



大黄鱼肿瘤抑制因子 cylindromatosis (*LcCYLD*) 的序列与免疫反应特征及其功能

张萌, 罗云江, 姚翠鸾*
(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 为研究大黄鱼肿瘤抑制因子 cylindromatosis (CYLD) 在免疫反应中的作用, 本实验克隆了大黄鱼 *CYLD* 的全长 cDNA (命名为 *LcCYLD*) 并对其进行了序列分析; 采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 的方法对大黄鱼各组织及免疫刺激后的大黄鱼肾细胞系中的 *LcCYLD* 表达变化进行检测; 构建了重组表达载体 pTurboGFP-CYLD 及 pcDNA3.1-CYLD, 分别用于亚细胞定位实验及过表达实验; 在 HEK293T 细胞系中过表达 *LcCYLD* 后采用双荧光素酶报告系统检测了 *NF-κB*、*TNF-α* 及 *IL-1β* 启动子活性的变化。结果显示, *LcCYLD* 的 ORF 包含 2 754 bp, 编码 917 个氨基酸, 推测具有保守的 3 个 N 端的 CAP-GLY 结构域, 1 个磷酸化区域和 1 个 C 端的 UCH 结构域, 多序列比对结果显示各物种 CYLD 间高度保守; 系统进化分析显示, *LcCYLD* 与来源于其他硬骨鱼的 CYLD 聚为一支, 其中与条纹狼鲈的 CYLD 关系最近; 转录水平表达分析发现, *LcCYLD* 在大黄鱼各组织均有表达, 其中在脑中表达量最高; LPS 及 poly I:C 刺激能够显著诱导 *LcCYLD* 的表达; 亚细胞定位实验表明 *LcCYLD* 在细胞质及细胞核中均有表达; 过表达 *LcCYLD* 能够显著抑制 *NF-κB* 及促炎细胞因子 *TNF-α* 及 *IL-1β* 的转录激活。以上研究结果表明, 大黄鱼 *CYLD* 能够抑制 *NF-κB* 的转录激活, 为深入了解 *LcCYLD* 在大黄鱼先天免疫信号转导中的作用奠定基础。

关键词: 大黄鱼; 肿瘤抑制因子; 亚细胞定位; 过表达; 免疫; 抑制

中图分类号: S 943

文献标志码: A

近年来, 病害频发对养殖鱼类的威胁加剧, 由此导致的经济损失也逐年增加^[1-2]。先天性免疫反应在鱼类抵抗水体中的病毒、细菌、真菌、寄生虫等病原侵染的第一道防线中发挥极为重要的作用。先天性免疫主要通过一系列模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 发挥作用。研究表明, 包括 Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs)、RIG 样受体 (RIG like receptors, RLRs) 及 NOD 样受体 (NOD like receptors, NLRs) 在内的多个受体途径, 通过识别病原

进而激活 *NF-κB* 或 *MAPK*, 诱发炎症反应, 达到清除病原的目的^[3-5]。但是, 抗病免疫的持续激活会导致细胞内产生大量的炎症分子, 也会对机体产生巨大伤害。因此, 免疫反应中的负调控因子在免疫调节中的作用极其重要。

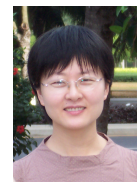
肿瘤抑制因子 cylindromatosis (CYLD) 是在哺乳动物中发现的一种去泛素化酶, 通过对细胞内信号分子的泛素化及去泛素化调控而调节关键分子的活性, 导致一系列生理变化^[6]。研究发现, 在先天性抗病免疫反应过程中, CYLD 通过与 *NF-κB* 必需调节因子 (*NF-κB* essential modulator, NEMO,

收稿日期: 2021-04-08 修回日期: 2021-05-06

资助项目: 福建省重大专项 (2020NZ08003)

第一作者: 张萌, 从事鱼类分子免疫学研究, E-mail: 969116585@qq.com

通信作者: 姚翠鸾 (照片), 从事免疫应答调控信号传导机理方面研究, E-mail: clyao@jmu.edu.cn



又名 IKK γ 及肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumour necrosis factor (TNF) receptor-associated factors, TRAF6) 相互作用, 并对二者进行去泛素化, 进而对 NF- κ B 介导的相关信号分子进行负调控^[7-9]。

在哺乳动物及黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中的研究表明, *CYLD* 在免疫调控、细胞分化及发育中具有重要作用^[8-11]。但是, 关于硬骨鱼 *CYLD* 的分子结构及功能的研究还非常少。目前, 仅有最近 Jang 等^[12] 报道了虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) *CYLD* 的 cDNA 序列, 并发现迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 和海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 的人工感染, 可以显著诱导虹鳟 *CYLD* 的转录表达水平提高。进一步研究表明, 虹鳟 *CYLD* 能够抑制 NF- κ B 及促炎细胞因子启动子的激活, 提示 *CYLD* 可能在鱼类的免疫调控中发挥重要作用。但是, 目前还尚未见其他鱼类 *CYLD* 的结构及功能的报道。

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国网箱养殖量最大的海水鱼类, 近年来由于病害频发使得其养殖行业遭受了巨大经济损失, 但是目前尚无安全有效的防治方法。因此, 对于其抗病免疫机制的深入研究就尤为重要。本团队前期研究表明, TLR 信号通路在大黄鱼抵御外界病原入侵中发挥重要作用^[13-15], 但其持续激活可能会诱发免疫损伤, 因此, 免疫反应的负调控显得尤为重要。

本研究克隆了大黄鱼 *CYLD* 的 cDNA 序列, 分析了其分子结构及保守结构域; 检测了其在在大黄鱼组织及免疫反应中的时空表达变化; 构建了 pTurboGFP-CYLD 真核表达质粒, 用于大黄鱼 *CYLD* 在细胞内的亚细胞定位实验; 构建了 pcDNA3.1-CYLD 过表达质粒, 用于研究细胞内 *CYLD* 过表达对 TLR 通路关键免疫分子 NF- κ B 及促炎细胞因子 *TNF- α* 及 *IL-1 β* 的转录激活的调控作用, 研究结果将为阐明 *LcCYLD* 在鱼类先天性免疫中的作用提供科学数据。

1 材料与方法

1.1 实验大黄鱼、细胞系及免疫刺激

实验大黄鱼产自福建宁德, 体质量 (77.2 ± 20.8) g, 体长 (16.7 ± 2.3) cm。于采样区相同环境 (密度 40 尾/ m^3 , 温度 17~19 °C, 盐度 25~26) 暂养 1 周后进行实验。

取 6 尾大黄鱼进行组织及血细胞样品的采集。首先采用断尾方式取血, 将血液与柠檬酸钠 1 : 1

(体积比) 混合, 4 °C 800 \times g 离心 5 min 收集血细胞; 然后对大黄鱼进行解剖, 取肌肉、鳃、皮肤、肝脏、脾脏、心脏、肾脏、胃、肠、头肾及脑等组织样品; 所有样品分离后立刻置于液氮中, 然后置于 -80 °C 保存, 用于总 RNA 提取。

HEK293T 细胞系来源于人胚胎肾细胞系, 采用 DMEM 培养基 37 °C CO₂ 培养箱常规培养; 大黄鱼肾细胞 (LCK) 细胞株来源于大黄鱼肾脏细胞, 采用 DME-F/12 培养基于 28 °C CO₂ 培养箱进行培养。

参照本实验室之前的报道, 以脂多糖 (LPS)、鞭毛蛋白 (flagellin)、双链 RNA (poly I:C) 及肽聚糖 (PGN) 作为病原模拟物, 对 LCK 细胞进行免疫刺激。具体过程: 将数量约为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 的 LCK 细胞传至 6 孔细胞培养板, 培养 24 h 待其贴壁后, 采用上述病原模拟物进行免疫刺激, 以磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 作为空白对照, 剂量及操作参照 Bao 等^[15] 的方法。每组设定 3 个生物学重复, 分别在免疫刺激后 6、12、24 和 48 h 取样, 细胞加入 500 μ L/孔 RNA 裂解液冰上裂解细胞, -80 °C 保存。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

总 RNA 提取使用 Easstep[®] Super Total RNA Extraction Kit (Promega, 美国), 琼脂糖凝胶电泳检测 18S *rRNA*、28S *rRNA* 完整性, 并采用 Nano-drop 测定 RNA 浓度后用 GoScript[™] Reverse Transcription System GoScript[™] Reverse Transcription System (Promega, 美国) 进行 cDNA 第一链的合成, 具体操作按说明书进行。

1.3 *LcCYLD* 的 cDNA 克隆及序列分析

根据本实验室测得的大黄鱼转录组数据库, 设计引物 pcDNA3.1-CYLD-F 和 pcDNA3.1-CYLD-R (表 1)。以大黄鱼组织 cDNA 为模板, 退火温度 60 °C, PCR 扩增 *LcCYLD* 的开放阅读框 (ORF) 序列, 测序验证后进行下一步分析及实验。

从 NCBI 网站获取用于同源比对分析及进化树构建的序列, 使用 EMBSSNeedle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) 进行序列同源比对, 采用 EXPASY (<http://www.expasy.org>) 预测氨基酸序列, SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 分析蛋白质结构域, 采用 MEGA7.0 软件, 用邻位相连法构建进化树 (置信值 1 000)。

1.4 实时荧光定量 PCR (qPCR)

以大黄鱼的不同组织的 cDNA 为模板, 采用

表 1 本研究所用引物序列

Tab. 1 The sequences of primers used in the study

引物 primers	序列 (5'-3') sequences (5'-3')	用途 purposes
pcDNA3.1-CYLD-F	CCGCTCGAGCGATGAGCTC TGCTCTGTGGAG	基因克隆及 过表达
pcDNA3.1-CYLD-R	CCGGAATTCTCTGTACAG GCTCATGGTCG	cloning, overexpression
pT-CYLD-F	CTCGAGATGAGCTCTGCTC TGTGGAG	亚细胞定位
pT-CYLD-R	GAATTCGCTTGTACAGGCT CATGGTCG	subcellular localization
RT-CYLD-F	AGGAAGAGTGCCCTGGTTGC (qPCR)	
RT-CYLD-R	TGGCGGAGTGTCTCGTGTA	
qLc β -actin-F	TTACTCCTCACCACCACAG	内参
qLc β -actin-R	ATTCCGCAAGATTCCATAC	internal references

qPCR 检测 *LcCYLD* 在大黄鱼各组织的表达量; 以不同免疫刺激后的 LCK 细胞 cDNA 为模板, 检测 *LcCYLD* 免疫刺激后的表达变化。引物 RT-CYLD-F、RT-CYLD-R 序列见表 1。扩增程序参考 Bao 等^[15] 的方法, β -actin 作为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算 *LcCYLD* 在转录水平的相对表达量。

1.5 质粒构建

利用含有 *Xho* I、*Eco*R I 酶切位点的 *CYLD* 正反向引物 pT-CYLD-F/R 和 pcDNA3.1-CYLD-F/R, 将不含有终止密码子的 *LcCYLD* ORF 分别克隆到 pTurboGFP-N 载体 (Evrogen, 俄罗斯) 和 pcDNA3.1/myc-His(-)A 载体 (Invitrogen, 美国) 中, 构建亚细胞定位和过表达的载体, 分别命名为 pTurboGFP-CYLD 和 pcDNA3.1-CYLD。对插入片段进行测序验证。

1.6 *LcCYLD* 的亚细胞定位及蛋白免疫印迹 (Western blot) 验证

将数量约为 3×10^5 个/mL 的 HEK293T 细胞传至 6 孔板, 37 °C 培养 20 h 后, 每孔加入 2 μ g 质粒 (pTurboGFP-CYLD 或空载 pTurboGFP-N) 按照 Lipofectamine (Lipo) 3000 (Invitrogen, 美国) 说明书进行转染。转染 24 h 后加入 Hoechst 33342 (Sigma, 美国) 室温染色 15 min。使用激光共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, Leica, 德国) 采集图像。收集细胞, 使用 RIPA 进行裂解, 经 12% SDS-PAGE 分离蛋白质并转印至 PVDF 膜, 通过 Western blot 验证融合蛋白 *LcCYLD*-GFP 的表达, 一抗为 anti-GFP 抗体 (AG279), 二抗为辣根过氧化物 (HRP) 标记的山羊抗兔抗体 (A0208), 所有抗体均购自上海碧云天生物技术有限公司,

使用 ECL 发光液 (Advansta, 美国) 进行显色, 通过 ImageQuant Las 4000 mini 成像系统 (General Electric, 美国) 观察显色结果。

1.7 *LcCYLD* 的过表达及 Western blot 验证

HEK293T 细胞培养及传代方法同上, 每孔加入 2 μ g pcDNA3.1-CYLD 或空载 pcDNA3.1 质粒, 以 Lipo 3000 进行转染。转染 24 h 后收集并裂解细胞, 12% SDS-PAGE 分离蛋白质后, 转印至 PVDF 膜进行 Western blot 分析, 一抗为 anti-C-myc 单克隆抗体 (AM926), 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠抗体 (A0216), 显色方法及结果观察同上, 验证 *LcCYLD* 的过表达。

1.8 免疫刺激及双荧光素酶报告分析

将 HEK293T 细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种到 24 孔板中, 37 °C, 5% CO₂ 培养过夜。使用 Lipo 3000 将 100 ng pcDNA3.1-CYLD (100 ng 空质粒作为对照) 和 100 ng pNF- κ B-luc 启动子 (Clontech, 美国) 或实验室构建的 pGL4-IL-1 β -pro 或 pGL4-TNF α -pro 启动子和 10 ng pRL-TK (Promega, 美国) 转染细胞 24 h, 分别使用 5 μ g/mL 的 LPS 或 500 ng/mL 的 poly I:C 刺激细胞, 对照组加入相同体积的 1 \times PBS。使用双荧光素酶报告试剂盒 (Vazyme, 南京), 根据说明书对样品进行收集及检测。荧光素酶活性通过 GloMax[®]20/20 光度计 (Promega, 美国) 进行测定, 以海肾荧光素酶活性标准化, 计算目标基因的表达量。

1.9 数据处理

除非特别说明, 所有实验均为 3 个重复 ($n=3$), 使用 SPSS 18.0 单因素方差 (One-Way ANOVA) 对数据进行分析, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。通过 GraphPad Prism 5 作图。

2 结果

2.1 *LcCYLD* cDNA 序列分析

本实验获得了 2 754 bp 的大黄鱼 *CYLD* 全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: MW197160), 命名为 *LcCYLD*。生物信息学分析表明, *LcCYLD* 编码 917 个氨基酸, 预测的相对分子量为 103 ku, 理论等电点为 5.63。推测的大黄鱼 *CYLD* 共有 5 个结构域, 包括 3 个保守的 CAP_GLY 结构域, 分别位于 123~199 aa、231~302 aa 和 433~501 aa, 1 个磷酸化区域 (336~432 aa) 和 1 个 C 端 UCH

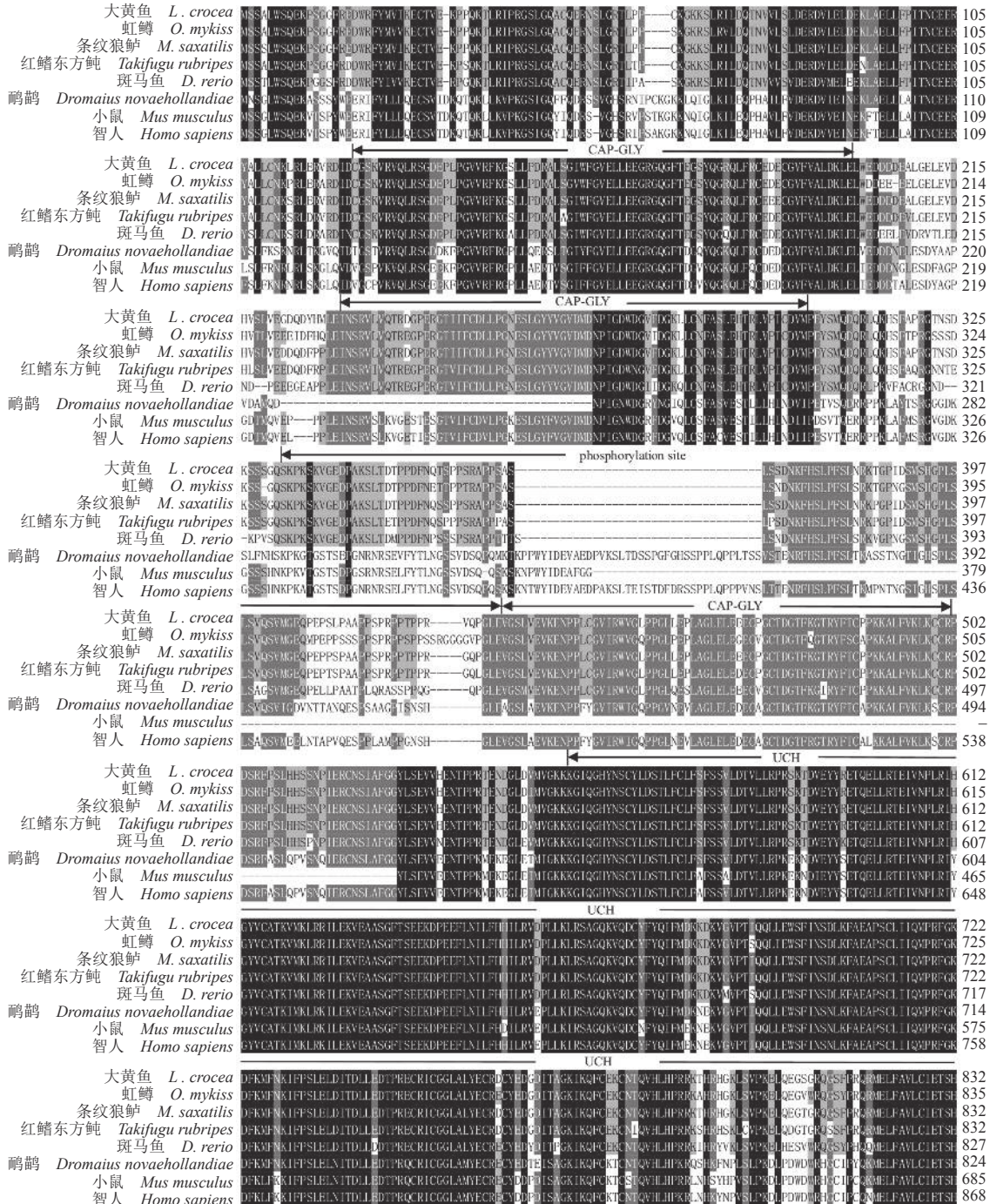
结构域 (553~859 aa)。多重序列比对结果显示,不同物种之间 CYLD 具有较高的保守性,其中以位于 C 端的 UCH 结构域最为保守 (图 1-a)。系统进化分析显示,大黄鱼 CYLD 与来源于其他硬骨鱼的 CYLD 聚为一支,其中,与条纹狼鲈 (*Morone saxatilis*)CYLD 同一性为 98.4%,进化关系最近,与斑马鱼 (*Danio rerio*)CYLD 的同一性为 87.5%,与其他脊椎动物 CYLD 的同一性约为 51.9%~69.1% (图 1-b)。

2.2 *LcCYLD* 组织表达特征

qPCR 研究表明, *LcCYLD* 广泛存在于大黄鱼多个组织,其中在脑中表达最高,其次为血细胞、肠与肝脏,其他组织中表达量较低 (图 2)。

2.3 免疫刺激后 *LcCYLD* 表达变化

采用 LPS 刺激后, *LcCYLD* 转录表达水平在 6 h 达到最大值,约为对照组的 3.7 倍 ($P < 0.01$),



(a) (图 1 Fig. 1)

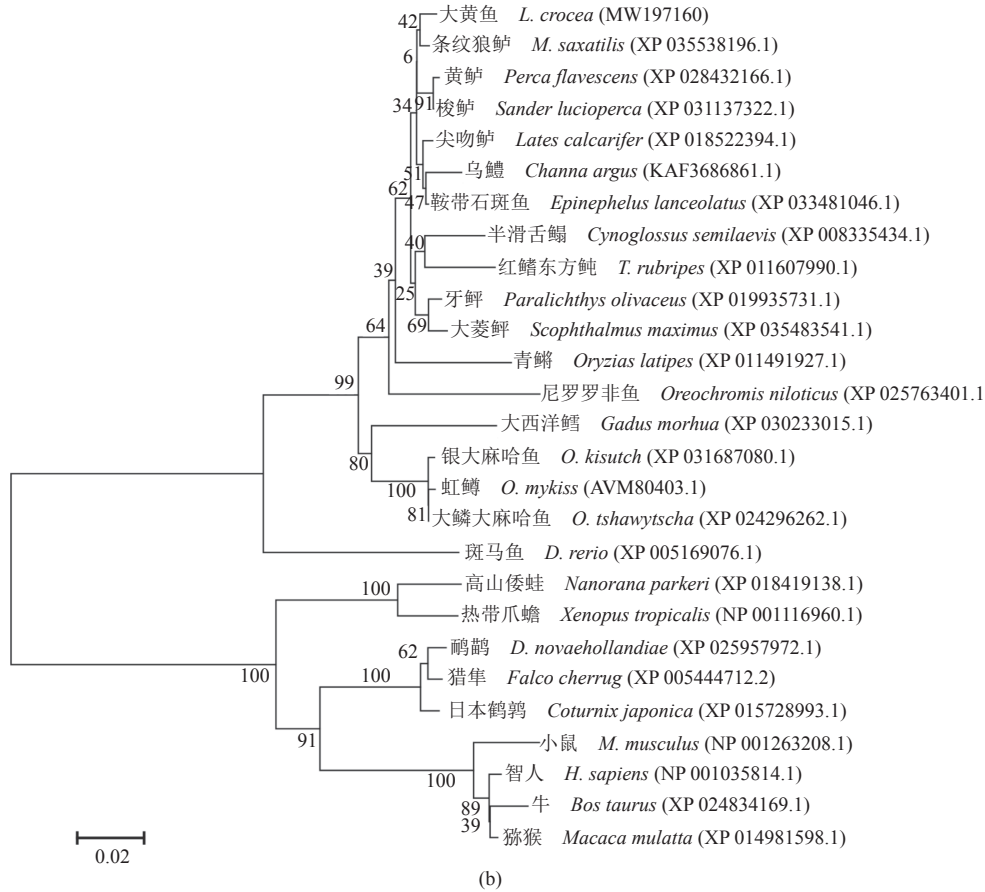


图 1 CYLD 的序列比对及系统进化树构建

(a) CYLD 多序列比对; (b) CYLD 系统进化树

Fig. 1 Multiple alignments and phylogenetic tree of CYLD

(a) multiple alignments of CYLD; (b) phylogenetic tree of CYLD sequence

随后逐渐下降, 在 48 h 恢复至对照水平。flagellin 刺激后, *LcCYLD* 表达量下降, 在 12 h 时达到最低, 约为对照组的 0.68 ($P < 0.01$), 随后逐渐恢复; poly I:C 刺激引起所有时相 *LcCYLD* 表达量的极显著上升 ($P < 0.01$), 在 24 h 时达到最高, 约为对照组的 11.7 倍 ($P < 0.01$)。在 PGN 刺激 6~12 h 后, *LcCYLD* 的表达水平未见显著变化, 但 24 h 时开始降低, 48 h 时达到最低, 仅为对照组的 0.3 ($P < 0.01$) (图 3)。

2.4 LcCYLD 亚细胞定位

采用激光扫描共聚焦显微镜对融合蛋白 *LcCYLD*-GFP 在细胞中的定位情况观察表明, *LcCYLD*-GFP 融合蛋白在细胞核及细胞质中均有表达 (图 4-a)。Western blot 对融合蛋白 *LcCYLD*-GFP 及对照组 GFP 蛋白进行了验证结果也检测到特异性蛋白条带, 分别为 129 ku 的 *LcCYLD*-GFP 融合蛋白及 26 ku 的 GFP 对照, 与预测一致 (图 4-b)。

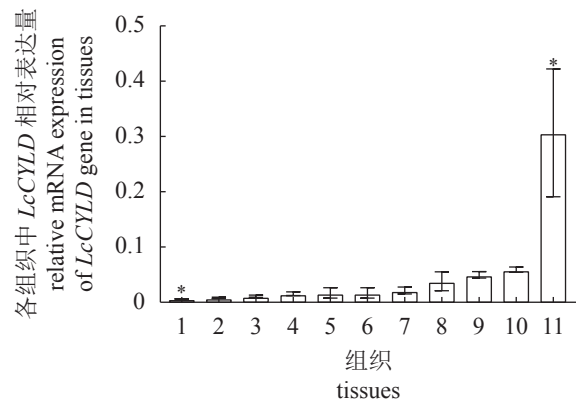


图 2 LcCYLD 不同组织表达分析

1. 头肾, 2. 肾脏, 3. 鳃, 4. 心脏, 5. 脾脏, 6. 胃, 7. 肌肉, 8. 肝脏, 9. 肠, 10. 血, 11. 脑

Fig. 2 The expression profile of *LcCYLD* in different tissues

1. head kidney, 2. kidney, 3. gill, 4. heart, 5. spleen, 6. stomach, 7. muscle, 8. liver, 9. intestine, 10. blood, 11. brain

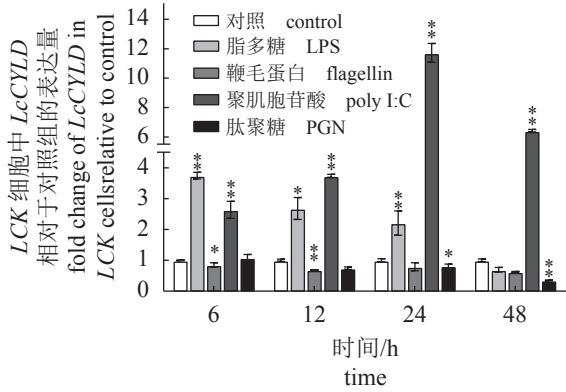


图3 免疫刺激后 LcCYLD 的表达变化

“*”代表显著差异 (P<0.05), “***”代表极显著差异 (P<0.01)

Fig. 3 The expression level of LcCYLD in LCK cells after immune challenge

“*” and “***” indicated significant and extremely significant difference, respectively (**P<0.01, * P<0.05)

2.5 LcCYLD 对 NF-κB 及 TNF-α 及 IL-1β 启动子活性的影响

将插入有 LcCYLD 的重组过表达质粒转染细胞后, Western blot 对 LcCYLD-myc 重组蛋白在细胞内的表达验证表明, 单克隆抗体 C-myc-tag 在转染 pcDNA3.1-CYLD 的 HEK293T 细胞中检测到分子量约为 103 ku 的特异性条带, 与预测相符; 而转染 pcDNA3.1/myc-His(-)A 的空载质粒中未检

测到条带, 表明成功获得了大黄鱼 CYLD 的重组表达蛋白 (图 5-a)。

对 LcCYLD 过表达的细胞进行免疫刺激后, NF-κB、TNF-α 及 IL-1β 启动子活性的变化结果显示, 过表达 LcCYLD 可以极显著抑制 NF-κB 转录激活, 仅为对照组的 0.67 (P<0.01)。对照组中, poly I:C 和 LPS 刺激均可以显著上调 NF-κB 启动子的活性; 但是在过表达 LcCYLD 的细胞内, 与转染空质粒的细胞相比, poly I:C 和 LPS 对 NF-κB 启动子活性的诱导能力被显著抑制, 分别约为对照组的 0.78 和 0.59 (P<0.01) (图 5-b)。过表达 LcCYLD 也显著抑制 TNF-α 及 IL-1β 启动子活性, 分别约为对照组的 0.69 与 0.40 (P<0.01); LPS 刺激虽然均可以诱导 pcDNA3.1 组 TNF-α 及 IL-1β 启动子活性增加 (P<0.01), 但在 LcCYLD 过表达组中, 免疫刺激对两者诱导能力均显著降低, TNF-α 和 IL-1β 分别仅为对照组的 0.63 和 0.31 (P<0.01) (图 5-c, d)。

3 讨论

CYLD 在 NF-κB 的激活过程中具有重要调节作用^[16]。哺乳动物的 CYLD 具有 4 个保守的结构域, 分别为 3 个 N 端的 CAP_GLY 结构域和 1 个 C

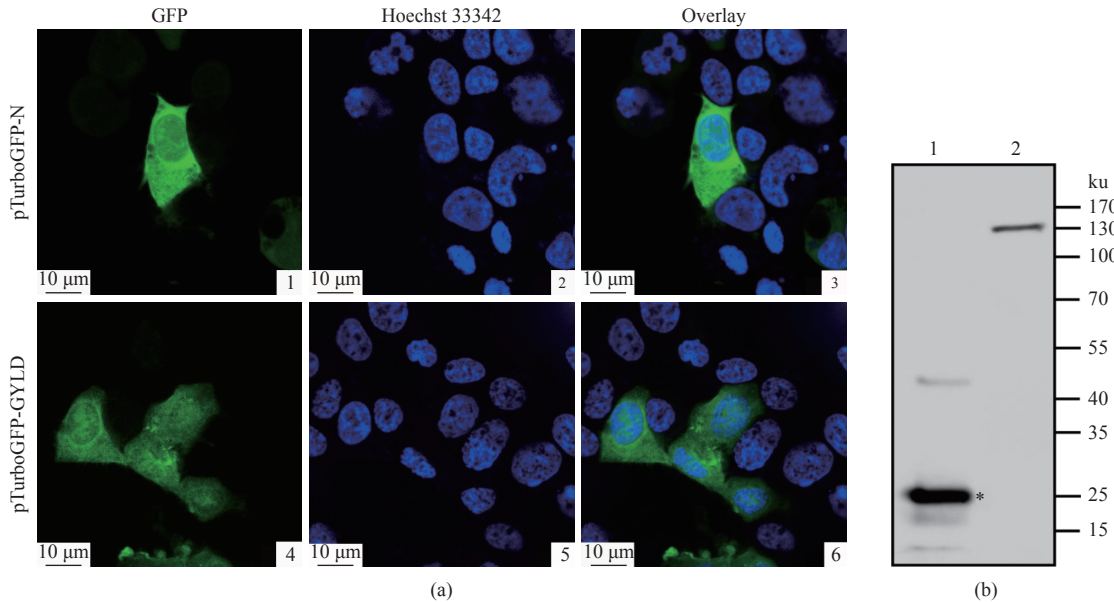


图4 LcCYLD 在 HEK293T 细胞中的亚细胞定位

(a) LcCYLD 的亚细胞定位, (b) LcCYLD-GFP 融合蛋白的 Western blot 结果; “*”所示条带为 GFP 蛋白; 1. GFP 对照, 2. 融合蛋白 LcCYLD-GFP

Fig. 4 Subcellular localization of LcCYLD in HEK293T cells

(a) Subcellular localization of LcCYLD, (b) Western blot of the fusion protein LcCYLD-GFP; “*” represents the GFP protein; 1. GFP control, 2. the fusion protein LcCYLD-GFP

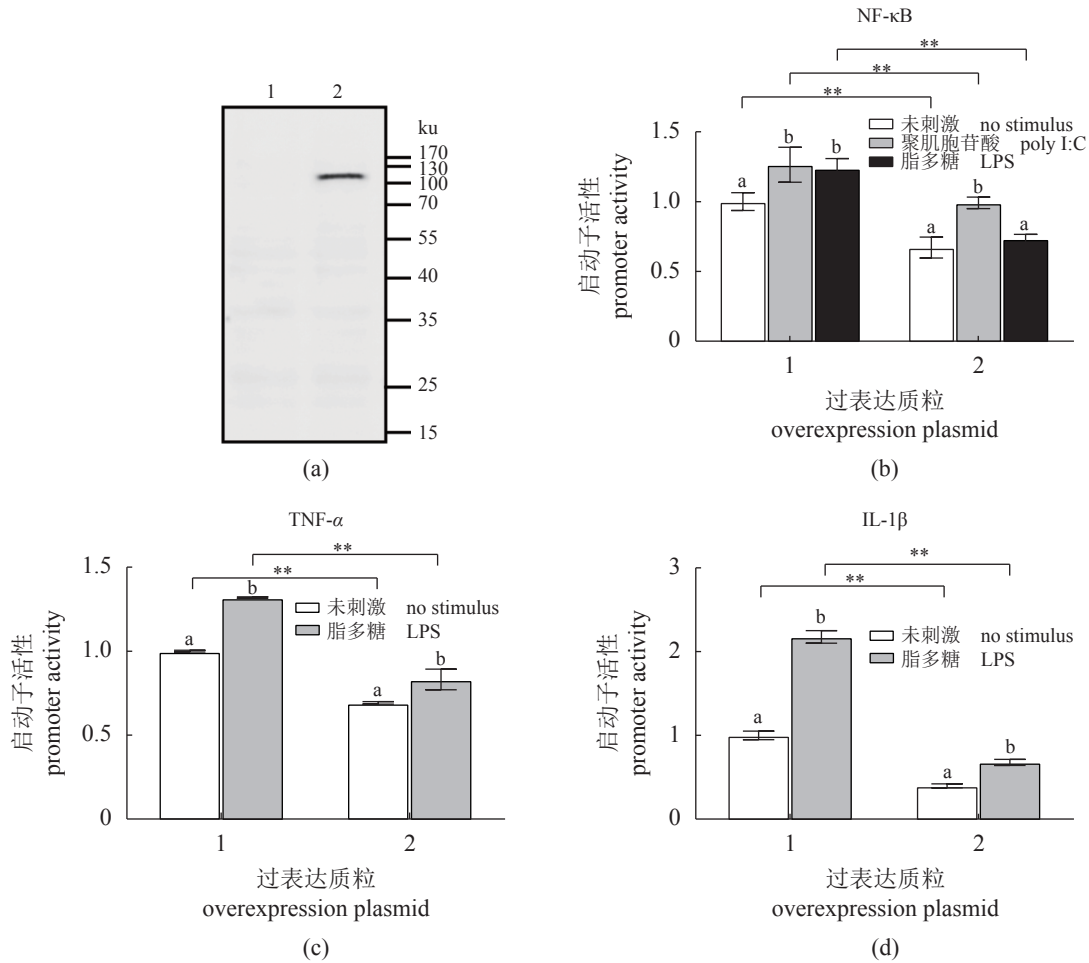


图 5 大黄鱼 *CYLD* 过表达及免疫刺激对 *NF-κB*、*TNF-α* 及 *IL-1β* 启动子活性的影响

1 与 2 分别为过表达 pcDNA3.1/myc-His(-)A 和 pcDNA3.1-CYLD; 不同字母 (a, b) 表示转染相同质粒之间的显著差异 ($P < 0.01$); 双星号 (**) 表示同一免疫刺激下不同过表达之间的差异 ($P < 0.01$); 启动子活性均相对于对照组

Fig. 5 Effect of *LcCYLD* overexpression and immune challenge to the *NF-κB*, *TNF-α* and *IL-1β* activity in HEK293T cells

1 and 2 represent overexpressing pcDNA3.1/myc-His(-)A and pcDNA3.1-CYLD, respectively; different letters indicate extremely significant difference within the same plasmid; treatment within the same immune stimulus which are marked by double asterisk (**) are extremely significant different from each other ($P < 0.01$); the promoter activity were relative to the control group

端的 UCH 结构域, 其中 CAP_GLY 能够与 NEMO 相互作用^[7,17]。本研究推测大黄鱼 *CYLD* 包含哺乳动物 *CYLD* 上述保守的 CAP_GLY 及 UCH 结构域, 提示大黄鱼 *CYLD* 可能也具有相似的功能。多重序列比对结果显示, *LcCYLD* 与硬骨鱼的 *CYLD* 具有高度保守性, 在进化树分析中聚为一支, 且与条纹狼鲈亲缘关系最近, 说明 *LcCYLD* 在进化上高度保守 (图 1)。

组织表达分析发现, *LcCYLD* 在大黄鱼的多组织中表达, 其中在脑、血细胞、肠与肝脏中具有较高的表达量 (图 2), 与虹鳟 *CYLD* 在肝脏中表达较高的结果一致^[12], 提示肝脏可能是鱼类合成的 *CYLD* 的一个重要组织。另外, 本研究发现,

健康的大黄鱼中脑、血细胞等组织中 *CYLD* 的表达量较高, 与虹鳟略有差异, 这可能与不同鱼类或者不同的生活环境、生理状态有关。LPS、flagellin、PGN 和 poly I:C 分别为革兰氏阴性菌、细菌鞭毛、革兰氏阳性菌及双链 RNA 病毒的刺激模拟物。研究表明, LPS 和 poly I:C 刺激, 会显著诱导 *LcCYLD* 的转录表达增加 (图 3)。关于虹鳟中的研究表明, 人工感染迟缓爱德华氏菌能够导致其 *CYLD* 转录表达显著上调^[12], 在 poly I:C 刺激大黄鱼巨噬细胞的转录组数据中, 同样发现 *CYLD* 表达上调^[18], 与本实验研究结果相似。但是 flagellin 与 PGN 不能诱导大黄鱼 *CYLD* 的转录表达显著增加, 提示大黄鱼 *CYLD* 可能在参与 LPS 与 poly I:C 诱发的

免疫应答中发挥重要作用。

目前尚无关于鱼类 *CYLD* 在细胞内定位特征的报道。本研究对大黄鱼 *CYLD* 的亚细胞定位表明, *LcCYLD* 存在于细胞质与细胞核中(图4), 提示大黄鱼 *CYLD* 可能参与一些基因的转录调控。关于人类的研究发现, 人肝癌细胞及散发性包涵体肌炎患者的肌纤维中 *CYLD* 均出现了核定位现象^[19-20], 但其作用机制尚不清楚。本研究表明大黄鱼 *CYLD* 可以进入细胞核, 或许与 *CYLD* 对 *NF-κB* 活性的调控有关^[6, 21]。

在哺乳动物的研究中发现, *CYLD* 能够抑制 *TRAF6* 的活性, 并且可能通过与 *NEMO* 相互作用, 在调节 *NF-κB* 激活中发挥重要作用^[7, 22-23]。为了解大黄鱼 *CYLD* 在免疫中的功能, 本研究对 *LcCYLD* 进行了过表达, 并对 *NF-κB*、*TNF-α* 及 *IL-1β* 启动子活性进行了检测(图5)。结果显示, *LcCYLD* 能够极显著抑制 *NF-κB*、*TNF-α* 及 *IL-1β* 启动子活性。智人 *CYLD* 能够抑制 *NF-κB* 启动子的激活, 敲除 *CYLD* 后, *NF-κB* 启动子活性增加^[7-9, 24-25]; 敲除小鼠 *CYLD* 后, *TNF-α* 的表达量显著增加^[26]; 此外, 敲除 *CYLD* 的小鼠其星形胶质细胞受到 LPS 刺激后, 细胞中 *NF-κB* 及 *IL-1β* 表达量均显著增加^[27]。虹鳟 *CYLD* 也能够显著抑制 *NF-κB* 启动子活性、*TNF-α* 及 *IL-1β* 转录表达^[12]。提示大黄鱼 *CYLD* 可能在 *NF-κB* 的激活中发挥负调控作用。

综上所述, 本研究表明大黄鱼 *CYLD* 具有保守的结构域, 分布于大黄鱼多组织中, 且在脑、血细胞、肝脏等组织表达量较高。LPS 及 poly I:C 可以诱导 *LcCYLD* 转录增加; 大黄鱼 *CYLD* 在细胞质及细胞核均有分布, 可能参与胞浆及细胞核内多因子调控; 过表达 *LcCYLD* 能够抑制 *NF-κB*、*TNF-α* 和 *IL-1β* 启动子活性, 以上结果表明 *LcCYLD* 可能在大黄鱼免疫中发挥负调控的作用。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Huston D C, Ogawa K, Shirakashi S, *et al.* Metazoan parasite life cycles: significance for fish mariculture[J]. *Trends in Parasitology*, 2020, 36(12): 1002-1012.
- [2] Bondad-Reantaso M G, Subasinghe R P, Arthur J R, *et al.* Disease and health management in Asian aquaculture[J]. *Veterinary Parasitology*, 2005, 132(3-4): 249-272.
- [3] Mogensen T H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009, 22(2): 240-273.
- [4] Brubaker S W, Bonham K S, Zanoni I, *et al.* Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective[J]. *Annual Review of Immunology*, 2015, 33(1): 257-290.
- [5] Thaiss C A, Levy M, Itav S, *et al.* Integration of innate immune signaling[J]. *Trends in Immunology*, 2016, 37(2): 84-101.
- [6] Lork M, Verhelst K, Beyaert R. *CYLD*, *A20* and *OTULIN* deubiquitinases in *NF-κB* signaling and cell death: so similar, yet so different[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2017, 24(7): 1172-1183.
- [7] Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, *et al.* The tumour suppressor *CYLD* negatively regulates *NF-κB* signalling by deubiquitination[J]. *Nature*, 2003, 424(6950): 801-805.
- [8] Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirritzis T, *et al.* *CYLD* is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates *NF-κB* activation by *TNFR* family members[J]. *Nature*, 2003, 424(6950): 793-796.
- [9] Brummelkamp T R, Nijman S M B, Dirac A M G, *et al.* Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating *NF-κB*[J]. *Nature*, 2003, 424(6950): 797-801.
- [10] Mathis B J, Lai Y M, Qu C, *et al.* *CYLD*-Mediated signaling and diseases[J]. *Current Drug Targets*, 2015, 16(4): 284-294.
- [11] Chen Y, Wang Z Z, Wang P, *et al.* *CYLD* negatively regulates Hippo signaling by limiting Hpo phosphorylation in *Drosophila*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 452(3): 808-812.
- [12] Jang J H, Lee H M, Kim H, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of deubiquitinase *CYLD* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 101: 135-142.
- [13] Fan Z J, Jia Q J, Yao C L. Characterization and expression analysis of Toll-like receptor 2 gene in large yellow croaker, *Larimichthys crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 129-137.
- [14] Yao C L, Kong P, Wang Z Y, *et al.* Molecular cloning and expression of *MyD88* in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 129-137.

- 2009, 26(2): 249-255.
- [15] Bao S Y, Sun Q X, Yao C L. The interaction of TAK1 and TAB1 enhances LPS-induced cytokine release via modulating NF- κ B activation (*Larimichthys crocea*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 450-458.
- [16] Massoumi R, Fässler R. Functional properties of CYLD[J]. *International Congress Series*, 2007, 1302: 36-42.
- [17] Saito K, Kigawa T, Koshiha S, *et al.* The CAP-Gly domain of CYLD associates with the proline-rich sequence in NEMO/IKK γ [J]. *Structure*, 2004, 12(9): 1719-1728.
- [18] Li Q F, Wu M J, Cui K, *et al.* Characterization of antiviral immune response induced by poly(I: C) in macrophages of farmed large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 104: 663-672.
- [19] Welte S, Urbanik T, Elssner C, *et al.* Nuclear expression of the deubiquitinase CYLD is associated with improved survival in human hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110591.
- [20] Yamashita S, Matsuo Y, Tawara N, *et al.* CYLD dysregulation in pathogenesis of sporadic inclusion body myositis[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 11606.
- [21] Courtois G. Tumor suppressor CYLD: Negative regulation of NF- κ B signaling and more[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(7-8): 1123-1132.
- [22] Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, *et al.* Complementa-tion cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation[J]. *Cell*, 1998, 93(7): 1231-1240.
- [23] Rothwarf D M, Zandi E, Natoli G, *et al.* IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex[J]. *Nature*, 1998, 395(6699): 297-300.
- [24] Komander D, Lord C J, Scheel H, *et al.* The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module[J]. *Molecular Cell*, 2008, 29(4): 451-464.
- [25] Regamey A, Hohl D, Liu J W, *et al.* The tumor sup-pressor CYLD interacts with TRIP and regulates negat-ively nuclear factor κ B activation by tumor necrosis factor[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, 198(12): 1959-1964.
- [26] Reiley W W, Jin W, Lee A J, *et al.* Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(6): 1475-1485.
- [27] Li L, Shu M Q, Chen J. CYLD deficiency exacerbates lipopolysaccharide (LPS)-induced pyroptosis in astro-cytes of mice with sepsis[J]. *Biochemical and Biophys-ical Research Communications*, 2019, 514(4): 1066-1073.

Molecular structure, immune response characterizations and function of cylindromatosis in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

ZHANG Meng, LUO Yunjiang, YAO Cuiluan*

(Fisheries college of Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Mammalian cylindromatosis (CYLD) has been identified as a tumor suppressor and participates in innate immune signaling transduction in various cell types through negative regulation of *NF- κ B* activation by deubiquitinating TRAF6 and NEMO. To investigate the role of *CYLD* in the immune response of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), the cDNA sequence of *CYLD* was cloned and identified, named *LcCYLD*. Gene expression profile was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Then the recombinant plasmid pTurboGFP-CYLD was constructed for subcellular localization and transfected into HEK293T cells. For further understanding of the function of *CYLD* in innate immune, the recombinant overexpression vector pcDNA3.1-CYLD was constructed and transfected into cells, and the activation capability of *NF- κ B*, proinflammatory factors *TNF- α* and *IL-1 β* were detected. Sequence analysis showed that the ORF of *LcCYLD* contained 2 754 bp, encoding 917 amino acids. The putative *LcCYLD* protein contained three conservative N-terminal CAP_GLY domain, a phosphorylation region, and a typical C-terminal UCH domain. Multiple alignments showed that CYLD was highly conserved among the analyzed species. Phylogenetic analysis showed that *LcCYLD* was clustered with bony fish and closely related to striped bass (*Morone saxatilis*). Gene expression analysis indicated that *LcCYLD* expressed in most examined tissues with the most predominant expression in the brain, followed by blood and intestine. However, the expression levels in other tissues are very weak. LPS and poly I:C stimulation significantly induced the transcriptional expression of *LcCYLD*. Subcellular localization showed that *LcCYLD* expressed both in cytoplasm and nucleus. Overexpression of *LcCYLD* could significantly inhibit the immuno-activation of *NF- κ B* and proinflammation of cytokines *TNF- α* and *IL-1 β* after LPS and poly I:C challenge. These findings suggested that *LcCYLD* could negatively regulate *NF- κ B* activation. The present study might be helpful for better understanding the function of *LcCYLD* in innate immune signaling transduction of *L. crocea*.

Key words: *Larimichthys crocea*; cylindromatosis, CYLD; subcellular localization; overexpression; immune response; suppression

Corresponding author: YAO Cuiluan. E-mail: clyao@jmu.edu.cn

Funding projects: Special Foundation for Major Research Program of Fujian Province (2020NZ08003)