



中华鳖趋化因子 CXCL10 的分子特征及其对细菌感染的响应

张爱茹¹, 黄秋雅¹, 吴彬¹, 钱国英¹, 张海琪^{2*}, 徐洁皓^{1*}

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315100;

2. 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室,
浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 浙江湖州 313001)

摘要: 为研究趋化因子基因 *cxc10* 的表达特征及其对外源病原微生物的响应, 实验以中华鳖为对象, 利用生物信息学分析 CXCL10 蛋白的分子特征及系统进化, 通过荧光定量 PCR (qPCR) 技术检测该基因在健康中华鳖各组织中的表达分布及其在革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性菌嗜水气单胞菌胁迫下 mRNA 的表达规律。结果显示, 该蛋白分子质量为 10.89 ku, 等电点为 9.62, 存在信号肽和磷酸化位点, 单链包含 1 个 N 端的 loop 区、1 个 α 螺旋和 3 个反向平行 β 折叠; 该基因在健康中华鳖的肝脏和心脏中表达量最高, 在血细胞中表达量最低; 两种细菌的刺激能促使中华鳖组织器官中 *cxc10* 及炎症相关因子基因 *tnf-a* 和 *il-1 β* mRNA 表达量的显著上调。研究表明, *cxc10* 可能在中华鳖机体抗菌免疫过程中发挥重要作用。本实验可为中华鳖病害防治提供理论基础。

关键词: 中华鳖; CXCL10; mRNA 表达; 生物信息学

中图分类号: Q 786; S 947.1

文献标志码: A

趋化因子 (chemokine) 是一类高度保守的小分子细胞因子, 分子质量为 8~12 ku^[1-2], 它可以在机体感染部位聚集从而激活白细胞, 在炎症反应和非特异性免疫应答中具有重要作用^[3-4]。根据结构, 趋化因子可分为 4 个亚家族: CXC、CC、C 和 CX3C^[1, 5]。CXCL10 又称为干扰素 γ 诱导蛋白 10 (IP-10), 与 CXCL9 和 CXCL11 同属于 ELR-CXC 趋化因子亚家族, 主要通过 G 蛋白偶联受体 CXCR3 相互作用, 控制各种免疫细胞间的定向转移^[6-7], 可介导 Th 型炎症反应, 趋化 T 淋巴细胞和单核细胞, 与炎症性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤等有关^[8-12]。有研究显示, CXCL10 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有直接抑制作用^[13-16],

且在机体被细菌感染后该基因被诱导显著上调^[17]。如感染嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 后, *cxc10* 在棘胸蛙 (*Quasipaa spinosa*) 脾脏和血液中的表达量明显增加^[5]。在鲟爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 感染后斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*) 和长鳍叉尾鲟 (*I. furcatus*) 头肾和脾脏中的 *cxc10* 呈现高表达, 且其在斑点叉尾鲟体内的表达量远高于长鳍叉尾鲟^[18]。

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 是我国常见的水产经济养殖品种之一, 随着人们对中华鳖等珍贵水产品需求量不断增加, 高密度工业化养殖模式日益普遍, 中华鳖在养殖时易受各类病原微生物

收稿日期: 2022-02-18 修回日期: 2022-03-21

资助项目: 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室开放基金 (ZJK202011); 浙江省生物工程一流学科 (A 类) 自设课题项目 (CX2020030); 浙江省大学生科技创新活动计划 (新苗人才计划) (2020R419012); 浙江省大学生创新创业训练计划项目 (S202010876083)

第一作者: 张爱茹 (照片), 从事水产动物疾病和免疫防治研究, E-mail: 2421932546@qq.com

通信作者: 张海琪, 从事水产育种和病害防治研究, E-mail: zmk407@126.com;

徐洁皓, 从事水产动物疾病和免疫防治研究, E-mail: xujiehao@zwu.edu.cn



的侵害。研究表明趋化因子 CXCL10 在炎症中发挥重要作用, 阐明趋化因子参与机体抵抗细菌感染的反应机制, 有助于进一步了解中华鳖免疫系统, 可为治疗多重耐药菌、条件致病菌引起的感染提供思路, 促进中华鳖养殖行业的健康发展。

本实验利用生物信息学方法分析 CXCL10 蛋白结构信息, 并以中华鳖为实验对象, 利用荧光定量 PCR (qPCR) 检测 *cxc110* 在健康中华鳖不同组织中的表达情况, 及革兰氏阴性菌嗜水气单胞菌和阳性菌金黄色葡萄球菌刺激对免疫器官中趋化因子 *cxc110* 和炎症相关因子 *tnf-a*、*il-1β* 表达量的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用体重为 (47.97±9.20) g 的中华鳖均购自湖州南浔联达水产养殖专业合作社, 养殖于水族箱 (35 cm×45 cm×19 cm), 箱内铺沙 3 cm, 水温控制在 (25±1) °C, 每日投喂 1 次, 根据水质状况进行换水, 于养殖室暂养 1 周。选取活力好、体格相近的健康中华鳖进行实验。

本实验所用的 PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。RNA 提取液 RNAiso Plus 和反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 荧光定量试剂盒 SYBR Green Real time PCR Master Mix 购自罗氏集团 (瑞士), 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司,

其余试剂均为国产分析纯。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

利用 RNAiso Plus 提取中华鳖各组织的总 RNA, 以 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性, 使用超微量分光光度计 (Nanodrop 2000) 检测 RNA 样品的 OD₂₆₀ 和 OD_{260/280}。利用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒反转录合成 cDNA, 并置于 -20 °C 保存备用。

1.3 中华鳖 *cxc110* 基因的克隆

根据中华鳖趋化因子 *cxc110* 的 mRNA 序列设计引物 CXCL10-F 和 CXCL10-R, 引物两端分别添加限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点 (表 1)。以中华鳖肝脏和心脏组织的 cDNA 为模板, 以 CXCL10-F/R 为引物按 *Taq* PCR Master Mix 说明书进行常规 PCR 克隆。PCR 反应体系总体积为 50 μL, 包括 *Taq* PCR master Mix 25 μL、Primer F/R 各 1 μL、cDNA 2 μL、ddH₂O 补充至 50 μL。PCR 反应程序: 预变性 94 °C 4 min; 变性 94 °C 30 s、退火 55 °C 30 s、延伸 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min, 16 °C 保温。扩增得到的产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用洁净的刀片切下目的片段, 参照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的说明步骤进行 DNA 片段回收。随后将回收片段克隆到 pMD19-T 质粒, 重组载体转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TOP10F 感受态细胞, 经菌液 PCR 鉴定后送样测序。

表 1 实验所用的引物序列

Tab. 1 Sequences of primers used in this study

引物 primers	引物序列(5'→3') sequences	片段大小/bp fragment size	用途 usage
CXCL10-F	AT <u>TGGATCC</u> ATGAAGGAGCCTGGGCTG	321	原核表达引物
CXCL10-R	AGG <u>CTCGAG</u> TCAGGTGCGTGTTTTGTAAGAC		
CXCL10-q-F	GGGCTGTAGTTCCTTGTTC	182	荧光定量引物
CXCL10-q-R	AGTAGCAATGATCTCCACAT		
TNF-a-F	CCATCATCTCCATCCTTG	194	荧光定量引物
TNF-a-R	ACGGTCAGTGTGATATGTG		
IL-1β-F	GGACAATGACTTGAGCAGCA	226	荧光定量引物
IL-1β-R	AGCCATGTTTCAGCCTCACTT		
β-actin-F	GAGACCTGACAGACTACCT	156	内参基因引物
β-actin-R	AGGATGATGAAGCAGCAGT		

注: 下划线为酶切位点。
Notes: The underline marks the restriction enzyme cleavage site.

1.4 生物信息学分析

通过在线生物信息学软件 (表 2) 对中华鳖 CXCL10 核酸和蛋白质序列、理化性质、跨膜区、

信号肽、修饰位点、氨基酸同源性、3D 结构等方面进行分析。

表 2 CXCL10 生物信息学分析的工具

Tab. 2 Software for bioinformatic analysis of CXCL10

分析内容 analysis content	工具名称 tool name	软件或在线分析软件 software or online analysis software
核酸蛋白质序列分析 analysis of nucleic acid protein sequence	NCBI	http://www.ncbi.nlm.gov/blast
理化性质分析 analysis of physical and chemical properties	ExPASy-ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/
跨膜结构域预测 prediction of transmembrane domain	TMHMM	https://services.healthtech.dtu.dk/
信号肽预测 prediction of signal peptide	SignalP	https://services.healthtech.dtu.dk/
糖基化位点预测 prediction of glycosylation sites	NetNGlyc 1.0	https://services.healthtech.dtu.dk/
磷酸化位点预测 prediction of phosphorylation site	NetPhos 3.1	https://services.healthtech.dtu.dk/
氨基酸同源性对比 amino acid homology comparison	Clustal-W	DNAMAN
系统发育树构建 phylogenetic tree construction	Phylogenetic	Mega7
蛋白同源建模 protein homology modeling	SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org

1.5 荧光定量 PCR 检测中华鳖 *cxc10* mRNA 组织表达特征

根据中华鳖趋化因子 *cxc10* 基因序列 (GenBank: XM_006133884.3), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物 (表 1)。取 5 只暂养后健康中华鳖, 麻醉后断脖取血, 分离得到肝脏、脾脏、肺、肌肉、皮肤、小肠、大肠、心脏和肾脏等 9 个组织, 利用 TRIzol 法提取各组织总 RNA, 用反转录试剂盒合成 cDNA, 以该 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增, 每组设 3 个重复。荧光定量 PCR 仪 (Light Cycler[®]480) 进行 qPCR 检测, 反应体系参照罗氏荧光定量试剂盒说明书配制: 2×Master Mix 5 μL、Primer F/R 各 0.5 μL、cDNA 2.5 μL、ddH₂O 1.5 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 10 s, 共 40 个循环; 熔解曲线: 95 °C 5 s, 65 °C 1 min。根据 2^{-ΔΔC_t} 法计算每个组织的相对的表达量, 每个样品做 3 次技术重复, 并以 β-actin 为内参基因进行标准化计算。所有数据均用平均值±标准差 (mean±SE) 表示, 通过 SPSS 16.0 软件单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行分析, 利用 Origin 8.1 软件绘图, 实现实验数据变化趋势可视化。

1.6 细菌胁迫下的 *cxc10* 基因的时序性表达

从 LB 琼脂平板上分离出金黄色葡萄球菌和嗜水气单胞菌单菌落, 分别在 37 °C 和 28 °C 的 LB 液体培养基中培养 12 h, 4 000 r/min 离心 5 min,

磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤, 调节至 1×10⁷ CFU/mL。实验组分别为肌肉注射 200 μL 金黄色葡萄球菌液和嗜水气单胞菌液, 对照组为未注射的健康中华鳖。在处理 3、6、12、24、48 和 72 h 后, 分别取 5 只中华鳖采集脾脏、血液和肝脏进行 RNA 提取和 qPCR 实验。

2 结果

2.1 中华鳖趋化因子 *cxc10* 基因克隆与生物信息学分析

从 NCBI 上搜索得到的中华鳖趋化因子 *cxc10* 的 cDNA 序列中包含一个 303 bp 的开放阅读框 (ORF)。中华鳖肝脏和心脏组织 cDNA 中均能扩增目的基因 (图 1), 测序结果与目标序列 (GenBank: XM_006133884.3) 相一致。

中华鳖趋化因子 *cxc10* 的 ORF 编码 100 个氨基酸。理化性质分析结果显示, 其分子式预测为 C₄₇₅H₇₉₉N₁₃₉O₁₃₈S₇, 相对分子质量为 10.89 ku, 等电点为 9.62。在氨基酸组成中, 有 15 个正电荷残基 (Arg+Lys) 和 7 个负电荷残基 (Asp+Glu)。CXCL10 在哺乳动物细胞中的半衰期为 30 h, 在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 和大肠杆菌中的半衰期分别大于 20 和 10 h。不稳定系数为 43.36, 属于不稳定蛋白。CXCL10 的脂肪族氨基酸指数为 98.50, 亲水性平均系数为 -0.083, 为亲水性蛋白。利用相关软件进行分析发现, CXCL10 无跨膜结构、

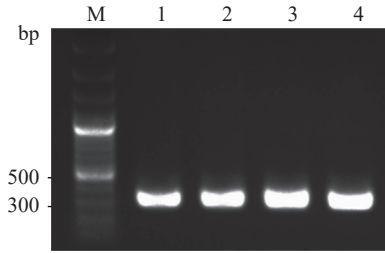
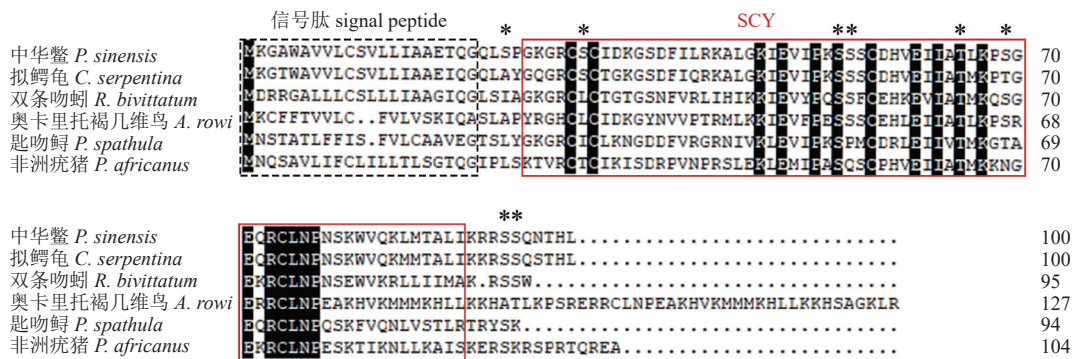


图1 中华鳖 cxcl10 的 PCR 扩增产物电泳图

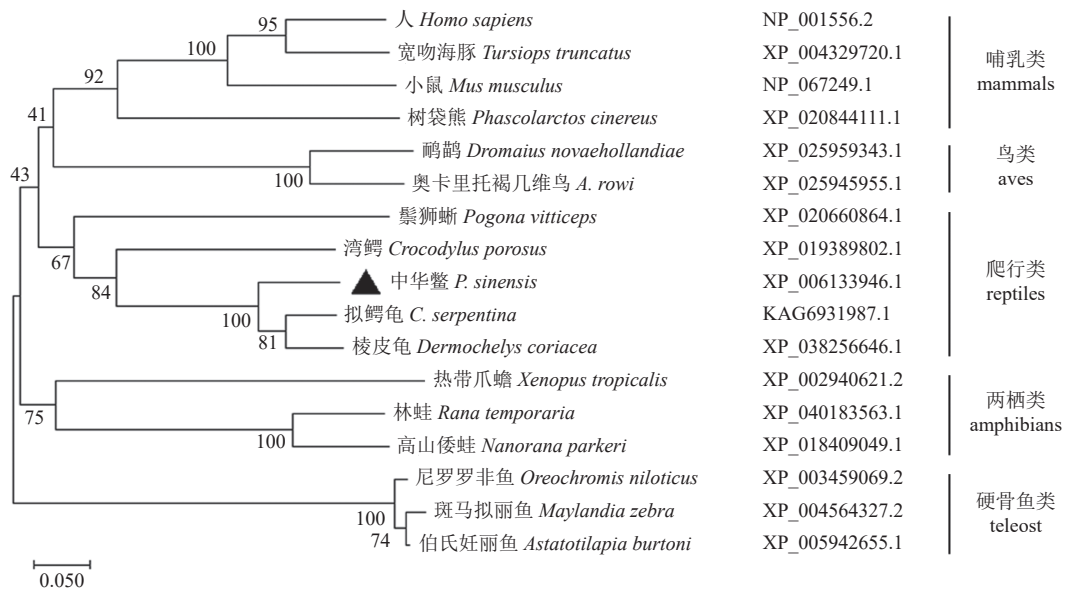
M. marker, 1~2. 以肝脏 cDNA 为模板; 3~4. 以心脏 cDNA 为模板.

Fig. 1 Electrophoresis diagram of the PCR-amplified cxcl10 from *P. sinensis*

M. marker, 1-2. using liver cDNA as the template; 3-4. using heart cDNA as the template.



(a)



(b)

图2 CXCL10 氨基酸序列比对与进化树分析

(a) CXCL10 蛋白的多序列比对, 虚线方框表示信号肽, 红色方框表示趋化因子 C-X-C (SCY) 结构域, * 预测的磷酸化位点; 利用 MEGA 7 软件, 通过 1000 个 bootstrap 构建 Neighbor-joining 树。(b) 中华鳖趋化因子 CXCL10 氨基酸系统发育树。

Fig. 2 Amino acid alignment and phylogenetic tree analysis of CXCL10

(a) multiple sequence alignment of CXCL10 protein, where the signal peptide is shown with a dashed box, and the chemokine C-X-C (SCY) domain is shown with a red box, * the predicted phosphorylation site; using MEGA 7 software to construct Neighbor-joining tree through 1,000 bootstraps. (b) *P. sinensis* chemokine CXCL10 amino acid phylogeny tree.

表 3 中华鳖与其他物种的趋化因子 CXCL10 序列相似性对比

Tab. 3 Similarity comparison of CXCL10 in *P. sinensis* and other species

物种名称 species name	查询号 accession no.	最大一致性/% max identity	覆盖率/% query coverage
中华鳖 <i>P. sinensis</i>	XP_006133968.2	100.00	100
拟鳄龟 <i>C. serpentina</i>	KAG6931987.1	87.00	100
双条吻蚓 <i>R. bivittatum</i>	XP_029440950.1	55.00	80
奥卡里托褐几维鸟 <i>A. rowi</i>	XP_025945945.1	51.58	95
匙吻鲟 <i>P. spathula</i>	XP_041128824.1	46.81	94
非洲疣猪 <i>P. africanus</i>	QDV59532.1	42.27	97

现, 中华鳖趋化因子 CXCL10 蛋白与爬行类的同源性较高, 其次是鸟类、哺乳类, 与硬骨鱼类的相似性最低。

SWISS-MODEL 同源建模结果显示, CXCL10 与趋化因子 CXC 亚类有较高相似度, 其中与鼠类趋化因子 Small-inducible cytokine B10 相似度最高, 达 48.48%。CXCL10 的结构预测模型显示, 中华鳖 CXCL10 蛋白包含 4 条单链, 每条单链包含 1 个 N 端的 loop 区、1 个 α 螺旋和 3 个反向平行 β 折叠 (图 3)。

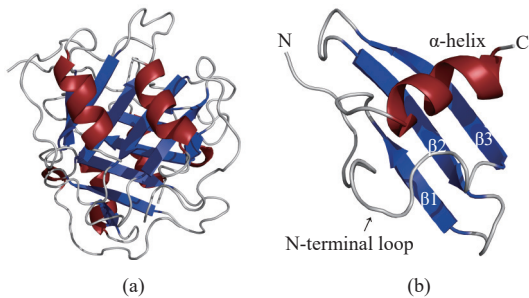


图 3 中华鳖 CXCL10 蛋白三级结构预测

(a) CXCL10 蛋白 (4 条单链) 的结构模型; (b) CXCL10 蛋白 (其中 1 条单链) 的结构模型。

Fig. 3 Prediction of tertiary structure of CXCL10 protein in *P. sinensis*

(a) structural model of CXCL10 protein (four single chains); (b) structural model of CXCL10 protein (one single chain).

2.2 中华鳖趋化因子 *cxc10* 的组织表达特征

cxc10 转录本在中华鳖各组织中均有不同程度的表达。其中, *cxc10* 在肝脏、心脏和脾脏中的表达量较高, 在肌肉、肺、肾脏、皮肤、小肠和大肠中的表达量依次降低, 在血细胞中的表达量最低。以血细胞中的表达量为参照, 肝脏的表达量是其 49.01 倍, 心脏约是其 47.08 倍 (图 4)。

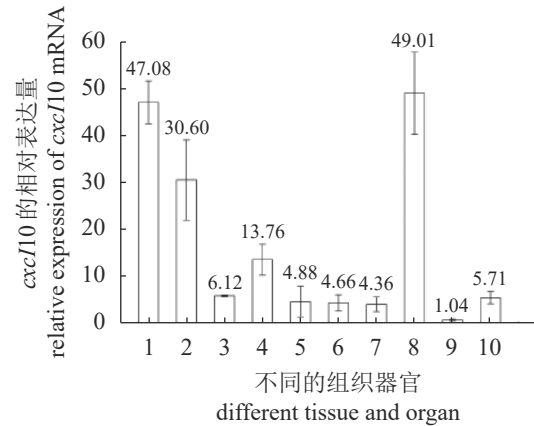


图 4 中华鳖 *cxc10* 的组织差异表达分析

1. 心脏, 2. 脾脏, 3. 肺, 4. 肌肉, 5. 皮肤, 6. 小肠, 7. 大肠, 8. 肝脏, 9. 血细胞, 10. 肾脏。

Fig. 4 Analysis of tissue differential expression of *cxc10* in *P. sinensis*

1. liver, 2. spleen, 3. lung, 4. muscle, 5. skin, 6. small intestine, 7. intestine crassum, 8. heart, 9. blood cells, 10. kidney.

2.3 细菌胁迫下的中华鳖 *cxc10* 基因的时序性表达特征

以革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性菌嗜水气单胞菌作为模式菌, 利用 qPCR 技术分析细菌感染前后, *tnf-a*、*il-1 β* 和 *cxc10* 在中华鳖组织中的表达情况。结果显示, 以 0 h 为对照, 经嗜水气单胞菌刺激后, 肝脏中 *tnf-a* mRNA 表达量于 3 和 12 h 出现显著升高 ($P < 0.05$), 24 h 的 mRNA 表达量极显著高于 0 h ($P < 0.01$)。金黄色葡萄球菌刺激后, 肝脏中的 *tnf-a* mRNA 表达量呈现先上升后下降趋势, 但 6、12 和 72 h 的 mRNA 表达量均显著高于 0 h ($P < 0.01$) (图 5-a)。

嗜水气单胞菌刺激后, 肝脏中 *il-1 β* 表达量上升, 3、12、24 和 48 h 时的 mRNA 表达量显著 ($P < 0.05$) 或极显著高于 0 h ($P < 0.01$)。金黄色葡萄球菌

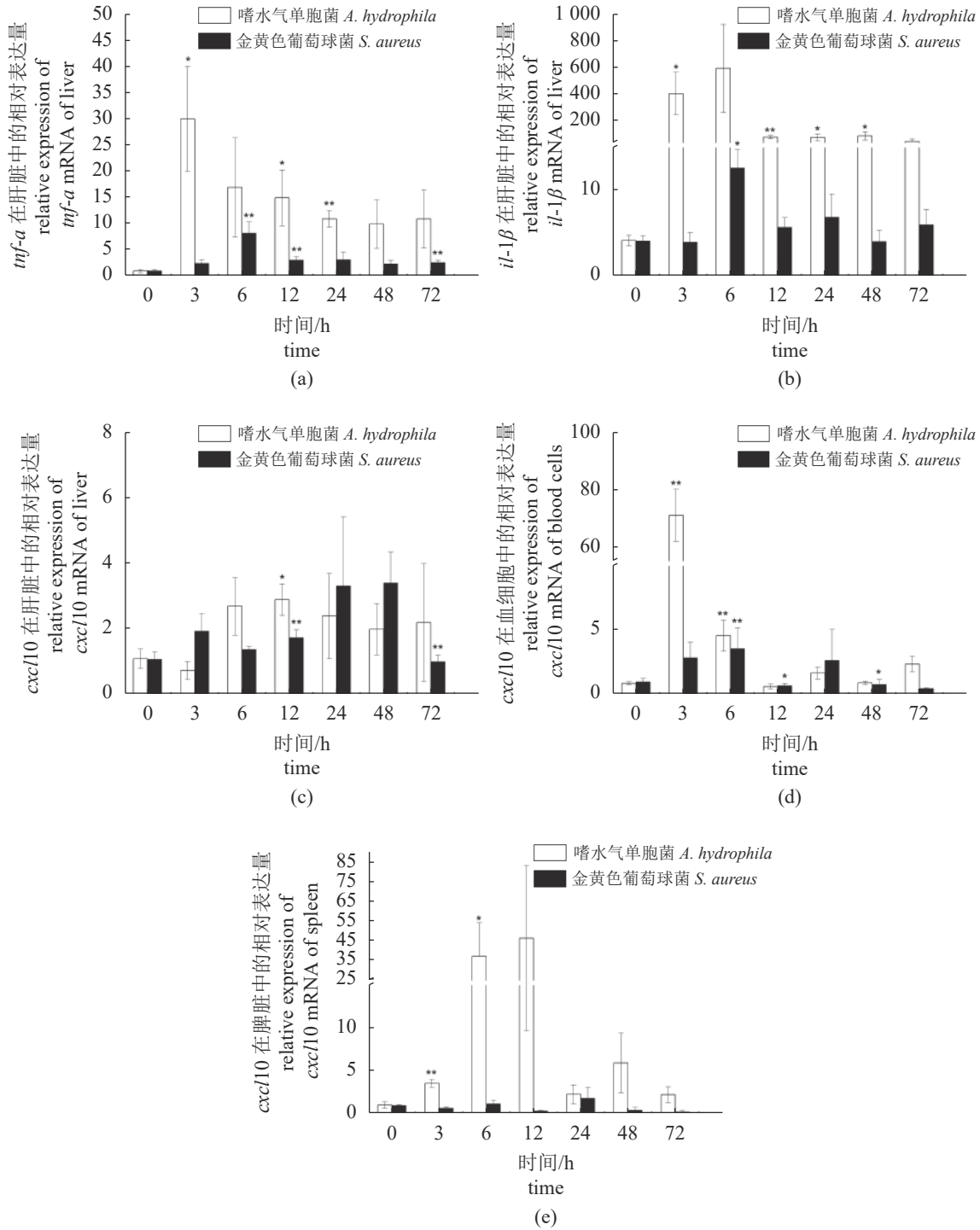


图5 细菌胁迫下的中华鳖 *cxc/10* 基因的时序性表达

(a) *tnf-a*在肝脏中的表达, (b) *il-1β* 在肝脏中的表达, (c) *cxc/10* 在肝脏中的表达, (d) *cxc/10* 在血细胞中的表达, (e) *cxc/10* 在脾脏中的表达。
*为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$ 。

Fig. 5 Temporal expression of the *cxc/10* gene following pathogenic infection

(a) expression of *tnf-a* mRNA in liver, (b) expression of *il-1β* mRNA in liver, (c) expression of *cxc/10* mRNA in liver, (d) expression of *cxc/10* mRNA in blood cells, (e) expression of *cxc/10* mRNA in spleen. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

刺激后, 肝脏中的 *il-1β* mRNA 表达量呈现波动状态, 于 6 h 时到达峰值 ($P < 0.05$) (图 5-b)。

嗜水气单胞菌刺激后, 肝脏中 *cxc/10* mRNA

表达量逐渐上升, 并于 12 h 到达峰值 ($P < 0.05$)。金黄色葡萄球菌刺激后, 肝脏中的 *cxc/10* mRNA 表达量逐渐上升, 12 和 72 h 的 mRNA 表达量显

著高于 0 h ($P < 0.01$) (图 5-c)。

在血细胞中, 嗜水气单胞菌刺激后, *cxc110* mRNA 表达量于 3 h 达到峰值 ($P < 0.01$), 6 h 时下调, 但表达量仍显著高于 0 h ($P < 0.01$)。随后 *cxc110* 的相对表达量呈现波动状态, 但无显著差异。金黄色葡萄球菌刺激下, 血细胞中的 *cxc110* mRNA 表达量上升, 于 6 h 达到峰值 ($P < 0.01$), 随后表达量下调 ($P < 0.05$) (图 5-d)。

在脾脏中, 嗜水气单胞菌刺激后, 脾脏中的 *cxc110* mRNA 相对表达量从 3 h 开始升高, 至 12 h 达到峰值, 其中 3 h ($P < 0.01$) 与 6 h ($P < 0.05$) 的表达量显著高于 0 h。在金黄色葡萄球菌的刺激下, 脾脏中的 *cxc110* mRNA 表达量呈现波动状态, 但无显著差异 (图 5-e)。

3 讨论

CXCL10 是一种参与免疫应答和炎症反应的小型分泌蛋白, 其分子功能与蛋白结构息息相关。经分析, CXCL10 属于带正电荷的亲水性不稳定蛋白, 阳离子电荷能够增强趋化因子与细胞膜表面相互作用, 是提高抗菌活性的重要参数之一^[19]。此外该蛋白有 8 个磷酸化位点, 这些磷酸化修饰用于改变蛋白的构象和增加蛋白的稳定性, 从而调节蛋白的许多生物学功能^[20]。研究显示, 趋化因子的三级结构对其抑菌活性有重要影响, C-末端 α 螺旋区是趋化因子介导的抗菌活性中的重要组成部分^[21-22], 部分趋化因子 N 端短肽、 β 折叠的分子中心部分也具有一定抑菌活性^[23-25]。同源建模结果显示, 中华鳖 CXCL10 蛋白的三级结构具有 1 个 N 端 loop、1 个 α 螺旋和 3 个反平行的 β 折叠结构域 (图 3), 与其他趋化因子的结构相似^[26], 暗示其具有体外抑菌功能。CXCL10 分布物种范围非常广泛, 在哺乳类、两栖类、鸟类、鱼类等脊椎动物中均有发现^[5, 27-29]。有研究表明, 中华鳖与早二叠纪至三叠纪分离的鸟类-鳄鱼谱系关系密切^[30], 通过同源性比对和系统发育树的构建, 发现中华鳖趋化因子 CXCL10 蛋白与爬行类、鸟类的同源性较高, 与本研究结果一致。

qPCR 结果显示, *cxc110* 在中华鳖各个组织中均有表达 (图 4), 提示 CXCL10 趋化因子在免疫监测中可能具有稳态功能。*cxc110* 基因在中华鳖的肝脏、心脏和脾脏组织中呈现较高表达, 在血细胞中呈现低表达, 而在棘胸蛙的血液中呈现高

表达^[5], 这可能是由于各物种趋化因子的分泌细胞不同或 CXCL10 潜在功能的特异性导致的表达差异。另一方面, TNF- α 和 IL-1 β 作为重要的炎症细胞因子, 通常被认为是评估脊椎动物在有免疫刺激时的炎症反应的标志物, 即这两种细胞因子的转录水平可能表明免疫刺激剂是否诱导了炎症反应^[31]。本实验中, 嗜水气单胞菌和金黄色葡萄球菌刺激后, 中华鳖肝脏中 *tnf-a* 和 *il-1 β* 的 mRNA 表达量均呈现不同程度的显著上调, 表明两种细菌刺激后中华鳖机体产生了炎症反应。

研究显示, CXCL10 在促进宿主防御细菌感染方面发挥重要的作用。例如, Crawford 等^[32] 为研究趋化因子 CXCL10 介导抗菌活性的潜在生物学相关性, 构建了吸入性炭疽的小鼠模型, 研究结果显示, 趋化因子 CXCL10 诱导水平的增加与可检测到的炭疽芽孢杆菌的孢子萌发显著减少有关, 进一步表明趋化因子 CXCL10 介导的抗菌活性在体内促进炭疽杆菌感染初期宿主防御中的作用。本实验通过 qPCR 检测两种细菌感染对 *cxc110* 表达情况的影响。经金黄色葡萄球菌感染后, 实验组中华鳖血液和肝脏中 *cxc110* 基因表达量具有明显的上调趋势; 而经嗜水气单胞菌感染后, 实验组中华鳖血液、肝脏和脾脏中的 *cxc110* 基因表达量显示出比金黄色葡萄球菌感染后更显著的上调趋势。Gasper 等^[17] 在细菌感染后的人和小鼠的成骨细胞中发现趋化因子基因 *cxc110* 上调, 且革兰氏阴性菌沙门氏菌 (*Salmonella*) 和革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌诱导 *cxc110* 表达的能力存在着显著差异。水产动物中也存在着这一现象, 革兰氏阴性菌嗜水气单胞菌诱导棘胸蛙血液中的 CXCL10 表达能力强于革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌^[5]。此外 CXCL10 趋化因子的受体 CXCR3 在迟缓爱德华氏菌 (*E. tarda*) 和无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 感染后的膨腹海马 (*Hippocampus abdominalis*) 血液中也发现类似的诱导能力^[33]。以上结果均与本实验结果相吻合。本实验结果显示, 细菌感染对中华鳖 *cxc110* 基因表达具有强烈的诱导作用, 该基因对不同细菌的响应机制可能有所差异。

综上所述, 本研究发现中华鳖趋化因子 CXCL10 的蛋白分子结构与阳离子抗菌肽结构相似, 在中华鳖各组织中广谱性表达, 其中在肝脏、脾脏和血细胞等免疫相关器官组织中, 该基因的表达量会响应革兰氏阴性菌和阳性菌的刺激而上

调, 提示 CXCL10 可能参与中华鳖抗菌免疫过程。以上结果为进一步研究 CXCL10 在中华鳖体内外抗菌功能奠定基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Miller M C, Mayo K H. Chemokines from a structural perspective[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(10): 2088.
- [2] Henrot P, Prevel R, Berger P, *et al.* Chemokines in COPD: from implication to therapeutic use[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11): 2785.
- [3] Wang Q, Huang F Q, Duan X Z, *et al.* The ER β -CXCL19/CXCR4-NF κ B pathway is critical in mediating the E2-induced inflammation response in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 212: 105926.
- [4] Hughes C E, Nibbs R J B. A guide to chemokines and their receptors[J]. *The FEBS Journal*, 2018, 285(16): 2944-2971.
- [5] Liu Z P, Gu W B, Wang S Y, *et al.* Functional differences of three CXCL10 homologues in the giant spiny frog *Quasipaa spinosa*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 109: 103719.
- [6] Wang Z C, Ao X, Shen Z L, *et al.* TNF- α augments CXCL10/CXCR3 axis activity to induce epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cell[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2021, 17(11): 2683-2702.
- [7] Yu Q, Tian D L, Tian Y, *et al.* Elevation of the chemokine pair CXCL10/CXCR3 initiates sequential glial activation and crosstalk during the development of bimodal inflammatory pain after spinal cord ischemia reperfusion[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 49(6): 2214-2228.
- [8] Nagarsheth N, Wicha M S, Zou W P. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2017, 17(9): 559-572.
- [9] Cao S, Liu M F, Sehrawat T S, *et al.* Regulation and functional roles of chemokines in liver diseases[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(9): 630-647.
- [10] Darakhshan S, Fatehi A, Hassanshahi G, *et al.* Serum concentration of angiogenic (CXCL1, CXCL12) and angiostasis (CXCL9, CXCL10) CXC chemokines are differentially altered in normal and gestational diabetes mellitus associated pregnancies[J]. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 2019, 18(2): 371-378.
- [11] Miyagawa F, Asada H. Chemokines in severe cutaneous adverse reactions (SCARs)[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(6): 847.
- [12] Peng G Y, Peng X F, Tong T T, *et al.* Correlation analysis of expression of CC and CXC chemokines in children with autism spectrum disorder[J]. *Medicine*, 2021, 100(24): e26391.
- [13] Crawford M A, Fisher D J, Leung L M, *et al.* CXC chemokines exhibit bactericidal activity against multidrug-resistant gram-negative pathogens[J]. *mBio*, 2017, 8(6): e01549-17.
- [14] Crawford M A, Margulieux K R, Singh A, *et al.* Mechanistic insights and therapeutic opportunities of antimicrobial chemokines[J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2019, 88: 119-128.
- [15] Margulieux K R, Liebov B K, Tirumala V S K K S, *et al.* *Bacillus anthracis* peptidoglycan integrity is disrupted by the chemokine CXCL10 through the FtsE/X Complex[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 740.
- [16] Schutte K M, Fisher D J, Burdick M D, *et al.* *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex is an important component of CXCL10-mediated antimicrobial activity[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 84(1): 320-328.
- [17] Gasper N A, Petty C C, Schrum L W, *et al.* Bacterium-induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated in part through toll-like receptor 4[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(8): 4075-4082.
- [18] Baoprasertkul P, Peatman E, Chen L Q, *et al.* Sequence analysis and expression of a CXC chemokine in resistant and susceptible catfish after infection of *Edwardsiella ictaluri*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2004, 28(7-8): 769-780.
- [19] Nguyen L T, Vogel H J. Structural perspectives on antimicrobial chemokines[J]. *Frontiers in Immunology*, 2012, 3: 384.
- [20] 杭柏林, 张炜, 李杰, 等. 牛源抗菌肽乳铁素的生物信

- 息学分析[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2018, 46(4): 40-44,49.
- Hang B L, Zhang W, Li J, *et al.* Bioinformatics analysis of antimicrobial peptide lactoferrin of bovine[J]. Journal of Henan Institute of Science and Technology (Natural Science Edition), 2018, 46(4): 40-44,49 (in Chinese).
- [21] Cossio-Ayala M, Domínguez-López M, Méndez-Enríquez E, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of a synthetic peptide derived from the C-terminal region of human chemokine CCL13 against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Peptides*, 2017, 94: 49-55.
- [22] Sathyamoorthi A, Bhatt P, Ravichandran G, *et al.* Gene expression and in silico analysis of snakehead murrel interleukin 8 and antimicrobial activity of C-terminal derived peptide WS12[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2017, 190: 1-9.
- [23] Xiao X, Zhang Y Q, Liao Z W, *et al.* Characterization and antimicrobial activity of the teleost chemokine CXCL20b[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(2): 78.
- [24] Margulieux K R, Fox J W, Nakamoto R K, *et al.* CXCL10 acts as a bifunctional antimicrobial molecule against bacillus anthracis[J]. *mBio*, 2016, 7(3): e00334-16.
- [25] Dai C, Basilico P, Cremona T P, *et al.* CXCL14 displays antimicrobial activity against respiratory tract bacteria and contributes to clearance of *Streptococcus pneumoniae* pulmonary infection[J]. *The Journal of Immunology*, 2015, 194(12): 5980-5989.
- [26] Kufareva I, Salanga C L, Handel T M. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies[J]. *Immunology & Cell Biology*, 2015, 93(4): 372-383.
- [27] Chen M, Yan F F, Wei X Y, *et al.* Expression and functional characterization of chemokine CXCL10 from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection and C1q-mediated regulation of monocytes/macrophages activity[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 21: 100778.
- [28] 丁祝进, 崔虎军, 谷昭天. 鱼类趋化因子家族的研究进展[J]. 中国水产科学, 2021, 28(9): 1227-1237.
- Ding Z J, Cui H J, Gu Z T. Review on chemokines research in teleost fish[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(9): 1227-1237 (in Chinese).
- [29] Wang Y J, Han X, Zhang L Y, *et al.* Early pregnancy induces expression of STAT1, OAS1 and CXCL10 in ovine spleen[J]. *Animals*, 2019, 9(11): 882.
- [30] Wang Z, Pascual-Anaya J, Zadissa A, *et al.* The draft genomes of soft-shell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtle-specific body plan[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(6): 701-706.
- [31] Zhang Z B, Chen B J, Yuan L, *et al.* Acute cold stress improved the transcription of pro-inflammatory cytokines of Chinese soft-shelled turtle against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 49(1): 127-137.
- [32] Crawford M A, Zhu Y H, Green C S, *et al.* Antimicrobial effects of interferon-inducible CXC chemokines against *Bacillus anthracis* spores and bacilli[J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(4): 1664-1678.
- [33] Priyathilaka T T, Oh M, Bathige S D N K, *et al.* Two distinct CXC chemokine receptors (CXCR3 and CXCR4) from the big-belly seahorse *Hippocampus abdominalis*: molecular perspectives and immune defensive role upon pathogenic stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 65: 59-70.

Molecular characterization of CXCL10 in Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) and its response to bacterial infection

ZHANG Airu¹, HUANG Qiuya¹, WU Bin¹, QIAN Guoying¹, ZHANG Haiqi^{2*}, XU Jiehao^{1*}

(1. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract: Chemokines are small molecular secreted proteins with chemoattractive properties. They have bactericidal activity and the ability to recruit leukocytes and activate immune cells. CXCL10 is a kind of CXC chemokine with specificity for CXCR3 receptors, which has been shown to mediate the generation of Th1-type immune responses and have antibactericidal effects similar to defensins. Therefore, CXCL10 might be used as an alternative to antibiotics for bacterial diseases in aquaculture industry. In this study, *Pelodiscus sinensis* was used to study the expression characteristics of *cxcl10* and its response to gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and gram-negative bacteria (*Aeromonas hydrophila*). The molecular characteristics and systematic evolution of CXCL10 protein in *P. sinensis* were analyzed by bioinformatics software. The expression and distribution of *cxcl10* mRNA in healthy *P. sinensis* tissues and that after *S.aureus* or *A. hydrophila* challenge were detected by quantitative PCR (qPCR). The results showed that the open reading frame of CXCL10 was 303 bp, encoding a protein of 100 amino acids. The molecular weight was 10.89 ku and the estimated isoelectric point was 9.62. *P. sinensis* *cxcl10* had 8 phosphorylation modification sites and a signal peptide. Each single strand of *P. sinensis* CXCL10 contains one N-terminal loop region, one α helix and three reverse parallel β -folds. Phylogenetic analysis showed a close relationship between *P. sinensis* CXCL10 with avian and reptile CXCL10s. *P. sinensis* *cxcl10* basal levels were higher in the liver and heart than that in other organs of health turtles. The stimulation of *A. hydrophila* and *S. aureus* led to significant upregulation of *P. sinensis* *cxcl10* and inflammation-related factors *tnf-a* and *il-1 β* in liver, spleen and blood cells. These results suggested that *P. sinensis* CXCL10 had a similar protein molecular structure with the cationic antimicrobial peptide. *P. sinensis* *cxcl10* was widely expressed in various tissues of *P. sinensis*, and up-regulated in response to the stimulation of gram-negative bacteria and positive bacteria in immuno-related tissues. In summary, our study found that *P. sinensis* *cxcl10* might be involved in the pro-inflammatory function of antibacterial immune process. These findings are expected to lay a foundation for further research on the antibacterial function of *P. sinensis* CXCL10 *in vitro* and *in vivo*, and also provide a theoretical basis for disease control in *P. sinensis* breeding industry.

Key words: *Pelodiscus sinensis*; CXCL10; mRNA expression; bioinformatics

Corresponding authors: ZHANG Haiqi. E-mail: zmk407@126.com;

XU Jiehao. E-mail: xujiehao@zwu.edu.cn

Funding projects: Open Project Program of Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries(ZJK202011); Zhejiang Provincial Top Discipline of Biological Engineering (Level A) (CX2020030); Zhejiang University Student Science and Technology Innovation Activity Plan (Xinmiao Talents Program) (2020R419012); Zhejiang Provincial Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202010876083)