid sequences

aa)、1 个 TIR 结构域 (299~466 aa)、1 个位于氨基酸碳端的信号肽 (1~28 aa), 与大黄鱼、红鳍东方鲀等的 DIGIRR 基因的蛋白二级结构保持高度一致, 而人类与鸡、斑马鱼等的 SIGIRR 蛋白结构

与 ASDIGIRR 相比缺少一个 Ig 结构域。ASTRAF6 的蛋白质二级结构是由 1 个环指 (RING) 结构域 (68~106 aa)、盘绕线圈 (coiled coil) 结构域 (320~381aa) 和 MATH 结构域 (388~515 aa) 组成, 与其

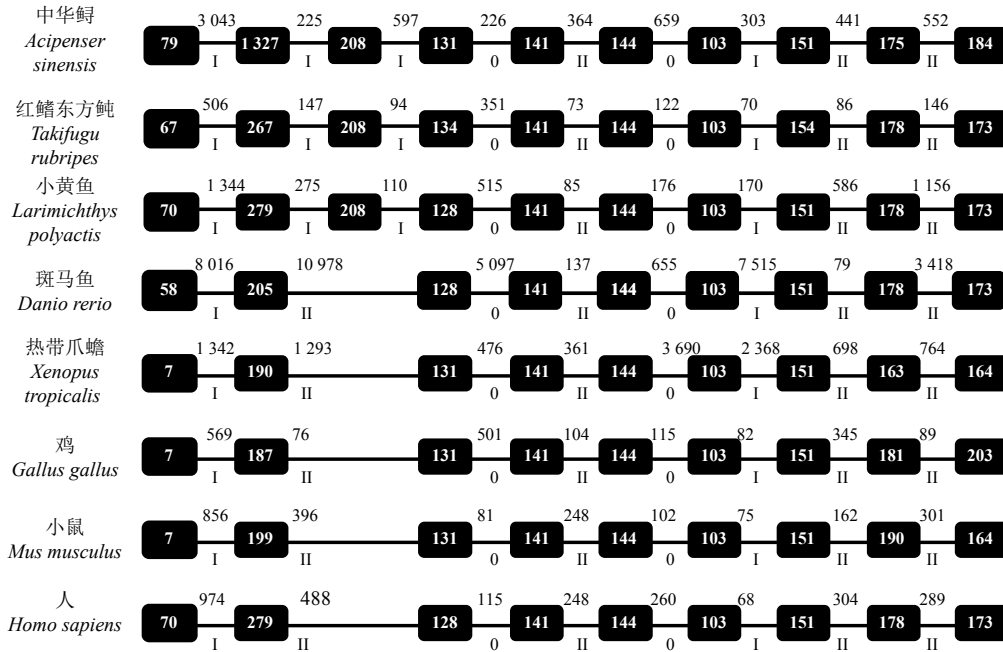


图 3 *ASDIGIRR* 基因与其他动物 *SIGIRR* 或 *DIGIRR* 基因的结构示意图

黑盒代表外显子, 内含子时相以罗马数字显示, 外显子和内含子的碱基对大小分别显示在黑盒中部和黑线的上方, 下同

Fig. 3 Genomic gene organization of *ASDIGIRR* with other animals *SIGIRR* or *DIGIRR*

The black box represents the exon, the intron reality is shown in Roman numerals, and the base pair sizes of the exon and intron are shown in the middle of the black box and above the black line, respectively, the same below

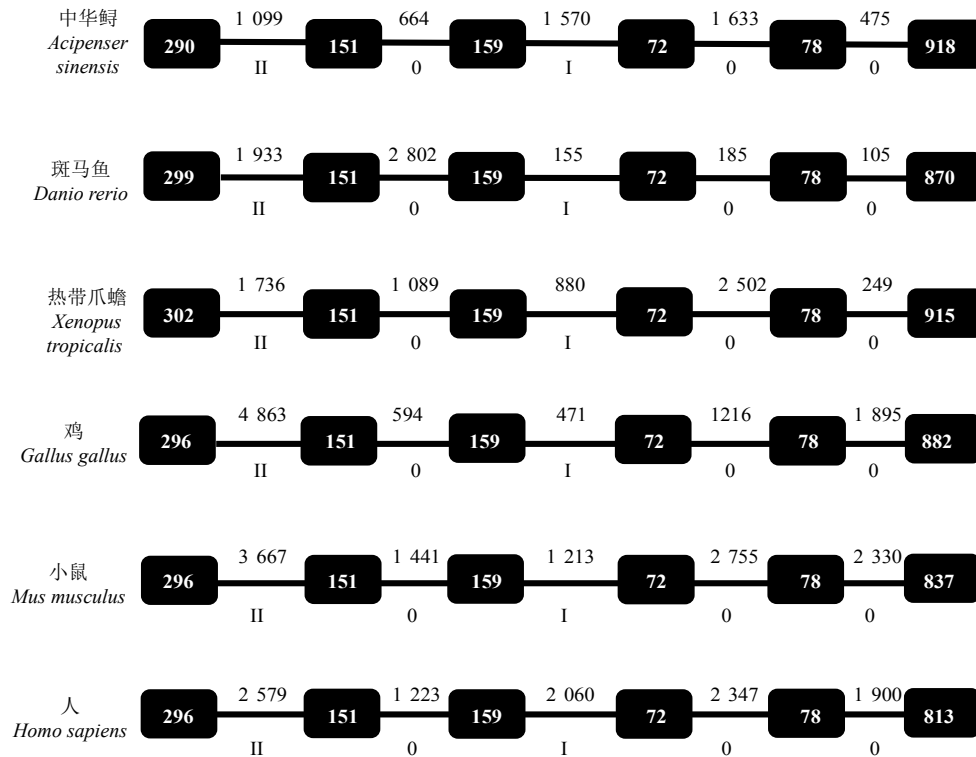


图 4 *ASTRAF6* 基因与其他动物 *TRAF6* 基因的结构示意图

Fig. 4 Genomic gene organization of *ASTRAF6* with other animals *TRAF6*

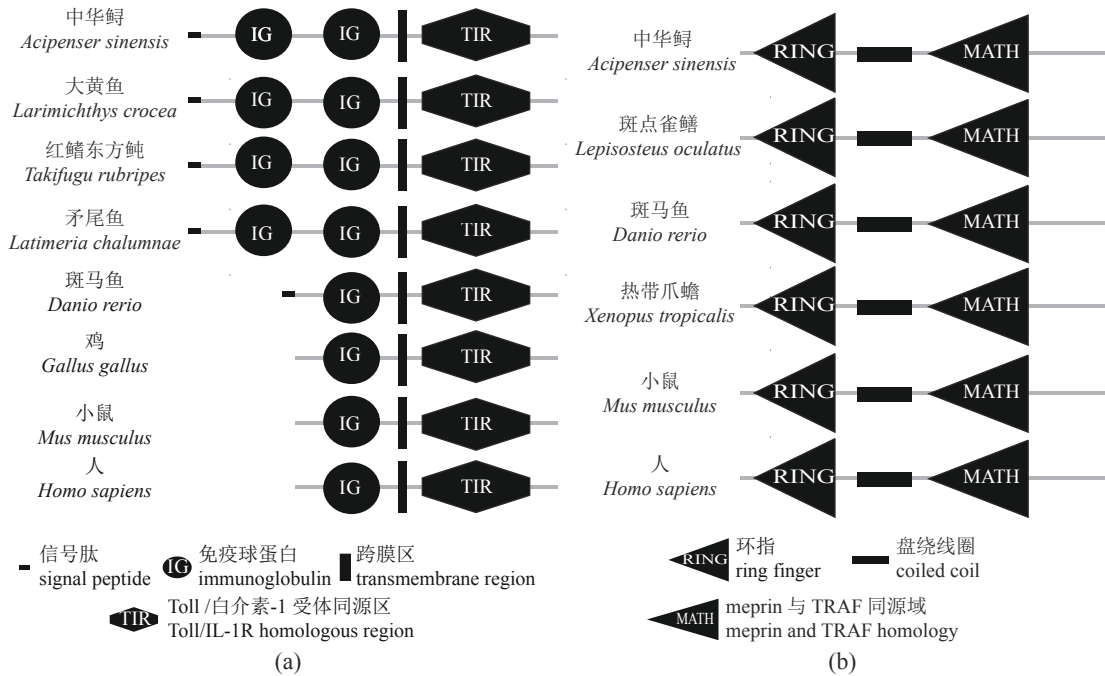


图 5 中华鲟和其他物种的 SIGIRR (DIGIRR) (a) 与 TRAF6 (b) 蛋白的二级结构

Fig. 5 Secondary structure of SIGIRR (DIGIRR) (a) and TRAF6 (b) protein between *A. sinensis* and other species

他鱼类和两栖类、鸟类、哺乳类等完全相同，说明了 *ASTRAF6* 与其他物种 *TRAF6* 基因的一致性和保守性。

2.5 中华鲟 *ASDIGIRR* 与 *ASTRAF6* 的组织表达

实时荧光定量 PCR 检测中华鲟的 *ASDIGIRR* 与 *ASTRAF6* 基因的组织表达特征的结果显

示，2 个基因在 10 种组织中均有表达，但表达量存在明显的差异 (图 6)。 *ASDIGIRR* 在肠中表达量最高，其次在肝脏、鳃和皮肤中表达量较高。 *ASTRAF6* 在头肾中表达量最高，依次是肠、肝脏和鳃。2 个基因均在血液中表达量最低，但中华鲟的 *ASDIGIRR* 与 *ASTRAF6* 基因在不同组织中的表达量存在较大的差异。

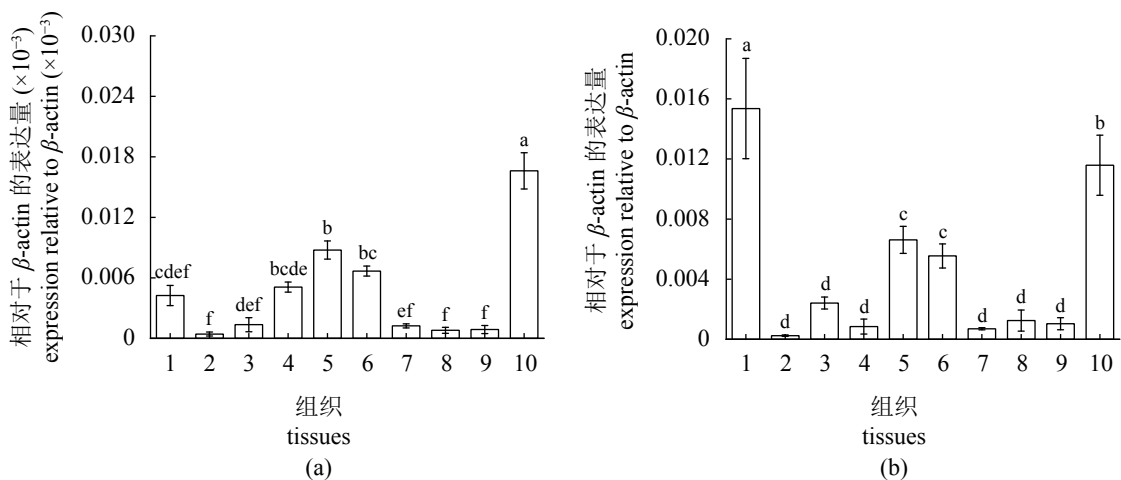


图 6 中华鲟在不同组织中 *ASDIGIRR*(a) 和 *ASTRAF6*(b) 基因的表达量

1~10 分别代表头肾、血液、脑、皮肤、肝脏、鳃、脾脏、中肾、心脏和肠。不同字母间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 6 *ASDIGIRR*(a) and *ASTRAF6* (b) gene expression in various tissue in *A. sinensis*

1 to 10 represents head kidney, blood, brain, skin, liver, gill, spleen, middle kidney, heart and intestine, respectively. The difference between different letters is significant ($P < 0.05$)

2.6 Poly (I:C) 诱导中华鲟脾脏细胞 *ASDIGIRR* 与 *ASTRAF6* 的表达

为了检测出中华鲟的 *ASDIGIRR* 与 *ASTRAF6* 的体外诱导转录水平表达变化, 利用 Poly (I:C) 刺激中华鲟脾脏细胞系, 检测其表达水平。结果显示, 细胞经过诱导之后, *ASDIGIRR* 表达量在 3 h 时显著低于对照组 ($P < 0.01$), 在 6 h 之前逐

渐上升恢复正常水平, 后在 24 h 显著上调 ($P < 0.01$), 达到最高值, 随后开始下调, 但在 48 h 时仍显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而 *ASTRAF6* 表达量相比于对照组的表达量在 3 h 后开始上调, 至 6 h 时达到最大值 ($P < 0.01$) 并维持到 24 h ($P < 0.01$), 后在 48 h 时下降至最低的水平 ($P < 0.01$)(图 7)。

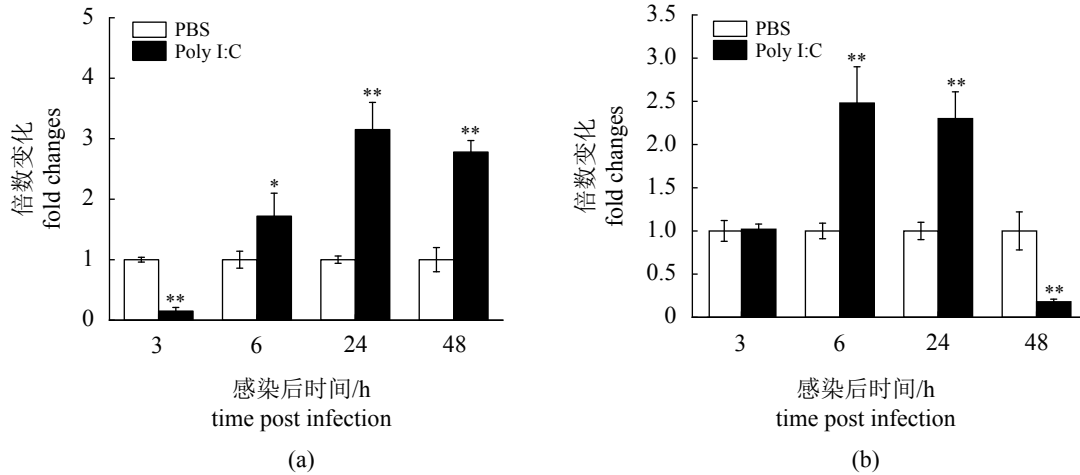


图 7 *ASDIGIRR* (a) 和 *ASTRAF6* (b) 在 Poly(I:C) 诱导后的表达变化

显著性为实验组与对照组的组间比较结果, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 7 Changes of *ASDIGIRR* (a) and *ASTRAF6* (b) expression after induction by Poly(I:C)

The results were compared between the experimental group and the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

TIR 超家族的绝大多数成员是 TLR 和 IL-1 介导的信号通路的正调节因子, 而 TLRs 通路在整个炎症反应和自然防御免疫中起着重要作用^[1]。SIGIRR 是 TIR 超家族的负性调节因子, 可以抑制 NF- κ B、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和 c-Jun 氨基酸末端激酶 (C-Jun N-terminal kinase, JNK) 通路的激活, TRAF6 是 TLR 信号转导过程中的关键适配分子, 可以触发先天免疫下游信号转导通路如 NF- κ B 通路、MAPK 通路、I 型干扰素的产生^[4, 14]。研究发现, *SIGIRR* 与 *TRAF6* 在哺乳动物的先天性免疫与适应性免疫中发挥着重要作用, 但其在鱼类免疫中发挥功能的相关研究报道较少^[7, 12, 22-23]。

与其他物种进行同源比较和系统进化树分析的结果表明, 中华鲟的 *DIGIRR* 和 *TRAF6* 都与斑点雀鲷的相似性和一致性最为相近, 蛋白质相似率也最高, 并且在进化树上聚为一支, 说明中华鲟与斑点雀鲷的同源性最高, 同时表明

SIGIRR 和 *TRAF6* 基因在鱼类中具有保守性^[9, 12]。对 *ASDIGIRR* 和 *ASTRAF6* 基因结构分析的结果表明, *ASDIGIRR* 基因的外显子与内含子数量和时相与带有双 Ig 结构域的鱼类保持一致, 但与人、斑马鱼、热带爪蟾和鸡等单 Ig 的物种相比, 多了第 3 个外显子, 且内含子时相被打断, 说明从鱼类到哺乳类的进化过程中, *SIGIRR* 基因结构演化时出现了变化, 暗示了物种进化可能是基因结构演化的结果^[7, 9, 22]; *ASTRAF6* 基因外显子和内含子的个数及内含子时相与其他物种完全一致, 说明了 *TRAF6* 基因在演化时基因结构的保守性^[24]。对 *ASDIGIRR* 和 *ASTRAF6* 的蛋白二级结构预测结果表明, 与哺乳动物和鸟类不同, *ASDIGIRR* 和红鳍东方鲀、大黄鱼、小黄鱼等大多数鱼类的 *DIGIRR* 一样存在信号肽和双 Ig 结构域, 信号肽的功能主要是引导新合成的蛋白质向分泌通路转移, 其他 IL-1R 亚家族成员如 IL-1R I、IL-1R II、*TIGIRR* 和 IL-18R 等中也有与 *ASDIGIRR* 相似的信号肽, 说明 *ASDIGIRR* 是通

过与 IL-1R 亚家族成员相似的保守途径转运到细胞膜中的, 而 Ig 结构域和 TIR 结构域也是 TLRs 受体亚家族的共同特征^[6,8]。有研究认为, IL-1R、DIGIRR 和 SIGIRR 的 Ig 样结构域的数量依次为 3、2 和 1, 推测 DIGIRR 是 IL-1R 和 SIGIRR 之间的“过渡分子”, DIGIRR 可能是脊椎动物进化过程中从有效受体向负调控因子转变的早期例子^[9]。而 ASTRAF6 的蛋白二级结构不仅与斑点雀鳊、斑马鱼等鱼类保持一致, 还与人类等哺乳动物一致, 说明 TRAF6 的功能区域在进化上的保守性。在对石斑鱼、草鱼、斑马鱼等的研究中发现, 用病毒和细菌感染鱼体后, TRAF6 表达上调, 作用机制主要是依靠 RING 基序的 E3 泛素连接酶的活性来发挥的, 表明 TRAF6 在鱼类对外来的病原体的免疫中发挥重要作用, 且中华鲟的 TRAF6 的蛋白质二级结构与这些鱼完全一致, 预测其也存在对外来病原体的免疫功能^[15,25-26]。

组织表达结果显示, ASDIGIRR 在肠组织中表达量最高, ASTRAF6 在头肾中表达量最高, 2 个基因都在血液中表达量最低, 且在中华鲟免疫相关组织中表达量较高。ASDIGIRR 在肠道组织的高表达说明其可能参与了黏膜免疫, 对于外来的病原具有一定的免疫作用。而在斑马鱼和草鱼中, SIGIRR 在肝脏与肾脏组织中表达量最高, 都是在免疫组织中高表达^[6-7]。在对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 的研究中发现, TRAF6 在脾脏中表达量最高^[27], ASTRAF6 与草鱼研究结果一致, 在头肾中表达量最高^[15], 头肾是鱼类巨噬细胞与淋巴细胞的聚集地, 也是细胞免疫与体液免疫的中心, TRAF6 在头肾中表达量最高可能与发挥免疫预防作用有关。

为了探究外来病原侵袭时 ASDIGIRR 与 ASTRAF6 基因的免疫防护作用, 本实验用 Poly (I:C) 模拟病毒来刺激中华鲟脾脏细胞系, 检测 ASDIGIRR 与 ASTRAF6 的表达效果。结果显示, Poly (I:C) 的刺激能够影响 ASDIGIRR 与 ASTRAF6 的表达。ASDIGIRR 的表达量在 3 h 时显著下调, 在 6 h 时显著上调, 在 24 h 时达到最高值, 随后表达量缓慢下降, 与 Poly (I:C) 刺激草鱼脾脏细胞的结果一致^[7]。可能是由于外来病原侵袭引起机体 IL-1 信号通路和脂多糖诱导的 NF- κ B 的激活, 而 ASDIGIRR 是 IL-1、TLR3 和 NF- κ B 信号通路的负调控因子, 先被抑制表达, 之后高表达, 从而

抑制机体炎症反应, 且抑制时间维持的较长, 作用机制可能与斑马鱼的 SIGIRR 严重抑制肝脏的炎症反应相同^[6]。ASTRAF6 在 6~24 h 显著上调表达, 在 48 h 时显著下调, 这一结果与淇河鲫 (*Carassius carassius* var. *Qihe*)、褐点石斑鱼 (*E. tauvina*) 中 Poly (I:C) 能够显著诱导 TRAF6 上调的结果一致^[26,28], 另外也与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼、尼罗罗非鱼实验中外来病原感染后 TRAF6 表达显著上调的结果一致^[23,27,29], 表明 TRAF6 在鱼类免疫中发挥重要作用。ASTRAF6 可能通过参与病毒和细菌感染后的 TLR 信号通路, 抑制外来的病原刺激。

参考文献 (References):

- [1] Anselmo A, Riva F, Gentile S, *et al.* Expression and function of IL-1R8 (TIR8/SIGIRR): a regulatory member of the IL-1 receptor family in platelets[J]. *Cardiovascular Research*, 2016, 111(4): 373-384.
- [2] Garlanda C, Anders H J, Mantovani A. TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization[J]. *Trends in Immunology*, 2009, 30(9): 439-446.
- [3] Molgora M, Bonavita E, Ponzetta A, *et al.* IL-1R8 is a checkpoint in NK cells regulating anti-tumour and antiviral activity[J]. *Nature*, 2017, 551(7678): 110-114.
- [4] Thomassen E, Renshaw B R, Sims J E. Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily[J]. *Cytokine*, 1999, 11(6): 389-399.
- [5] Li L, Wei J X, Li S, *et al.* The deubiquitinase USP13 stabilizes the anti-inflammatory receptor IL-1R8/Sigirr to suppress lung inflammation[J]. *EBioMedicine*, 2019, 45: 553-562.
- [6] Feng W, Gu Y F, Nie L, *et al.* Characterization of SIGIRR/IL-1R8 homolog from zebrafish provides new insights into its inhibitory role in hepatic inflammation[J]. *The Journal of Immunology*, 2016, 197(1): 151-167.
- [7] Gao J D, Jiang X Y, Wang J Y, *et al.* Phylogeny and expression modulation of interleukin 1 receptors in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 99: 103401.
- [8] Zhou R X, Song W H, Liu X Z, *et al.* DIGIRR as a member of the toll/IL-1R family negative regulates NF-

- κ B signaling pathway in miiuy croaker[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 100: 378-385.
- [9] Gu Y F, Fang Y, Jin Y, *et al.* Discovery of the DIGIRR gene from teleost fish: a novel Toll-IL-1 receptor family member serving as a negative regulator of IL-1 signaling[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(5): 2514-2530.
- [10] Garlanda C, Riva F, Bonavita E, *et al.* Decoys and regulatory "Receptors" of the IL-1/Toll-Like receptor superfamily[J]. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4: 180.
- [11] Lu Y L, Li C H, Zhang P, *et al.* Two adaptor molecules of MyD88 and TRAF6 in *Apostichopus japonicus* Toll signaling cascade: molecular cloning and expression analysis[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 498-504.
- [12] Wei J G, Zang S Q, Xu M, *et al.* TRAF6 is a critical factor in fish immune response to virus infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 6-12.
- [13] Phelan P E, Mellon M T, Kim C H. Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Molecular Immunology*, 2005, 42(9): 1057-1071.
- [14] Jiang S, Xiao J, Li J, *et al.* Characterization of the black carp TRAF6 signaling molecule in innate immune defense[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 147-158.
- [15] Zhao F, Li Y W, Pan H J, *et al.* Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) TRAF6 and TAK1: molecular cloning and expression analysis after *Ichthyophthirius multifiliis* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(6): 1514-1523.
- [16] 罗江, 杜浩, 危起伟, 等. 濒危中华鲟人工群体的繁殖生物学[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(3): 269-276.
- Luo J, Du H, Wei Q W, *et al.* Reproductive biology of an artificial population of endangered Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(3): 269-276(in Chinese).
- [17] 田甜, 张德志, 杜合军. 中华鲟主要细菌性疾病及其临床诊断与防控[J]. *水产科学*, 2018, 37(6): 800-805.
- Tian T, Zhang D Z, Du H J. Clinical diagnosis and treatment on main bacterial diseases in Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(6): 800-805(in Chinese).
- [18] 田甜, 张建明, 张德志. 4种长江珍稀鱼类常见疾病快速巡查检索表的构建[J]. *水产科技情报*, 2020, 47(1): 49-55.
- Tian T, Zhang J M, Zhang D Z. Construction of quick diagnosis and search table for common diseases of four rare fishes in the Yangtze River[J]. *Fisheries Science and Technology Information*, 2020, 47(1): 49-55(in Chinese).
- [19] 江南, 范玉顶, 周勇, 等. 鲟病原性疾病研究现状概述[J]. *水生态学杂志*, 2016, 37(2): 1-9.
- Jiang N, Fan Y D, Zhou Y, *et al.* Overview of sturgeon pathogenic disease research[J]. *Journal of Hydroecology*, 2016, 37(2): 1-9(in Chinese).
- [20] 胡伟, 许巧情, 郭慧芝, 等. 达氏鲟自噬基因 *MAP1LC3B* 克隆及其组织表达分析[J]. *南方农业学报*, 2020, 51(2): 445-452.
- Hu W, Xu Q Q, Guo H Z, *et al.* Cloning and expression of autophagy-related gene *MAP1LC3B* in Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*)[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(2): 445-452(in Chinese).
- [21] 王济秀, 张锋, 王卫民, 等. 团头鲂 *tf* 和 *tfr1a* 基因启动子克隆及转录调控分析[J]. *水产学报*, 2020, 44(4): 528-538.
- Wang J X, Zhang F, Wang W M, *et al.* Cloning and transcriptional regulation of *tf* and *tfr1a* promoters in *Megalobrama amblycephala*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(4): 528-538(in Chinese).
- [22] Eggsetøl H Ø, Lunde H S, Knutsen T M, *et al.* Interleukin-1 ligands and receptors in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.): molecular characterization, phylogeny, gene expression, and transcriptome analyses[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 502.
- [23] Jang J H, Kim H, Cho J H. Molecular cloning and functional characterization of TRAF6 and TAK1 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 927-936.
- [24] Cai S H, Huang Y C, Wang B, *et al.* Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) participates in peroxinectin gene expression in *Fenneropenaeus penicillatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 64: 193-201.
- [25] Stockhammer O W, Rauwerda H, Wittink F R, *et al.* Transcriptome analysis of Traf6 function in the innate immune response of zebrafish embryos[J]. *Molecular*

- Immunology*, 2010, 48(1-3): 179-190.
- [26] Wei J G, Guo M L, Gao P, *et al.* Isolation and characterization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) from grouper, *Epinephelus tauvina*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(1): 61-68.
- [27] Wang Z W, Huang Y, Li Y, *et al.* Biological characterization, expression, and functional analysis of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 497-504.
- [28] Zhang J, Zhu Y C, Chen Z, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *MyD88* and *TRAF6* in Qihe crucian carp *Carassius auratus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 829-838.
- [29] Ordas A, Kanwal Z, Lindenberg V, *et al.* MicroRNA-146 function in the innate immune transcriptome response of zebrafish embryos to *Salmonella typhimurium* infection[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 696.

Cloning and expression of *ASDIGIRR* and *ASTRAF6* genes of *Acipenser sinensis*

ZHANG Lifeng¹, TANG Dongdong¹, ZHENG Chuwen¹, DENG Dan¹, GUO Huizhi^{1,2},
ZHANG Shuhuan³, ZHANG Wenbing¹, XU Qiaoping^{1*}, LI Ningqiu^{2*}

(1. School of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434020, China;

2. Guangdong Key Laboratory of Aquatic Animal Immunization Technology, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510380, China;

3. Basic Medical College, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract: *Acipenser sinensis* is one of the ancient and rare fishes in China between teleost fish and cartilaginous fish, but it is vulnerable to different diseases in the process of artificial reproduction and culture, so it is necessary to deeply study the immune regulation of *A. sinensis* to provide theoretical basis for its prevention of diseases. A single Ig-IL-1R-related molecule (SIGIRR) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) are two important signal transduction elements in the signal transduction pathway of toll-like receptors. In this study, homologues of *SIGIRR* and *TRAF6* of *A. sinensis*, named *ASDIGIRR* and *ASTRAF6*, were identified, and their expression levels in normal tissues and Poly (I:C) induced expression were investigated. Results show that *ASDIGIRR* and *ASTRAF6* were expressed in 10 tissues of healthy sturgeon, and the highest expression was found in intestinal tract and head kidney, respectively. After incubating *A. sinensis* spleen cells with Poly(I:C), the expression of *ASDIGIRR* was significantly down-regulated at 3 h, and returned to the normal level at 6 h, then increased to the highest level at 24 h and then decreased, and at 48 h still higher than the control group. While the expression of *ASTRAF6* reached the highest level at 6 h, and maintained till 24 h, then decreased to the lowest level at 48 h. The results show that *ASDIGIRR* and *ASTRAF6* play an important role in the immune defense of *A. sinensis* against pathogen invasion.

Key words: *Acipenser sinensis*; *ASDIGIRR*; *ASTRAF6*; Poly(I:C); gene cloning; gene expression

Corresponding authors: XU Qiaoping. E-mail: xuqiaoping@yangtzeu.edu.cn;

LI Ningqiu. E-mail: liningq@126.com

Funding project: Open Project of The Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (201906)