



日本鳗鲡 STAT3 及其剪切异构体的克隆、 亚细胞定位及功能分析

李文星¹, 郑 妨¹, 凌露露¹, 梁 英^{1,2},
黄文树^{1,2,3}, 聂 品⁴, 黄 贝^{1,2,3*}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 集美大学, 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;

3. 集美大学, 福建省水产生物育种与健康养殖工程研究中心, 厦门 361021;

4. 青岛农业大学海洋科学与工程学院, 山东 青岛 266237)

摘要: 为研究鱼类信号与转录激活因子 3 (signal transduction and activator of transcription 3, STAT3) 在抗病毒免疫应答中的作用, 实验利用逆转录 PCR(RT-PCR) 和 RACE-PCR 技术从日本鳗鲡中扩增获得了 STAT3 及其剪切异构体 (*AjSTAT3-L* 和 *AjSTAT3-S*)。 *AjSTAT3-L* 及 *AjSTAT3-S* 开放阅读框全长分别为 2349 和 1470 bp, 编码 782 和 489 个氨基酸。 基因结构分析结果显示, *AjSTAT3-L* 具有 23 个外显子, *AjSTAT3-S* 缺失了第 2、3、4、5、6、7 及 21 个外显子。 *AjSTAT3-L* 类似于哺乳动物 STAT3, 由 N 端结构域 (NTD, 1~120 位氨基酸)、卷曲螺旋结构域 (CCD, 140~313 位氨基酸)、DNA 结合结构域 (DBD, 325~462 位氨基酸) 和 SH2 结构域 (577~672 位氨基酸) 构成。 相较于 *AjSTAT3-L*, *AjSTAT3-S* 缺失了整个 CCD 结构域, 且 NTD 结构域也缺失了 69 个氨基酸。 系统进化分析结果显示, *AjSTAT3-L* 和 *AjSTAT3-S* 位于硬骨鱼类 STAT3 分支的基部。 脊椎动物 STAT3 聚为一支, 并与 STAT1 和 STAT4 聚为一大支。 免疫荧光结果显示, *AjSTAT3-L* 及 *AjSTAT3-S* 均定位于细胞质。 此外, 过表达 *AjSTAT3-L* 和 *AjSTAT3-S* 能显著抑制 Poly I : C 诱导的 IFN 和 Mx 启动子的活化。 研究表明, 实验所克隆鉴定的日本鳗鲡 STAT3 及其剪切异构体, 均能负调控鱼类抗病毒免疫应答。

关键词: 日本鳗鲡; 信号与转录激活因子 3 (STAT3); 亚细胞定位; 负调控

中图分类号: S 941

文献标志码: A

信号与转录激活因子 (signal transduction and activator of transcriptions, STATs) 是一类重要的转录因子, 可被多种细胞外信号刺激而激活, 并通过一系列磷酸化级联反应, 参与调控细胞生长分化、凋亡及免疫应答等过程^[1-2]。 哺乳类

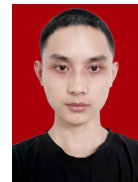
动物的 STAT 家族包含 7 个成员, 即 STAT1~4、STAT5A、STAT5B 和 STAT6^[3]。 该家族成员的结构类似, 主要由 5 个结构域组成: 氨基端结构域 (N-terminal domain, NTD)、卷曲螺旋结构域 (coiled coil domain, CCD)、DNA 结合域 (DNA-

收稿日期: 2021-05-26 修回日期: 2021-08-16

资助项目: 国家自然科学基金 (32073011); 福建省自然科学基金 (2020J01666); 福建省自然科学基金杰出青年基金 (2016J06008)

第一作者: 李文星 (照片), 从事分子免疫方面的研究, E-mail: 917740837@qq.com

通信作者: 黄贝, E-mail: huangbei@jmu.edu.cn



binding domains, DBD)、Src同源2区 (Src homology 2 domain, SH2) 结构域以及羧基端的转录激活域 (transcriptional activation domains, TAD)^[4]。

STAT3最初被发现为白细胞介素6 (interleukin 6, IL-6) 活化的急性期反应因子复合物的组成部分, 调控肝脏急性期蛋白基因的转录表达^[5-7]。后续的研究表明, STAT3可被多种细胞因子和生长因子激活, 包括IL-6家族其他成员、瘦素、IL-12、干扰素 (interferon, IFN)、IL-10、粒细胞集落刺激因子等^[8-10]。活化后的STAT3通过SH2结构域形成同源或异源二聚体, 并促使第727位丝氨酸磷酸化。二聚体STAT3分子进入细胞核后通过DBD结合靶基因启动子, 调控其表达^[11]。迄今为止, 研究人员在哺乳类中鉴定了STAT3的4种剪切形式, 分别命名为STAT3 α (约92 ku)、STAT3 β (约83 ku)、STAT3 (约72 ku) 以及STAT3 δ (约64 ku)^[12-13]。其中STAT3 α 为全长形式的STAT3, STAT3 γ 和STAT3 δ 通过蛋白酶切割机制产生, 而STAT3 β 通过mRNA水平的选择性剪切产生, 并缺失了羧基端的TAD^[13]。近年来, STAT3相继在斑马鱼 (*Danio rerio*), 鳊 (*Siniperca chuatsi*)、大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*)、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 及条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) 等硬骨鱼类中被克隆鉴定^[14-19]。此外, 在草鱼中还鉴定了与哺乳类STAT3 α 同源的2个剪切异构体, 分别命名为gcSTAT3 α 1和gcSTAT3 α 2^[20]。与gcSTAT3 α 1相比, gcSTAT3 α 2在SH2结构域缺失30个氨基酸^[20]。类似于STAT3 α , 草鱼中STAT3 β 也存在2种剪切异构体 (STAT3 β 1和STAT3 β 2)。与STAT3 β 2相比, STAT3 β 1序列包含了一段内含子序列^[21]。

在经典的I型IFN信号转导通路中, IFN与其受体结合后促使Janus激酶1 (Janus kinase 1, JAK1) 和酪氨酸激酶2 (tyrosine kinase 2, TYK2) 活化。活化后的激酶可磷酸化STAT1和STAT2, 使其与干扰素调节因子9 (interferon regulatory factor 9, IRF9) 形成转录因子复合物ISGF3, 进入细胞核后结合靶基因启动子的干扰素刺激应答元件 (interferon-stimulated response elements, ISRE) 调控抗病毒免疫应答相关基因的表达^[22]。近年来的研究表明, STAT3也参与了IFN的信号转导过程。I型和II型IFN可激活STAT3形成同源二聚体, 或与STAT1形成异源二聚体, 结合靶基

因启动子SBEs (STAT3-binding elements) 元件调控其表达^[23-24]。在鱼类中的研究结果显示, 红点石斑鱼神经坏死病毒 (red spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV) 感染可显著增强STAT3的启动子活性, 表明鱼类STAT3的激活与病毒感染有关^[25]。抑制石斑鱼脾脏细胞中的STAT3活性后, 可显著降低新加坡石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) 的复制, 并显著抑制细胞周期进程和存活相关基因的表达, 表明STAT3参与了鱼类的抗病毒免疫应答^[18]。然而, STAT3在鱼类抗病毒免疫应答中的作用尚不清楚, 有待进一步研究。

鳊是我国重要的水产养殖品种, 其产值在我国水产品出口贸易中占有举足轻重的地位。目前养殖鳊的苗种主要依靠天然鳊苗资源。然而, 近年来鳊苗资源趋向匮乏, 加之养殖过程中病害频发及流行严重制约了我国鳊产业的快速发展。其中, 病毒性疾病是鳊养殖业最重要的威胁之一。例如, 由鳊疱疹病毒 (Anguillid herpesvirus, AngHV) 所引发的鳊“脱黏败血综合征”具有发病率高、传染性强、死亡率高等特点, 给养殖业者造成巨大的经济损失^[26-27]。对于水产动物病毒性疾病, 迄今尚无明确有效的抗病毒药物, 大多以免疫预防为主。因此有必要从鳊抗病毒感染的免疫识别机理入手, 阐释其抗病毒免疫防御机制。本实验克隆获得了日本鳊 (*Anguilla japonica*) STAT3 (AjSTAT3-L) 及其剪切异构体 (AjSTAT3-S)。利用免疫荧光技术分析 AjSTAT3-L 及 AjSTAT3-S 在细胞中的分布, 并利用荧光素酶报告系统分析了二者对日本鳊 I 型 IFN、抗病毒效应分子 Mx 基因启动子的调控作用, 以期解析鱼类 STAT3 调控抗病毒免疫应答的作用机制, 开展鳊病毒性疾病预防提供生物学基础。

1 材料与与方法

1.1 实验材料

健康日本鳊 (平均体质量约 200 g) 购于福建省某养殖场, 实验前于水温为 (28 ± 2) °C, 循环水养殖箱中暂养 2 周。采样前用 0.05% 丁香酚麻醉, 采集脾脏组织置于 TRIzol (Invitrogen) 试剂中, 于液氮中速冻后保存于 -80 °C 冰箱用于后续基因克隆。动物实验操作均遵循集美大学水

产学院动物伦理委员会的要求进行。

1.2 RNA 提取及 cDNA 的合成

总 RNA 提取参照 TRIzol[®] reagent 试剂盒说明书进行, 并利用 gDNA Eraser (TaKaRa) 处理总 RNA, 以去除基因组污染。利用琼脂糖凝胶电泳 (1%, 120 V) 检测 RNA 的完整性。使用 SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa) 试剂盒进行反转录, 合成 cDNA 第一链, 并保存于 -20 °C 备用。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

利用斑马鱼 STAT3 序列为种子序列, 对 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中日本鳗鲡基因组 (GCA_003597225.1) 进行比对。选取保守位点设计特异性引物 Aj-STAT3-F/R 进行 PCR 扩增 (表 1)。反应体系: cDNA 模板 1 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 10 × ExTaq Buffer (20 mmol/L Mg²⁺ plus) 5 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL, TaKaRa ExTaq (5 U/μL) 0.25 μL, 补充无菌水至总体积 50 μL。反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 38 个循环; 72 °C 延伸 10 min。根据获得的部分序列设计正反向引物, RACE-PCR 反应步骤参照 SMARTer 试剂盒说明书进行, 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 7 个循环; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 进行 18 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。程序结束后,

从第一轮 PCR 扩增产物中取出 1 μL 用作下一轮 PCR 反应模板, 反应条件同上, PCR 反应进行 35 次循环。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 切取目的大小条带并使用胶回收试剂盒 (Omega) 进行回收。将回收产物连接至 pMD-19T (TaKaRa) 载体, 热激转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 感受态中, 经 PCR 检验为阳性克隆后测序验证。

1.4 序列分析

将所获得的序列用 BLAST 工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比对。利用 ORFfinder 软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) 预测开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 使用 ExPASy 软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白分子量、等电点、蛋白亲水性和疏水性分析。利用 Pfam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 软件分析蛋白保守结构域。氨基酸多重序列比对通过 Clustal-X 软件进行。利用 MEGA-X 软件构建系统发育树, 具体参数: 邻接法 (Neighbor-Joining, N-J), 自展 (Bootstrap) 进行 1000 次重复检验。利用 GSDS 2.0 软件 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 分析基因结构及内含子相位。

1.5 基因共线性分析

利用 FGENESH 程序预测日本鳗鲡 STAT3 基因座 (Unplaced_Chimera_196, GCA_003597225.1) 上下游基因的潜在转录本^[28]。使用 BlastP 工具对预测结果进行同源性比对。其他物种 STAT3 基

表 1 本研究所用引物序列

Tab. 1 Primer sequences in this study

引物名称 primer name	引物序列 (5'-3') primer sequences	用途 usage
AjSTAT3-F	ATGGCCAGTGGAAATCAGTTG	ORF 扩增
AjSTAT3-R	TCAGTTGGGTGACGCCATGT	ORF amplification
AjSTAT3-3'race-out	GAAGCCATCGAGCCTGACTTCAC	
AjSTAT3-3'race-in	GAAGCCATCGAGCCTGACTTCAC	
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGG TATCAACGCAGAGT	
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
AjSTAT3-F2	CGGAATTCGCCACCATGGCCAGTGGAAATCAG	表达载体构建
AjSTAT3-R2	CGGGATCCATGGCCAGTGGAAATCAGC	expression vector construction

因座信息在 Ensembl 数据库 (<http://asia.ensembl.org/index.html>) 中搜寻。

1.6 双荧光素酶报告基因分析

设计带有酶切位点的特异性引物, 利用 PCR 扩增 *AjSTAT3-L* 及 *AjSTAT3-S* 的开放阅读框。PCR 产物经电泳分离、回收纯化后, 利用 T4 连接酶 (TaKaRa) 经双酶切反应 (*EcoRV/BamH I*) 将其与 p3xFlag-CMV 载体相连, 构建真核表达质粒。连接产物经热激转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 经 PCR 检验为阳性克隆后测序验证。利用 Endo-free Plasmid Mini Kit II 试剂盒 (Omega) 抽提质粒备用。IFN 和 Mx 启动子报告质粒 (*AjIFN2-pro*、*AjMxB-pro* 或 *AjMxC-pro*) 为本实验所构建保存^[29-30]。

鲤上皮瘤细胞系细胞 (EPC, ATCC[®] CRL-2872[™]) 于含有 10% FBS (Gibco)、2% 青链霉素 (Hyclone) 的 MEM (Hyclone) 培养基中培养, 培养条件为 27 °C, 5% CO₂。使用 0.25 % 胰蛋白酶-EDTA (Gibco) 进行消化传代。在转染前 24 h, 选取生长状态良好的细胞以 1 × 10⁶ 个/孔的密度接种于 24 孔板。利用转染试剂 Lipofectamine 3000 (Invitrogen) 将 *AjSTAT3-L-FLAG* 或 *AjSTAT3-S-FLAG* 真核表达质粒与启动子报告质粒 *AjIFN2-pro*、*AjMxB-pro*、或 *AjMxC-pro* 以及内参质粒 pRL-TK 共转染至 EPC 细胞。转染 6 h 后使用 1 μg/mL Poly I : C (Sigma) 刺激细胞。继续培养 18 h 后收集细胞, 利用 Dual-Lucifera[®] Reporter Assay System 试剂盒 (Promega) 检测荧光素酶活性。

1.7 免疫荧光分析

EPC 细胞培养如前所述。在转染前 24 h, 选取生长状态良好的细胞以 1 × 10⁶ 个/孔的密度接种于含盖玻片的 6 孔板细胞中培养过夜。利用转染试剂 Lipofectamine 3000 将 *AjSTAT3-L-FLAG* 或 *AjSTAT3-S-FLAG* 真核表达质粒转染至细胞。转染 24 h 后, 利用间接免疫荧光法分析亚细胞定位, 具体操作: 细胞在经 DIO 荧光染料处理 10 min 后用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗 3 次, 利用 4 % 多聚甲醛室温固定 20 min, 以及 1 % Triton X-100 通透 10 min。细胞经 PBS 清洗 3 次后用 10% 山羊血清 (碧云天生物技术) 室温封闭 1 h。细胞经 PBS 清洗 3 次后, 用稀释比例为 1 : 200 的一抗 (鼠抗 FLAG, 66008-2-Ig,

Proteintech) 于 4 °C 避光孵育过夜。用 PBS 清洗细胞 3 次后, 利用稀释比例为 1 : 200 的二抗 CoraLite594 (羊抗鼠 IgG, SA00013-3, Proteintech) 于室温孵育细胞 2 h。细胞经 4 次 PBS 清洗后用 10 μg/mL DAPI 染色 10 min。细胞经 PBS 清洗 3 次后用抗荧光淬灭封片液 (碧云天生物技术) 进行封片。使用激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8) 拍照观察。

2 结果

2.1 基因序列分析

日本鳗鲡 *STAT3* 的 2 个转录本 (*AjSTAT3-L* 和 *AjSTAT3-S*) 的 ORF 长度分别为 2349 和 1470 bp, 分别编码 782 和 489 个氨基酸。基因结构分析结果显示, *AjSTAT3-L* (GenBank: MZ813175) 由 23 个外显子和 22 个内含子构成, 而 *AjSTAT3-S* (GenBank: MZ813176) 缺失了第 2、3、4、5、6、7 及 21 个外显子。内含子相位分析结果显示, *AjSTAT3-L* 第 2 个内含子相位为 0, 而 *AjSTAT3-S* 的第二个内含子相位为 2, 发生了内含子相位偏移 (图 1)。

序列分析结果显示, *AjSTAT3-L* 蛋白的预测分子量为 89.39 ku, 理论等电点为 5.81; *AjSTAT3-S* 蛋白的分子量为 55.35 ku, 理论等电点为 5.53。亲疏水分析结果显示, *AjSTAT3-L* 和 *AjSTAT3-S* 均为亲水性蛋白, 平均亲水性指数分别为 -0.393 和 -0.273。保守结构域分析结果显示, *AjSTAT3-L* 具有 4 个经典的结构域: 即 NTD 结构域 (1~120 位氨基酸)、CCD 结构域 (140~313 位氨基酸)、DBD 结构域 (325~462 位氨基酸) 及 SH2 结构域 (577~672 位氨基酸)。相较于 *AjSTAT3-L*, *AjSTAT3-S* 缺失了整个 CCD 结构域, 且 NTD 结构域也缺失了 69 个氨基酸 (图 2)。

2.2 基因共线性分析

基因共线性分析结果显示, *AjSTAT3* 定位于 Unplaced_Chimera_196 (GCA_003597225.1) 中。其上游的 5 个基因分别为 Caveolae-associated protein 1 (*CAVIN1*); ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A (*ATP6V0A*); C-reactive protein (*CRP*); Tumor Necrosis Factor Alpha Induced Protein 3 (*TNFAIP3*) 和 p53 apoptosis effector related to PMP-22 (*PERP*), 下游基因为 *STAT5B*; GH3 dom-



图 1 AjSTAT3-L 和 AjSTAT3-S 基因结构示意图

黑色方块表示外显子, 直线表示内含子; 直线内含子长度小于 1000 bp, 折线内含子长度大于 1000 bp; 外显子上方的数字示内含子相位

Fig. 1 Schematic of the gene structure of AjSTAT3-L and AjSTAT3-S

Black boxes represent exons, and lines represent introns; straight lines indicate introns with size less than 1000 bp and concave-lines indicate those larger than 1000 bp; numbers above the exons represent intron phase

ain containing protein (GHDC); phospholipase C-like 2 (PLCL2); potassium voltage-gated channel subfamily H member 4 (KCNH4) 和 member RAS oncogene family (RAB5C)。其中上游基因 CAVIN1、ATP6V0A 以及下游基因 STAT5B、GHDC、KCNH、RAB5C

在其他鱼类和高等脊椎动物 STAT3 基因座中呈现高度保守的共线性, 表明本实验所获得的 STAT3 基因与高等脊椎动物 STAT3 基因直系同源 (图 3)。

2.3 系统进化分析

选取硬骨鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类代表性物种的 STAT3 蛋白序列以及脊椎动物 STAT 家族成员构建系统进化树。系统进化树的拓扑结构显示, 脊椎动物 STAT 家族分为 6 枝, 分别为 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5 及 STAT6。其中 STAT1 和 STAT6 聚为一大支, 分别与 STAT 家族其他 4 个成员分开。STAT1 和 STAT4 聚为一支后, 再与 STAT3 聚为一大支。在 STAT3 分支中, 软骨鱼类 STAT3 聚为一支, 位于硬骨鱼类 STAT3 分支的基部 (图 4)。

		N 末端结构域	
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	STAT3-L	MAQNNLQQLDPRYLEQLYHLYSEDFMELRQFLAPWIESQDWAYAANKESHATLVFNHLLGEMDQVSRFLQNNVLYQHNLRRIKQHLQSKYLEKPEMFIARVARCLWEEQRLLQAT	120
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	STAT3-S	MAQNNLQQLDPRYLEQLYHLYSEDFMELRQFLAPWIESQDWAYAANKESHATLVFNHLLGEMDQVSRFLQNNVLYQHNLRRIKQHLQSKYLEKPEMFIARVARCLWEEQRLLQAT	51
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	MAQNNLQQLDPRYLEQLYHLYSEDFMELRQFLAPWIESQDWAYAANKESHATLVFNHLLGEMDQVSRFLQNNVLYQHNLRRIKQHLQSKYLEKPEMFIARVARCLWEEQRLLQAT	120
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	MAQNNLQQLDPRYLEQLYHLYSEDFMELRQFLAPWIESQDWAYAANKESHATLVFNHLLGEMDQVSRFLQNNVLYQHNLRRIKQHLQSKYLEKPEMFIARVARCLWEEQRLLQAT	120
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a1	MAQNNLQQLDPRYLEQLYHLYSEDFMELRQFLAPWIESQDWAYAANKESHATLVFNHLLGEMDQVSRFLQNNVLYQHNLRRIKQHLQSKYLEKPEMFIARVARCLWEEQRLLQAT	120
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a2	MAQNNLQQLDPRYLEQLYHLYSEDFMELRQFLAPWIESQDWAYAANKESHATLVFNHLLGEMDQVSRFLQNNVLYQHNLRRIKQHLQSKYLEKPEMFIARVARCLWEEQRLLQAT	120
红鲌东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a1	MAQNNLQQLDPRYLEQLYHLYSEDFMELRQFLAPWIESQDWAYAANKESHATLVFNHLLGEMDQVSRFLQNNVLYQHNLRRIKQHLQSKYLEKPEMFIARVARCLWEEQRLLQAT	120
红鲌东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a2	MAQNNLQQLDPRYLEQLYHLYSEDFMELRQFLAPWIESQDWAYAANKESHATLVFNHLLGEMDQVSRFLQNNVLYQHNLRRIKQHLQSKYLEKPEMFIARVARCLWEEQRLLQAT	120
莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	STAT3a2	MAQNNLQQLDPRYLEQLYHLYSEDFMELRQFLAPWIESQDWAYAANKESHATLVFNHLLGEMDQVSRFLQNNVLYQHNLRRIKQHLQSKYLEKPEMFIARVARCLWEEQRLLQAT	120
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	MAQNNLQQLDPRYLEQLYHLYSEDFMELRQFLAPWIESQDWAYAANKESHATLVFNHLLGEMDQVSRFLQNNVLYQHNLRRIKQHLQSKYLEKPEMFIARVARCLWEEQRLLQAT	120
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	MAQNNLQQLDPRYLEQLYHLYSEDFMELRQFLAPWIESQDWAYAANKESHATLVFNHLLGEMDQVSRFLQNNVLYQHNLRRIKQHLQSKYLEKPEMFIARVARCLWEEQRLLQAT	120
		螺旋线团结构域	
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	STAT3-L	ATSPDQGVVTHPSGAVVTEKQQLLEHNLQDIRKRVVDMQKMKMLENLQDDFFNYTKLSAGELSDQLNGNSQAATRQMSQLEQMLSDQLRRQIVTEMAGLSAMDFVQRNLITDEE	239
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	STAT3-S	ATSPDQGVVTHPSGAVVTEKQQLLEHNLQDIRKRVVDMQKMKMLENLQDDFFNYTKLSAGELSDQLNGNSQAATRQMSQLEQMLSDQLRRQIVTEMAGLSAMDFVQRNLITDEE	51
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	ATSPDQGVVTHPSGAVVTEKQQLLEHNLQDIRKRVVDMQKMKMLENLQDDFFNYTKLSAGELSDQLNGNSQAATRQMSQLEQMLSDQLRRQIVTEMAGLSAMDFVQRNLITDEE	240
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	ATSPDQGVVTHPSGAVVTEKQQLLEHNLQDIRKRVVDMQKMKMLENLQDDFFNYTKLSAGELSDQLNGNSQAATRQMSQLEQMLSDQLRRQIVTEMAGLSAMDFVQRNLITDEE	240
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a1	ATSPDQGVVTHPSGAVVTEKQQLLEHNLQDIRKRVVDMQKMKMLENLQDDFFNYTKLSAGELSDQLNGNSQAATRQMSQLEQMLSDQLRRQIVTEMAGLSAMDFVQRNLITDEE	240
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a2	ATSPDQGVVTHPSGAVVTEKQQLLEHNLQDIRKRVVDMQKMKMLENLQDDFFNYTKLSAGELSDQLNGNSQAATRQMSQLEQMLSDQLRRQIVTEMAGLSAMDFVQRNLITDEE	240
红鲌东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a1	ATSPDQGVVTHPSGAVVTEKQQLLEHNLQDIRKRVVDMQKMKMLENLQDDFFNYTKLSAGELSDQLNGNSQAATRQMSQLEQMLSDQLRRQIVTEMAGLSAMDFVQRNLITDEE	240
红鲌东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a2	ATSPDQGVVTHPSGAVVTEKQQLLEHNLQDIRKRVVDMQKMKMLENLQDDFFNYTKLSAGELSDQLNGNSQAATRQMSQLEQMLSDQLRRQIVTEMAGLSAMDFVQRNLITDEE	240
莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	STAT3a2	ATSPDQGVVTHPSGAVVTEKQQLLEHNLQDIRKRVVDMQKMKMLENLQDDFFNYTKLSAGELSDQLNGNSQAATRQMSQLEQMLSDQLRRQIVTEMAGLSAMDFVQRNLITDEE	240
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	ATSPDQGVVTHPSGAVVTEKQQLLEHNLQDIRKRVVDMQKMKMLENLQDDFFNYTKLSAGELSDQLNGNSQAATRQMSQLEQMLSDQLRRQIVTEMAGLSAMDFVQRNLITDEE	240
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	ATSPDQGVVTHPSGAVVTEKQQLLEHNLQDIRKRVVDMQKMKMLENLQDDFFNYTKLSAGELSDQLNGNSQAATRQMSQLEQMLSDQLRRQIVTEMAGLSAMDFVQRNLITDEE	240
		DBD 结构域	
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	STAT3-L	YQLKIKVICDESQDVAIRGRSRFNILGNTKVMNMEESNGSLAEFFKHLTLREQRQNGGRTNSDASLIVTEELHLITFETEVHGGKIDLETHSLPVPVINSICQMPNNAWASILW	477
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	STAT3-S	YQLKIKVICDESQDVAIRGRSRFNILGNTKVMNMEESNGSLAEFFKHLTLREQRQNGGRTNSDASLIVTEELHLITFETEVHGGKIDLETHSLPVPVINSICQMPNNAWASILW	203
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	YQLKIKVICDESQDVAIRGRSRFNILGNTKVMNMEESNGSLAEFFKHLTLREQRQNGGRTNSDASLIVTEELHLITFETEVHGGKIDLETHSLPVPVINSICQMPNNAWASILW	480
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	YQLKIKVICDESQDVAIRGRSRFNILGNTKVMNMEESNGSLAEFFKHLTLREQRQNGGRTNSDASLIVTEELHLITFETEVHGGKIDLETHSLPVPVINSICQMPNNAWASILW	480
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a1	YQLKIKVICDESQDVAIRGRSRFNILGNTKVMNMEESNGSLAEFFKHLTLREQRQNGGRTNSDASLIVTEELHLITFETEVHGGKIDLETHSLPVPVINSICQMPNNAWASILW	480
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a2	YQLKIKVICDESQDVAIRGRSRFNILGNTKVMNMEESNGSLAEFFKHLTLREQRQNGGRTNSDASLIVTEELHLITFETEVHGGKIDLETHSLPVPVINSICQMPNNAWASILW	480
红鲌东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a1	YQLKIKVICDESQDVAIRGRSRFNILGNTKVMNMEESNGSLAEFFKHLTLREQRQNGGRTNSDASLIVTEELHLITFETEVHGGKIDLETHSLPVPVINSICQMPNNAWASILW	480
红鲌东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a2	YQLKIKVICDESQDVAIRGRSRFNILGNTKVMNMEESNGSLAEFFKHLTLREQRQNGGRTNSDASLIVTEELHLITFETEVHGGKIDLETHSLPVPVINSICQMPNNAWASILW	480
莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	STAT3a2	YQLKIKVICDESQDVAIRGRSRFNILGNTKVMNMEESNGSLAEFFKHLTLREQRQNGGRTNSDASLIVTEELHLITFETEVHGGKIDLETHSLPVPVINSICQMPNNAWASILW	480
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	YQLKIKVICDESQDVAIRGRSRFNILGNTKVMNMEESNGSLAEFFKHLTLREQRQNGGRTNSDASLIVTEELHLITFETEVHGGKIDLETHSLPVPVINSICQMPNNAWASILW	480
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	YQLKIKVICDESQDVAIRGRSRFNILGNTKVMNMEESNGSLAEFFKHLTLREQRQNGGRTNSDASLIVTEELHLITFETEVHGGKIDLETHSLPVPVINSICQMPNNAWASILW	480
		尾端结构域	
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	STAT3-L	YNMLTNHPKNVNFVTFKPPVGTWQDVAEVLWSQFSSTTKRGLTLEQLTLAEKLLGPCVNSGCCITWAKFCENMAGKGFSEFWWLDNIIDLKVKYIALLWNGVIMGFSKERRERAILS	527
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	STAT3-S	YNMLTNHPKNVNFVTFKPPVGTWQDVAEVLWSQFSSTTKRGLTLEQLTLAEKLLGPCVNSGCCITWAKFCENMAGKGFSEFWWLDNIIDLKVKYIALLWNGVIMGFSKERRERAILS	393
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	YNMLTNHPKNVNFVTFKPPVGTWQDVAEVLWSQFSSTTKRGLTLEQLTLAEKLLGPCVNSGCCITWAKFCENMAGKGFSEFWWLDNIIDLKVKYIALLWNGVIMGFSKERRERAILS	600
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	YNMLTNHPKNVNFVTFKPPVGTWQDVAEVLWSQFSSTTKRGLTLEQLTLAEKLLGPCVNSGCCITWAKFCENMAGKGFSEFWWLDNIIDLKVKYIALLWNGVIMGFSKERRERAILS	600
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a1	YNMLTNHPKNVNFVTFKPPVGTWQDVAEVLWSQFSSTTKRGLTLEQLTLAEKLLGPCVNSGCCITWAKFCENMAGKGFSEFWWLDNIIDLKVKYIALLWNGVIMGFSKERRERAILS	600
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a2	YNMLTNHPKNVNFVTFKPPVGTWQDVAEVLWSQFSSTTKRGLTLEQLTLAEKLLGPCVNSGCCITWAKFCENMAGKGFSEFWWLDNIIDLKVKYIALLWNGVIMGFSKERRERAILS	600
红鲌东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a1	YNMLTNHPKNVNFVTFKPPVGTWQDVAEVLWSQFSSTTKRGLTLEQLTLAEKLLGPCVNSGCCITWAKFCENMAGKGFSEFWWLDNIIDLKVKYIALLWNGVIMGFSKERRERAILS	600
红鲌东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a2	YNMLTNHPKNVNFVTFKPPVGTWQDVAEVLWSQFSSTTKRGLTLEQLTLAEKLLGPCVNSGCCITWAKFCENMAGKGFSEFWWLDNIIDLKVKYIALLWNGVIMGFSKERRERAILS	600
莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	STAT3a2	YNMLTNHPKNVNFVTFKPPVGTWQDVAEVLWSQFSSTTKRGLTLEQLTLAEKLLGPCVNSGCCITWAKFCENMAGKGFSEFWWLDNIIDLKVKYIALLWNGVIMGFSKERRERAILS	600
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	YNMLTNHPKNVNFVTFKPPVGTWQDVAEVLWSQFSSTTKRGLTLEQLTLAEKLLGPCVNSGCCITWAKFCENMAGKGFSEFWWLDNIIDLKVKYIALLWNGVIMGFSKERRERAILS	600
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	YNMLTNHPKNVNFVTFKPPVGTWQDVAEVLWSQFSSTTKRGLTLEQLTLAEKLLGPCVNSGCCITWAKFCENMAGKGFSEFWWLDNIIDLKVKYIALLWNGVIMGFSKERRERAILS	600

(图 2 Fig. 2)

		SH2 结构域	
日本鳊鱼 <i>A. japonica</i>	STAT3-L	TKPPGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
日本鳊鱼 <i>A. japonica</i>	STAT3-S	TRPFGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	PKPPGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	PKPPGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a1	PKPPGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a2	PKPPGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a1	PKPPGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a2	PKPPGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	STAT3a1	PKPPGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	STAT3a2	PKPPGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	PKPPGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	PKPPGTFLLRFESESSKEGGITFTWVEKDI	SGTKIQSVEPYTKQQLNSMSFAEIMGYKIMDATN
日本鳊鱼 <i>A. japonica</i>	STAT3-L	PFLFTDLP--ELLVNGFPGTNSGNTSDPFLD	SHLDSLMNGDGDADSPQGLSESLTSMKDYSSSDMASFN-----
日本鳊鱼 <i>A. japonica</i>	STAT3-S	-----TNSGNTSDPFLD	SHLDSLMNGDGDADSPQGLSESLTSMKDYSSSDMASFN-----
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	PSVFMDFPDSLELLGNGFPGTNSGNTSDLP	FPMSPRTLDSLMHNEAANPGLSESLTLDLMSLSDHSPMREGFAATVSDMDTCR
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	-----TNSGNTSDLP	FPMSPRTLDSLMHNEAANPGLSESLTLDLMSLSDHSPMREGFAATVSDMDTCR
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a1	PSVFMDFPDSLELLGNGFPGTNSGNTSDLP	FPMSPRTLDSLMHNEAANPGLSESLTLDLMSLSDHSPMREGFAATVSDMDTCR
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	STAT3a2	-----TNSGNTSDLP	FPMSPRTLDSLMHNEAANPGLSESLTLDLMSLSDHSPMREGFAATVSDMDTCR
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a1	-----TNSGNTSDLP	FPMSPRTLDSLMHNEAANPGLSESLTLDLMSLSDHSPMREGFAATVSDMDTCR
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	STAT3a2	PSVFMDFPDSLELLGNGFPGTNSGNTSDLP	FPMSPRTLDSLMHNEAANPGLSESLTLDLMSLSDHSPMREGFAATVSDMDTCR
莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	STAT3a1	-----TNSGNTSDLP	FPMSPRTLDSLMHNEAANPGLSESLTLDLMSLSDHSPMREGFAATVSDMDTCR
莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	STAT3a2	PSVFMDFPDSLELLGNGFPGTNSGNTSDLP	FPMSPRTLDSLMHNEAANPGLSESLTLDLMSLSDHSPMREGFAATVSDMDTCR
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a1	-----TNSGNTSDLP	FPMSPRTLDSLMHNEAANPGLSESLTLDLMSLSDHSPMREGFAATVSDMDTCR
草鱼 <i>C. idella</i>	STAT3a2	-----TNSGNTSDLP	FPMSPRTLDSLMHNEAANPGLSESLTLDLMSLSDHSPMREGFAATVSDMDTCR
			QEHMQSTP--LSFLYNDGQCSHY-----

图 2 硬骨鱼类 STAT3 氨基酸序列比对

相同的氨基酸用*表示,相似的氨基酸用.和:表示;保守的结构域在比对序列上方用箭头表示;所用序列登录号:草鱼(CiSTAT3a1, KC978890; CiSTAT3a2, KC978891; CiSTAT3b1, KU559609; CiSTAT3b2, KU559610),斑马鱼(DrSTAT3a1, NM_131479; DrSTAT3a2, XM_005163796),红鳍东方鲀(TrSTAT3a1, XM_003964795; TrSTAT3a2, XM_003964796),莫桑比克罗非鱼(OmSTAT3a1, XM_013269622; OmSTAT3a2, XM_013269621)

Fig. 2 Multiple alignment of teleost STAT3 proteins

Identical residues are indicated with asterisks (*), and similar amino acids are indicated with dots (.) and colons (:); the conserved domains of STAT3 are indicated by the arrows above the alignment; GenBank accession numbers are as follows: *C. idella* (CiSTAT3a1, KC978890; CiSTAT3a2, KC978891; CiSTAT3b1, KU559609; CiSTAT3b2, KU559610), *D. rerio* (DrSTAT3a1, DrNM_131479; DrSTAT3a2, XM_005163796), *Takifugu rubripes* (TrSTAT3a1, XM_003964795; TrSTAT3a2, XM_003964796), *O. mossambicus* (OmSTAT3a1, XM_013269622; OmSTAT3a2, XM_013269621)

2.4 亚细胞定位分析

实验构建了 AjSTAT3-L 和 AjSTAT3-S 真核表达质粒,分别将其转染至 EPC 细胞中,并于转染 24 h 后,利用免疫荧光技术分析了 AjSTAT3-L 和 AjSTAT3-S 在细胞中的分布,结果表明 AjSTAT3-L 和 AjSTAT3-S 均定位于细胞质(图 5)。

2.5 荧光素酶分析

为研究 STAT3 在鱼类抗病毒免疫应答中的作用,实验利用双荧光素酶报告系统分析了 AjSTAT3-L 和 AjSTAT3-S 对 I 型 IFN 启动子及 Mx 启动子的调控作用。结果显示,过表达 AjSTAT3-L 和 AjSTAT3-S 可显著抑制由 Poly I : C 所诱导的 AjIFN2-pro 启动子的活性,分别为对照组的 0.19 倍和 0.15 倍(图 6)。此外,过表达 AjSTAT3-L 和 AjSTAT3-S 均可显著抑制由 Poly I : C 所诱导的 AjMxB-pro (0.35 倍和 0.26 倍)和 AjMxC-pro (0.29 倍和 0.10 倍)的荧光素酶活性。

3 讨论

STAT3 是一类多功能的转录因子,主要参与由 IL-6 和 IL-10 家族成员等介导的信号转导过程,在机体的免疫调节、炎症、细胞增殖等生理过程中发挥重要的作用[31-32]。近年来的研究表明,病毒感染会导致 STAT3 的活化,进而抑制

I 型 IFN 介导的抗病毒免疫应答[33-34]。Ho 等[35]发现在 THP-1 细胞中过表达 STAT3 可抑制由 IFN α 诱导的 IRF1、趋化因子 9 (chemokine C-X-C Motif ligand 9, CXCL9) 及 CXCL10 的上调表达,而敲低 STAT3 则导致一系列抗病毒免疫基因表达量的上调,包括黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation-associated protein 5, MDA5)、维甲酸诱导型基因 I (retinoic acid-inducible gene I, RIG-I) 和 IFN α 等,推测 STAT3 在 IFN 信号途径中发挥的负调控作用[36]。本实验发现过表达 AjSTAT3 可显著抑制由 Poly I : C 诱导的 I 型 IFN 及 Mx 基因启动子的激活,表明硬骨鱼类 STAT3 可能类似于哺乳动物,具有负调控抗病毒免疫应答的作用。真核生物可通过多种转录抑制机制调控基因表达,防止其过度激活。例如,负调控因子与转录因子相互结合,阻抑转录复合体的组装;或与转录因子竞争结合靶基因启动子;或与转录因子相互作用,影响其活性;或募集重塑复合物、组蛋白修饰酶改变染色质构型等[37]。哺乳动物中的研究结果显示,IFN 与其受体结合后可活化 STAT3,后者可与 STAT1 形成异源二聚体,进而阻抑 ISGF3 (IRF9 : STAT1 : STAT2) 转录复合物或 STAT1 同源二聚体的组装,从而抑制依赖 STAT1 的信号通路的靶基因表达[34]。此外,STAT3 可结合于 STAT1、STAT2、IRF7 及 IRF9 的启动子,抑制其表达,从而实现对 IFN

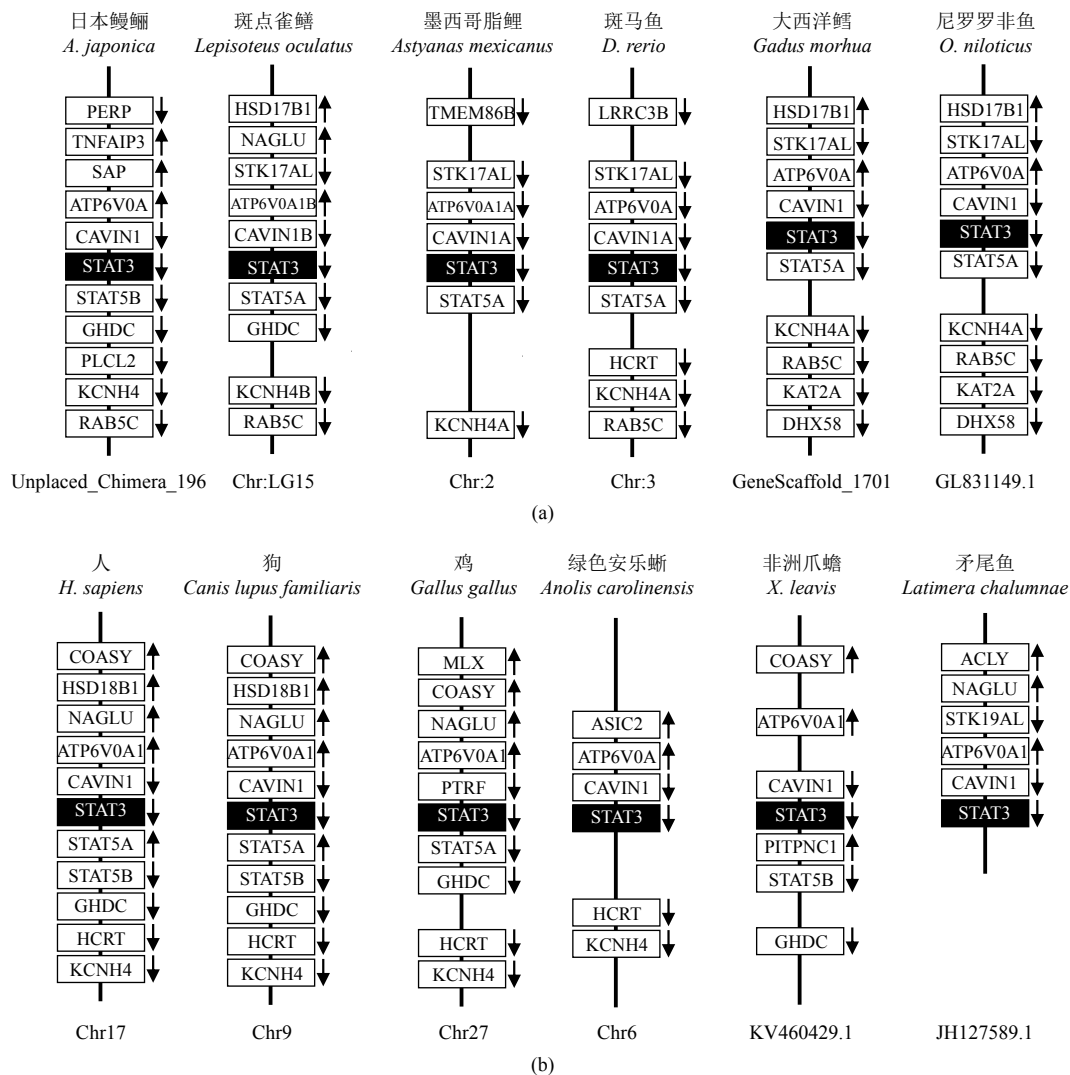


图 3 鱼类 *STAT3*(a) 及其他脊椎动物 *STAT3*(b) 基因座位的同线性分析

方框示保守的基因, 竖线表示染色体, 方框下方的数字表示染色体编号或 scaffold 名称, 箭头示基因转录方向

Fig. 3 Synteny comparison of gene loci of *STAT3* in teleosts (a) and other vertebrates (b)

Conserved genes are boxed, and vertical lines represent chromosome, numbers below boxes denote chromosome number or scaffold names, arrows indicate the transcription orientation of each gene

信号通路中抗病毒基因表达的负调控作用^[38]。有趣的是, 部分由 *ISGF3* 驱动表达的基因, 如 2'-5'寡腺苷酸合成酶基因 (2'-5'Oligoadenylate synthetase, *OAS*)、Mx 蛋白 2 基因 (Myxovirus resistance protein 2, *Mx2*)、*Viperin* 等则不受 *STAT3* 的负调控, 表明 *STAT3* 在 IFN α 信号途径中的负调控作用仅限于特定的基因, 然具体机制有待于进一步研究^[34, 39]。

在哺乳动物中的研究发现, *STAT3* 存在多种可变剪切。例如, Shao 等^[40] 从人和小鼠基因文库中鉴定得到 *STAT3 β* , 该转录本利用位于第 23 外显子上可变剪切受体位点, 使第 23 外显子

前 50 个核苷酸缺失, 并导致移码和翻译提前终止。致使翻译后的 *STAT3 β* 蛋白缺失 TAD 的 55 个氨基酸残基^[13]。鱼类 *STAT* 也存在多种剪切形式。相较于全长形式的 *STAT3*, 草鱼和斑马鱼 *STAT3a1* 缺失第 22 外显子。而 *STAT3a2* 则在 *STAT3a1* 的基础上, 缺失第 23 外显子的 60 bp^[20]。本研究序列分析结果显示, *AjSTAT3-L* 与其他鱼类 *STAT3a1* 序列结构类似, 而 *AjSTAT3-S* 使用第 2 外显子可变剪切受体位点, 并缺失第 3 至第 7 外显子, 且第 8 个外显子缺失 15 个碱基, 导致其翻译后的蛋白缺失 CCD 结构域。并且, 第 21 外显子缺失, 致使 NTD 结构域缺失 69 个氨基酸。该转录形式

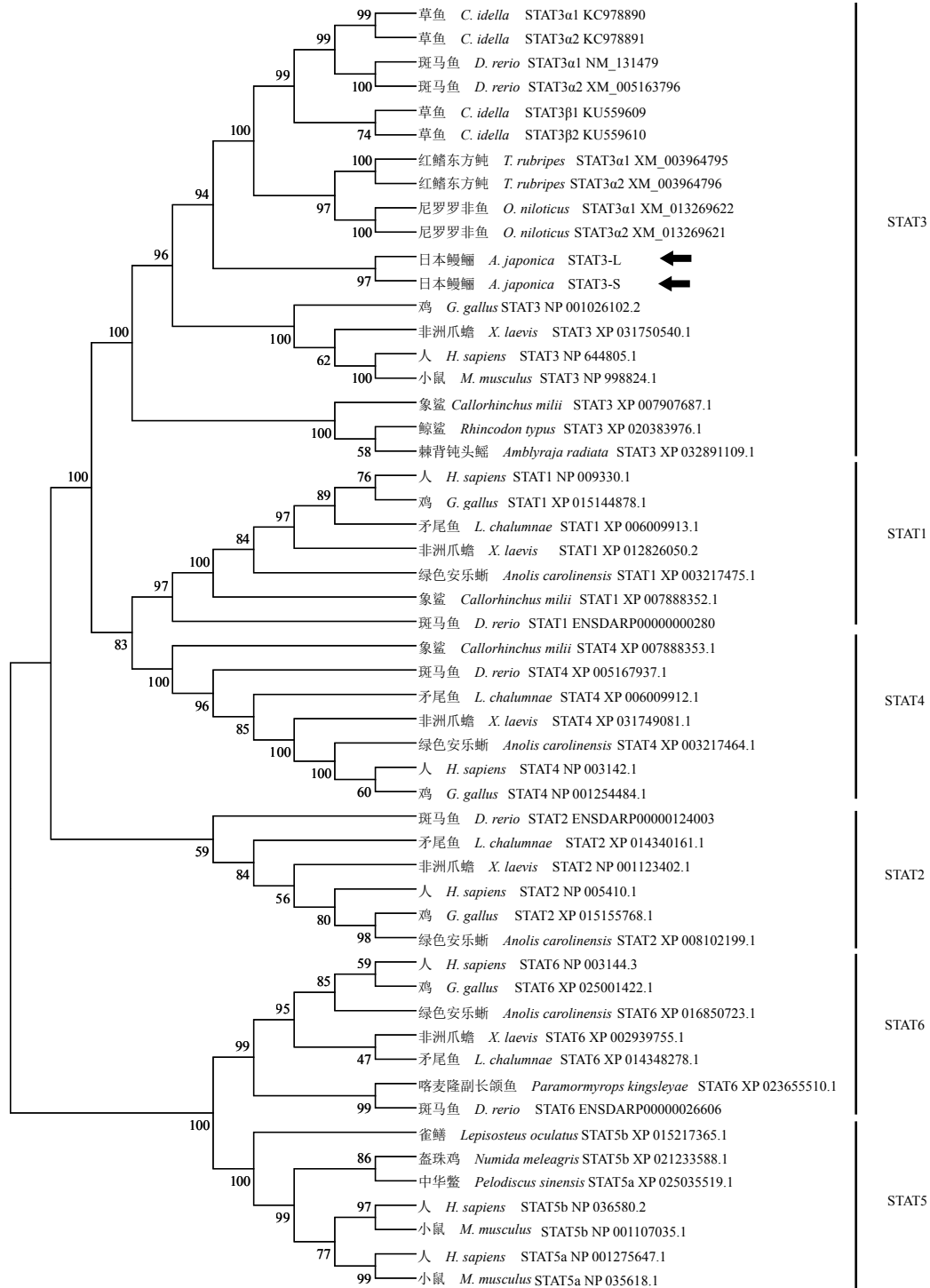


图 4 脊椎动物 STAT 基因的系统进化分析

利用 MEGAX 软件的 NJ (Neighbor-Joining) 法构建系统进化树，节点上的数字表示为 bootstrap 的置信度；箭头所示为日本鳗鲡 STAT3

Fig. 4 Phylogenetic analysis of vertebrate STATs

The NJ phylogenetic tree was constructed by MEGA-X software; bootstrap values are indicated at nodes; arrows indicate the *AjSTAT3*

的 *STAT3* 为首次发现，尚未见报告。双荧光素酶报告结果显示，类似于 *AjSTAT3-L*，过表达 *AjSTAT3-S* 亦可显著抑制有 Poly I : C 诱导的 I 型 *IFN* 以及 *Mx* 基因启动子的活化，表明短型的

STAT3 参与了机体的免疫应答。已有的研究表明，*STAT3* 的 CCD 结构域对于 *STAT3* 与 IL-6 受体结合，以及随后的酪氨酸磷酸化和酪氨酸磷酸化依赖性活性 (例如二聚体形成，核易位和

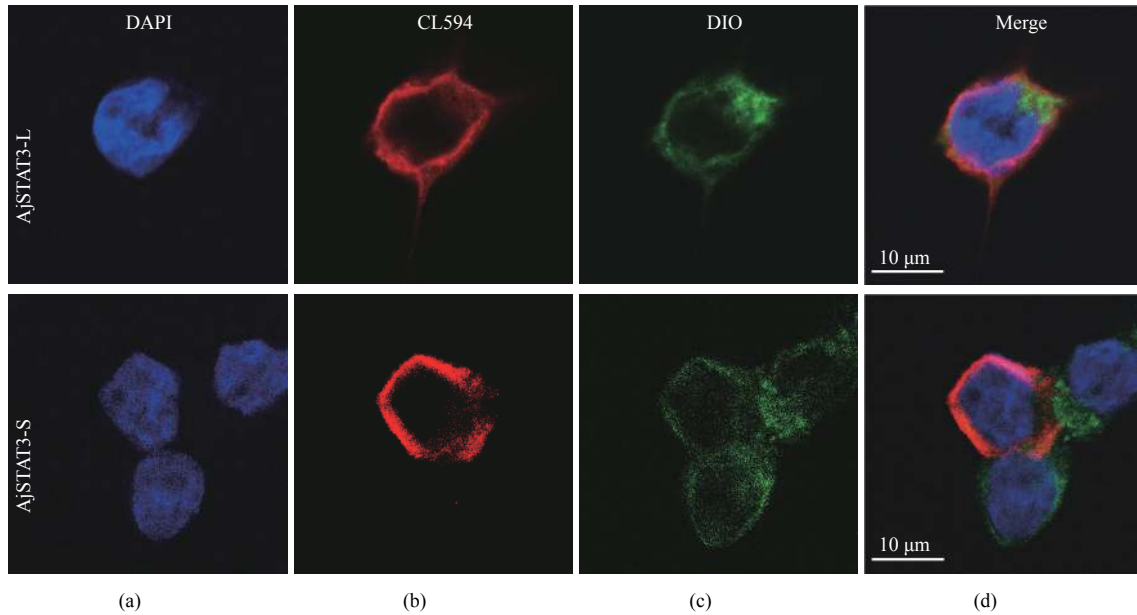


图 5 AjSTAT3-L 和 AjSTAT3-S 的亚细胞定位

(a) DAPI 染色, 示细胞核; (b) CL594 染色, 示 AjSTAT3-L 或 AjSTAT3-S; (c) DIO 染色, 示细胞质和膜; (d) 合并后的图像

Fig. 5 Subcellular localization of AjSTAT3-L and AjSTAT3-S

(a) Nuclei were stained with DAPI, (b) AjSTAT3-L or AjSTAT3-S were stained with CL594, (c) cytoplasm and cell membrane were stained with DIO, (d) the merged image is shown in the right panel

DNA 结合等) 至关重要。缺失 CCD 结构域后, 由表皮生长因子或 IL-6 诱导的 Tyr705 磷酸化被抑制^[41]。STAT3 缺失 CCD 结构域的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 螺旋基序后, 其与 IL-6 受体亚基 gp130 的结合作用被抑制^[41]。然而, 缺失 CCD 结构域的 AjSTAT3-S 仍然能抑制由 Poly I : C 诱导的 AjIFN2 及 Mx 启动子活性, 推测 AjSTAT3-S 负调控 I 型 IFN 介导的免疫应答可能是通过竞争性结合靶基因

启动子, 或是调控其他负调控因子 (如 SOCS 蛋白等) 的表达等方式来实现。

哺乳动物中 STAT3 主要分布于细胞核, 并且可在细胞核与细胞质之间穿梭^[3,42]。然而, Ma 等^[43]利用表皮生长因子或 IL-6 处理 COS-1 和 HepG2 细胞系后发现, 鼠 STAT3 主要定位于细胞质, 经过磷酸化激活后入核。这种差异可能是由于不同研究使用了不同的诱导剂激活处理细胞,

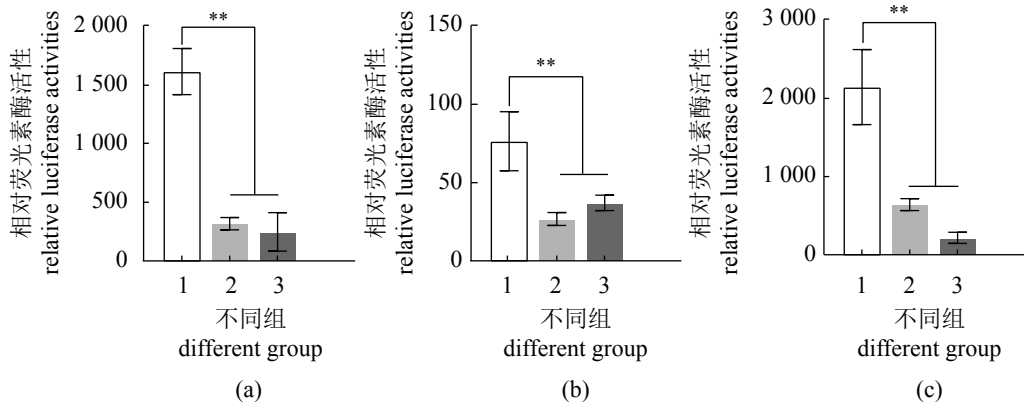


图 6 AjSTAT3-L 及 AjSTAT3-S 对 IFN 及 Mx 启动子调控作用

(a) AjIFN2-pro, (b) AjMxB-pro, (c) AjMxC-pro; 1. FLAG, 2. AjSTAT3-L, 3. AjSTAT3-S; 每个实验重复 3 次, 数据为 3 次实验的平均值 \pm 标准差; 星号表示差异显著 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

Fig. 6 Effect of AjSTAT3-L and AjSTAT3-S on the luciferase activity of the eel IFN or Mx promoter constructs

(a) AjIFN2-pro, (b) AjMxB-pro, (c) AjMxC-pro; 1. FLAG, 2. AjSTAT3-L, 3. AjSTAT3-S; results are representative of three independent experiments, each performed in triplicate; data are mean \pm SD; * above each bars indicate significant difference (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) compared with control

而内源性或外源性 STAT3 可与活化的 STAT1 形成二聚体, 并利用 STAT1 的核定位信号进入细胞核^[42]。在草鱼中的研究发现, STAT3 分布于细胞质中, 且病毒癌基因表达蛋白 v-Src 可诱导草鱼 STAT3 进细胞核^[20]。本研究利用免疫荧光技术对观察到 AjSTAT3-L 和缺失 CCD 结构域的 AjSTAT3-S 均分布于细胞质中。哺乳动物 STAT3 的 CCD 结构域中存在一段核定位信号, 核转运蛋白 importin- α 3 通过识别该核定位信号, 将 STAT3 运输至细胞核^[44-45]。Ma 等^[43]利用点突变分析发现, CCD 结构域的 α 2 螺旋中第 214、215 位精氨酸, 以及 DBD 结构域 414 和 417 位精氨酸对 STAT3 入核转移至关重要。鼠 STAT3 的 Arg214、Arg215 突变后, 对其入核无影响^[42]。本研究发现 AjSTAT3-L 的 CCD 结构域中存在一段潜在的核定位信号, 在其第 214、215 和 414、417 位均为保守的精氨酸, 推测 AjSTAT3-L 的入核机制可能与哺乳动物类似。AjSTAT3-S 因缺失 CCD 结构域, 无明确的核定位信号序列, 其具体入核机制仍有待进一步研究。

总之, 本研究克隆获得了日本鳗鲡 *STAT3* 及其剪切异构体 (*AjSTAT3-L* 和 *AjSTAT3-S*), 利用免疫荧光检测了二者在细胞中的定位, 发现二者均定位于细胞质中。利用荧光素酶报告系统分析了 *AjSTAT3-L* 及 *AjSTAT3-S* 对鱼类 I 型 *IFN* 启动子及 *Mx* 启动子的调控作用, 发现过表达 *AjSTAT3-L* 及 *AjSTAT3-S* 均可抑制由 Poly I : C 诱导的 AjIFN2 和 AjMx 启动子的活化。实验所获得的数据将有助于进一步解析 STAT3 在鱼类抗病毒免疫应答中的作用及其分子机制。

参考文献 (References):

- [1] Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(11): 900-911.
- [2] Levy D E, Darnell J E Jr. STATs: transcriptional control and biological impact[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3(9): 651-662.
- [3] Reich N C, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6(8): 602-612.
- [4] Shuai K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins[J]. *Oncogene*, 2000, 19(21): 2638-2644.
- [5] Lutticken C, Wegenka U M, Yuan J, et al. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130[J]. *Science*, 1994, 263(5143): 89-92.
- [6] Standke G J, Meier V S, Groner B. Mammary gland factor activated by prolactin on mammary epithelial cells and acute-phase response factor activated by interleukin-6 in liver cells share DNA binding and transactivation potential[J]. *Molecular Endocrinology*, 1994, 8(4): 469-477.
- [7] Zhong Z, Wen Z, Darnell J E Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6[J]. *Science*, 1994, 264(5155): 95-98.
- [8] Ruff-Jamison S, Zhong Z, Wen Z L, et al. Epidermal growth factor and lipopolysaccharide activate Stat3 transcription factor in mouse liver[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(35): 21933-21935.
- [9] Tian S S, Lamb P, Seidel H M, et al. Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor[J]. *Blood*, 1994, 84(6): 1760-1764.
- [10] Aggarwal B B, Kunnumakkara A B, Harikumar K B, et al. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009, 1171(1): 59-76.
- [11] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(11): 798-809.
- [12] Hevehan D L, Miller W M, Papoutsakis E T. Differential expression and phosphorylation of distinct STAT3 proteins during granulocytic differentiation[J]. *Blood*, 2002, 99(5): 1627-1637.
- [13] Zhang H X, Yang P L, Li E M, et al. STAT3beta, a distinct isoform from STAT3[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2019, 110: 130-139.
- [14] Oates A C, Wollberg P, Pratt S J, et al. Zebrafish *stat3* is expressed in restricted tissues during embryogenesis and *stat1* rescues cytokine signaling in a *STAT1*-deficient human cell line[J]. *Developmental Dynamics*, 1999, 215(4): 352-370.
- [15] Guo C J, Zhang Y F, Yang L S, et al. The JAK and STAT family members of the mandarin fish *Siniperca chuatsi*: molecular cloning, tissues distribution and

- immunobiological activity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 349-359.
- [16] Wei J, Fan Z H, Yang Z, *et al.* Leukemia inhibitory factor is essential for the self-renewal of embryonic stem cells from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) through stat3 signaling[J]. *Stem Cells and Development*, 2018, 27(2): 123-132.
- [17] Guo T, Leng X J, Wu X F, *et al.* Cloning, molecular characterization, and expression analysis of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(5): 1624-1634.
- [18] Huang X H, Huang Y H, Yang Y, *et al.* Involvement of fish signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in SGIV replication and virus induced parapneumonia[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 308-316.
- [19] Bathige S D N K, Thulasitha W S, Umasuthan N, *et al.* A homolog of teleostean signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) from rock bream, *Oplegnathus fasciatus*: structural insights, transcriptional modulation, and subcellular localization[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2017, 186: 29-40.
- [20] Du L Y, Zhou H, Qin L, *et al.* Identification and functional evaluation of two STAT3 variants in grass carp: implication for the existence of specific alternative splicing of STAT3 gene in teleost[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 76: 326-333.
- [21] Wang L Q, Wu Z, Huang Q L, *et al.* Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) STAT3 regulates the eIF2 α phosphorylation through interaction with PKR[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 78: 26-34.
- [22] Ivashkiv L B, Donlin L T. Regulation of type I interferon responses[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14(1): 36-49.
- [23] Lamb P, Seidel H M, Haslam J, *et al.* STAT protein complexes activated by interferon- γ and gp130 signaling molecules differ in their sequence preferences and transcriptional induction properties[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(16): 3283-3289.
- [24] Garcia-Diaz A, Shin D S, Moreno B H, *et al.* Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression[J]. *Cell Reports*, 2017, 19(6): 1189-1201.
- [25] Huang Y H, Huang X H, Yang Y, *et al.* Involvement of fish signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in nodavirus infection induced cell death[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 241-248.
- [26] Kim H J, Yu J H, Kim D W, *et al.* Molecular evidence of anguillid herpesvirus-1 (AngHV-1) in the farmed Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel, in Korea[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, 35(4): 315-319.
- [27] 陈强, 李英英, 杨金先, 等. 鳊疱疹病毒对欧洲鳊的致病性[J]. *水产学报*, 2021, 45(6): 940-947.
- Chen Q, Li Y Y, Yang J X, *et al.* Pathogenicity of Anguillid herpesvirus to *Anguilla anguilla*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(6): 940-947(in Chinese).
- [28] Solovyev V, Kosarev P, Seledsov I, *et al.* Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters[J]. *Genome Biology*, 2006, 7(S1): S10.
- [29] Huang B, Wang Z X, Zhang C, *et al.* Identification of a novel RIG-I isoform and its truncating variant in Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 373-380.
- [30] Huang B, Wang Z X, Liang Y, *et al.* Identification of four type I IFNs from Japanese eel with differential expression properties and Mx promoter inducibility[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 91: 62-71.
- [31] Hillmer E J, Zhang H Y, Li H S, *et al.* STAT3 signaling in immunity[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2016, 31: 1-15.
- [32] Guanizo A C, Fernando C D, Garama D J, *et al.* STAT3: a multifaceted oncoprotein[J]. *Growth Factors*, 2018, 36(1-2): 1-14.
- [33] Yang L J, Xu J Y, Guo L J, *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus-induced epidermal growth factor receptor activation impairs the antiviral activity of type I interferon[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(8): e02095-17.
- [34] Tsai M H, Pai L M, Lee C K. Fine-tuning of type I interferon response by STAT3[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1448.
- [35] Ho H H, Ivashkiv L B. Role of STAT3 in type I interferon responses: negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(20): 14111-14118.

- [36] Wang W B, Levy D E, Lee C K. STAT3 negatively regulates type I IFN-mediated antiviral response[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(5): 2578-2585.
- [37] Jackson M E. Negative regulation of eukaryotic transcription[J]. *Journal of Cell Science*, 1991, 100(Pt 1): 1-7.
- [38] Lu L, Zhu F, Zhang M L, *et al.* Gene regulation and suppression of type I interferon signaling by STAT3 in diffuse large B cell lymphoma[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(3): E498-E505.
- [39] Mahony R, Gargan S, Roberts K L, *et al.* A novel antiviral role for STAT3 in IFN- α signalling responses[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(9): 1755-1764.
- [40] Shao H, Quintero A J, Tweardy D J. Identification and characterization of *cis* elements in the *STAT3* gene regulating *STAT3 α* and *STAT3 β* messenger RNA splicing[J]. *Blood*, 2001, 98(13): 3853-3856.
- [41] Zhang T, Kee W H, Seow K T, *et al.* The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(19): 7132-7139.
- [42] Liu L, McBride K M, Reich N C. STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- α 3[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(23): 8150-8155.
- [43] Ma J, Zhang T, Novotny-Diermayr V, *et al.* A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(31): 29252-29260.
- [44] Vogt M, Domszalai T, Kleshchanok D, *et al.* The role of the N-terminal domain in dimerization and nucleocytoplasmic shuttling of latent STAT3[J]. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(Pt 6): 900-909.
- [45] Ivanov V N, Bhoumik A, Krasilnikov M, *et al.* Cooperation between STAT3 and c-Jun suppresses *Fas* transcription[J]. *Molecular Cell*, 2001, 7(3): 517-528.

Cloning, subcellular localization and functional analysis of STAT3 and its splicing isomer in Japanese eel (*Anguilla japonica*)

LI Wenxing¹, ZHENG Fang¹, LING Lulu¹, LIANG Ying^{1,2},
HUANG Wenshu^{1,2,3}, NIE Pin⁴, HUANG Bei^{1,2,3*}

(1. College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Engineering Research Center of the Modern Industry Technology for Eel, Ministry of Education, jimei University, Xiamen 361021, China;

3. Engineering Research Center of Aquaculture Breeding and Healthy Aquaculture of Fujian, jimei University, Xiamen 361021, China;

4. School of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266237, China)

Abstract: Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is a member of the STAT protein family that controls cell proliferation, differentiation and inflammation. Recent studies have found that STAT3 also plays a key role in regulating host antiviral immune response. In order to study the roles of STAT3 in teleost antiviral response, two cDNA sequences encoding STAT3 (*AjSTAT3-L* and *AjSTAT3-S*) were obtained from *Anguilla japonica*, by reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends PCR (RACE-PCR) experiments. The open reading frames of *AjSTAT3-L* and *AjSTAT3-S* are 2349 bp and 1470 bp in length, coding 782 and 489 amino acids (aa), respectively. Gene structure analysis revealed that *AjSTAT3-L* consists of 23 exons and 22 introns, while *AjSTAT3-S* was generated by alternative splicing lacking the exons 2-7 and exon 21. Similar to its mammalian counterpart, the predicted protein sequence of *AjSTAT3-L* possesses an N terminal domain (NTD, 1-120 aa), a coiled coil domain (CCD, 104-313 aa), a DNA binding domain (DBD, 325-462 aa) and a Src homology 2 domain (SH2, 577-672 aa). Whereas, *AjSTAT3-S* lacks the entire CCD and C-terminal tail sequence of NTD (69 aa). Phylogenetic analysis showed that *AjSTAT3-L* and *AjSTAT3-S* formed a basal clade to teleost STAT3, and vertebrate STAT3 genes were grouped together to form a clade that was sister to the clade of STAT1 and STAT4. Subcellular localization experiments showed that *AjSTAT3-L* and *AjSTAT3-S* are predominantly localized in cytoplasm. Luciferase reporter assays were performed to study the effect of *AjSTAT3-L* and *AjSTAT3-S* on the transcriptional activity of antiviral genes, showing that the overexpression of *AjSTAT3-L* or *AjSTAT3-S* suppressed the Poly I : C-induced activation of *IFN* and *Mx* promoters. Taken together, we have identified *AjSTAT3* and its transcript variant, a novel isoform of STAT3 generated by alternative splicing. Both isoforms are functionally relevant and played a negative regulatory role in fish antiviral immune response.

Key words: *Anguilla japonica*; signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3); subcellular localization; negative regulation

Corresponding author: HUANG Bei. E-mail: huangbei@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32073011); Natural Science Foundation of Fujian Province (2020J01666); Natural Science Foundation of Fujian Province for Distinguished Young Scholars (2016J06008)