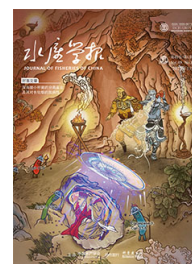


DOI: 10.11964/jfc.20240114353

大黄鱼 AUF1 基因克隆及其促 TNF- α mRNA 降解活性分析



何志巧, 汪慧娟, 郭盛泉, 张晓林, 严小军, 申望*

浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316022

第一作者: 何志巧, 从事水产动物免疫学研究, E-mail: hezhiqiao@zjou.edu.cn

摘要:

【目的】研究鱼类 RNA 结合蛋白 AUF1 对炎症因子 mRNA 表达的调节作用。

【方法】采用 cDNA 末端快速扩增技术克隆大黄鱼 AUF1 mRNA 的全长 cDNA 序列, 命名为 *LcAUF1*, 并采用实时荧光定量 PCR 技术 (RT-qPCR) 检测 *Lcauf1* 基因的组织表达特异性、大黄鱼主要免疫器官脾脏和肾脏 *Lcauf1* 基因表达对副溶血弧菌攻毒的时序响应, 以及通过构建四环素调控表达载体过表达 *LcAUF1*, 研究 *LcAUF1* 对 TNF- α mRNA 表达水平的调节作用。

【结果】*LcAUF1* mRNA 全长 cDNA 由 266 bp 的 5'-非翻译区、954 bp 的开放阅读框和 193 bp 的 3'-非翻译区组成, 开放阅读框编码 317 个氨基酸残基; 蛋白质序列分析显示, 哺乳动物 AUF1 氨基酸序列和功能结构域在 *LcAUF1* 中高度保守; 组织表达检测发现 *Lcauf1* 在大黄鱼机体中广泛表达, 采集的 9 个组织中均检测到 *Lcauf1* 转录本, 其中肌肉组织表达水平最高; 副溶血弧菌攻毒 2 h 和 12 h 肾脏以及攻毒 24 h 脾脏中 *Lcauf1* 表达水平显著下调; RAW264.7 细胞过表达 *Lcauf1* 显著下调 LPS 处理 0.5、3.0 和 6.0 h 时 *Tnf- α* 表达水平; 进一步研究显示过表达 *LcAUF1* 促进 RAW264.7 细胞 *Tnf- α* mRNA 降解。

【结论】AUF1 在脊椎动物进化中结构和功能高度保守, *LcAUF1* 也通过促进 mRNA 降解下调 TNF- α mRNA 表达水平, 提示 *LcAUF1* 可能是大黄鱼炎症因子表达的重要调节蛋白, 参与调节大黄鱼抗感染炎症因子表达平衡。本研究为深入探讨 *LcAUF1* 在大黄鱼抗感染炎症因子表达平衡调控中的作用及其在大黄鱼感染性养殖病害防治中的应用价值提供了参考数据。

关键词: 大黄鱼; RNA 结合蛋白; AU 富集元件 RNA 结合蛋白 1; mRNA 降解; 炎症因子



通信作者: 申望, 从事水产动物病害防治研究, E-mail: shenwang@zjou.edu.cn

资助项目: 浙江海洋大学科研启动经费 (2020); 浙江省重点研发计划 (2020C02004)

收稿日期: 2024-01-30
修回日期: 2024-06-16

文章编号:
1000-0615(2025)01-019406-14
中图分类号: Q 785; S 943
文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

我国是水产养殖大国, 鱼类作为主养品种, 产量占水产养殖总产量的 50% 以上, 并超过世界鱼类养殖总产量的 70%^[1], 而细菌等病原微生物引起的养殖病害也一直威胁产业健康发展^[2]。炎症反应是机体免疫系统抵御病原入侵的第一道防线, 病原诱导表达的 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子通过募集血液免疫细胞进入感染位点、激活获得性免疫反应



等参与清除入侵病原, 修复组织损伤, 恢复机体平衡; 而过量表达的炎症因子也损伤自身细胞, 导致组织器官功能紊乱, 诱发败血症等炎症性疾病^[3-5]。因此, 抗感染炎症因子表达在转录和转录后水平都受到严格调控^[6-7]。RNA 结合蛋白是一类结合靶标 RNA 顺式作用元件, 参与 RNA 加工、转运、定位、降解、翻译等代谢过程调控, 在转录后水平调节基因表达的蛋白质^[8]。哺乳动物研究显示, RNA 结合蛋白介导的转录后调控在 TNF- α 、IL-1、IL-10 等大量炎症因子表达调节中起关键作用, 是炎症性疾病的潜在治疗靶点^[9], 提示 RNA 结合蛋白可能也是鱼类抗感染炎症因子表达平衡调控的关键蛋白。因此, 研究鱼类 RNA 结合蛋白对炎症因子表达的调节作用和机制, 可为鱼类感染性养殖病害防治提供新靶点和新思路。

AU 富集元件 RNA 结合蛋白 1 (AU-rich element RNA-binding factor 1, AUF1), 又称不均一核糖核蛋白 D0 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0, hnRNP D0), 是最早鉴定的 RNA 结合蛋白之一^[10-11]。哺乳动物 AUF1 前体 mRNA (pre-mRNA) 经选择性剪接编码 4 个 AUF1 异构体, 按分子质量差异分别命名为 p37^{AUF1}、p40^{AUF1}、p42^{AUF1} 和 p45^{AUF1}; AUF1 异构体都有 N 端二聚体化结构域、2 个串联的 RNA 识别结构域 (RRM1 和 RRM2) 和靠近 RRM2 的 C 端谷氨酰胺富集结构域 (Q-rich domain)^[12]。AUF1 异构体都以二聚体形式结合靶标 mRNA 的 AU 富集元件 (AU-rich element, ARE), 但与 ARE 元件的亲合力存在差异, p37^{AUF1} 与 ARE 元件的亲合力最高, 其余依次为 p42^{AUF1}、p45^{AUF1}、p40^{AUF1}^[13]。p42^{AUF1} 和 p45^{AUF1} 主要定位在细胞核, p37^{AUF1} 和 p40^{AUF1} 在细胞核和胞质中均有分布^[14]。细胞核 AUF1 通过激活端粒酶转录活性^[15] 或直接与端粒重复序列结合^[16-17], 参与维持端粒结构稳定; 细胞质 AUF1 主要通过影响靶标 mRNA 稳定性, 调节靶基因表达, 参与炎症反应^[18]、癌症^[19]、衰老^[15] 等生理病理过程调控。

已鉴定的 AUF1 靶标 mRNA 中包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-3、IL-6、IL-10 等大量炎症因子的 mRNA, 通过促进炎症因子 mRNA 降解, AUF1 下调炎症因子表达水平, 抑制炎症反应^[20]。例如, 敲除小鼠 (*Mus musculus*) *Auf1* 基因, *Auf1*^{-/-} 小鼠对内毒素更敏感, 脂多糖 (LPS) 诱导的血

清炎症因子基因 *Tnf- α* 和 *Il-1 β* 表达水平上调, 出现严重的内毒素休克症状; *Auf1*^{-/-} 小鼠腹膜巨噬细胞中 *Tnf- α* 和 *Il-1 β* mRNA 稳定性增强, LPS 诱导的 TNF- α 和 IL-1 β 生成量上调^[21]。Sadri 等^[22] 进一步报道 *Auf1*^{-/-} 小鼠随年龄增长易患慢性皮炎, T 细胞和巨噬细胞中炎症因子 IL-2、TNF- α 、IL-1 β 以及趋化因子 CCL2 表达水平上调。但 Gargani 等^[23] 报道条件型敲除小鼠髓系细胞 *Auf1* 基因对 LPS 诱导的炎症因子表达以及 DSS 诱导的肠炎都没有显著影响, 反而因血管重构相关因子表达水平下调而对过敏性呼吸道炎症有抗性, 提示先天免疫细胞中 AUF1 不仅是抗炎蛋白, 也是组织浸润和重构等炎症相关基因表达的调节蛋白。虽然炎症因子过量表达是出血性败血症等鱼类感染性养殖病害的关键发病机制^[24], 但鱼类 AUF1 的功能, 特别是 AUF1 对炎症因子表达的调节作用还未见报道。

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国养殖产量最大的海水鱼^[25]。随着养殖规模的扩大, 感染性养殖病害问题也日益突出, 严重威胁大黄鱼养殖产业的可持续发展^[26]。本研究采用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术从大黄鱼脾脏组织中克隆鉴定了一个哺乳动物 AUF1 同源物 mRNA 的全长 cDNA (命名为 *Lcauf1*), 并对其结构特征和系统发生进行分析; 同时采用实时荧光定量技术 (RT-qPCR) 检测 *Lcauf1* 基因的组织表达特异性以及副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 攻毒主要免疫器官脾脏和肾脏 *Lcauf1* 基因表达的时序响应; 并进一步在 RAW264.7 细胞中过表达 *LcAUF1*, 探究 *LcAUF1* 对 LPS 诱导的 *Tnf- α* mRNA 表达的调节作用及其作用机制。本研究为深入探讨 *LcAUF1* 在大黄鱼抗感染炎症因子表达平衡调控中的作用及其在大黄鱼感染性养殖病害防治中的应用价值提供了参考数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和组织样本采集

健康养殖大黄鱼 [平均体重 (186.7 \pm 21.4) g] 购自浙江省舟山市半岛水产养殖有限公司。使用过滤海水暂养于循环海水养殖系统, 水温 24~25 °C, 养殖 1 周适应环境后取健康、无明显伤

痕的大黄鱼个体进行实验。本研究获得了浙江海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准(审批号: 2024162), 实验过程中操作人员严格遵守浙江海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会伦理规范, 并按照浙江海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会制定的规章制度执行。

采集 5 尾健康大黄鱼的 9 个组织用于 *Lcauf1* 基因的组织表达特异性分析, 具体流程: 0.02% MS-222 (国药集团, 中国) 浸泡麻醉大黄鱼, 采集肝脏、肠道、胃、肌肉、心脏、脾脏、肾脏、鳃和脑等 9 个组织样本置于 1.5 mL 离心管, 立即加入 1 mL RNALater™ 动物组织 RNA 稳定保存液 (碧云天, 中国), -80 °C 冻存备用。

为调查大黄鱼脾脏和肾脏 *Lcauf1* 基因表达对副溶血弧菌攻毒的时序响应, 50 尾大黄鱼分成对照组和攻毒组 2 组 (25 尾/组)。对照组和攻毒组大黄鱼个体分别腹腔注射 500 μ L 生理盐水和活菌悬液 (菌液浓度 1×10^8 CFU/mL), 在攻毒后的 2、4、8、12 和 24 h 每组分别取 5 尾鱼,

0.02% MS-222 (国药集团, 中国) 浸泡麻醉后采集脾脏和肾脏组织, 加 1 mL RNALater™ 动物组织 RNA 稳定保存液 (碧云天, 中国) 浸没, -80 °C 保存备用。

1.2 全长 cDNA 克隆

使用 BLASTP 在 NCBI 非冗余蛋白质数据库 (non-redundant protein sequence database) 中检索人 (*Homo sapiens*) p45^{AUF1} (蛋白登录号: NP_112738.1) 的大黄鱼 (NCBI 物种分类号: 215358) 同源序列, 检索到的同源物为基于大黄鱼基因组数据预测的蛋白序列, 以氨基酸序列一致性最高的大黄鱼 AUF1 同源蛋白 (蛋白登录号: XP_019134259.1; 氨基酸一致性 79.80%) 的 mRNA (基因登录号: XM_019278714.2) 为参考, 使用 NCBI 在线引物设计工具 Primer-Blast 设计 *LcAUF1* mRNA 全长 cDNA 克隆 5'-RACE、3'-RACE 和开放阅读框 (open reading frame, ORF) PCR 扩增引物 (表 1)。

表 1 用于 *Lcauf1* 基因克隆和表达分析的引物

Tab. 1 Primers used for *Lcauf1* gene cloning and expression analysis

引物名称 primers name	引物序列 sequences	引物用途 application of primers
<i>LcAUF1F1</i>	ACTCAACGGAAAGGTCATCG	3'-RACE, RT-qPCR
<i>LcAUF1F2</i>	ACCAGGGTTACGGCAACTAC	3'-RACE
<i>LcAUF1R1</i>	CGCCGGACTGATCGTTGTAA	5'-RACE
<i>LcAUF1R2</i>	GTCCTCCTCTTGAACGTG	5'-RACE, RT-qPCR
<i>LcAUF1ORFF</i>	ATGGCGGACGACTACGAG	ORF克隆
<i>LcAUF1ORFR</i>	ATACGGCTTGTAAGTGTG	ORF克隆
<i>LEAUF1F</i>	ATCGATCGCCGGATATCACGCGTGCCACCATGGCGGACGACTACGAG	过表达
<i>LEAUF1R</i>	AGCAGGCTGAAGTTGGTGGCGAATTCATACGGCTTGTAAGTGTG	过表达
<i>LcactinF</i>	CCTTACCACCACAGCCGAG	RT-qPCR
<i>LcactinR</i>	ATTCCGCAAGATTCCATACCGA	RT-qPCR
<i>MmTNF-αF</i>	CAAAATTCGAGTGACAAGCCTG	RT-qPCR
<i>MmTNF-αR</i>	GAGATCCATGCCGTTGGC	RT-qPCR
<i>MmactinF</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	RT-qPCR
<i>MmactinR</i>	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	RT-qPCR

取 50~100 mg 脾脏组织, 使用 TaKaRa RNAiso Plus TRIzol 试剂 (TaKaRa, 日本) 提取总 RNA, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop ONE 微量紫外-可见光分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 检测总 RNA 质量。5'-RACE 和 3'-RACE 使用 TaKaRa SMARTer® RACE 5'/3' Kit

试剂盒 (TaKaRa, 日本), 操作按说明书进行。3'-RACE 引物组合: 第一轮 PCR 引物 *LcAUF1F1*/3'-RACE UPM long primer, 第二轮巢式 PCR 引物 *LcAUF1F2*/3'-RACE Universal Primer Short; 5'-RACE 引物组合: 第一轮 PCR 引物 *LcAUF1R2*/5'-RACE UPM long primer, 第二轮巢式 PCR 引

物 *LcAUF1R1/5'*-RACE Universal Primer Short。PCR 扩增 *LcAUF1* mRNA 的 ORF 区使用 TaKaRa Ex Taq[®] DNA Polymerase (TaKaRa, 日本), 模板为 5'/3'-RACE 合成的 cDNA 第一链, 引物为 *LcAUF1ORFF* / *LcAUF1ORFR* (表 1), 反应程序: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 次循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物胶回收纯化目的片段, 连接入 simple pMD-19T vector (TaKaRa, 日本) 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞 (TaKaRa, 日本), 挑阳性单克隆扩大培养后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 拼接 5'-RACE、3'-RACE 和 ORF 区序列获得 *LcAUF1* mRNA 全长 cDNA 序列。

1.3 生物信息学分析

理论分子质量和等电点预测使用 ExPASy 在线工具 Compute pI/MW (<https://www.expasy.org/resources/compute-pi-mw>)^[27]; 信号肽预测使用在线工具 SignalP6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)^[28]; 核定位信号 (NLS) 预测使用在线工具 NLStradamus 1.8 (<http://www.mose-slab.cs.utoronto.ca/NLStradamus/>)^[29]; 核输出信号 (NES) 预测使用 NetNES 1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNES-1.1/>)^[30]; NCBI 非冗余蛋白质数据库中检索同源序列使用 NCBI BLASTP^[31]; 保守结构域搜索使用 NCBI 在线工具包 CD-Search^[32]; 多序列比对使用 ClustalW1.83 软件包^[33]; 系统发育树构建使用 MEGA version 7 软件包^[34]。

1.4 RT-qPCR

取 1 μ g 总 RNA 按 TaKaRa PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 操作说明合成 cDNA 第一链。RT-qPCR 反应体系 (20 μ L): SYBR Green qPCR Mix (碧云天, 中国) 10 μ L、超纯水 6 μ L、上下游引物各 1 μ L、cDNA 2 μ L, 引物序列见表 1; 反应程序: 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 扩增程序结束后运行熔解曲线分析程序: 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 95 °C 15 s, 评估 RT-qPCR 扩增产物的特异性。反应在 ABI QuantStudio 1 实时检测系统 (Applied Biosystems, 美国) 上运行。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基

因的相对表达量, 内参基因为 β -actin; 在 mRNA 稳定性分析中, 以放线菌素 D 处理 0 min 时 TNF- α mRNA 表达量为参照, 采用 $2^{-\Delta C_t}$ 法分析不同处理时间点 TNF- α mRNA 的相对表达量^[35]。

1.5 构建重组表达载体 pTRE3G-MCS-EGFP-3 \times FLAG-Tetone-Puro-LcAUF1

限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Eco*R I 双酶切四环素调控载体 pTRE3G-MCS-EGFP-3 \times FLAG-Tetone-Puro (简称 pTRE3G; 武汉森灵生物科技有限公司, 中国), 1.2% 琼脂糖电泳分离酶切片段、胶回收纯化目的片段备用。以“全长 cDNA 克隆”部分测序验证正确的含 *LcAUF1* ORF 区质粒为模板, 使用 *pfu* 聚合酶 (碧云天, 中国) PCR 扩增 *LcAUF1* mRNA 的 ORF 区, 引物为无缝克隆连接引物 LEAUF1F 和 LEAUF1R (表 1), 反应程序: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 120 s, 35 次循环; 72 °C 5 min; PCR 扩增产物胶回收纯化。使用无缝克隆试剂盒 (碧云天, 中国) 将 *LcAUF1* ORF 区 PCR 产物与 pTRE3G 载体酶切片段连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 (TaKaRa, 日本), 挑选阳性单克隆扩大培养, 并送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 测序验证的单克隆菌液扩大培养, Endo-free Plasmid Mini Kit II (Omega, 美国) 提取无内毒素重组质粒 pTRE3G-LcAUF1 备用, 该载体表达 *LcAUF1*-EGFP 融合蛋白。

1.6 细胞转染和稳转细胞系筛选

小鼠 RAW264.7 细胞 (碧云天, 中国) 使用含 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS, 浙江天杭生物科技股份有限公司, 中国)、100 U/mL 青霉素/链霉素 (索莱宝, 中国) 的 DMEM 完全培养基 (Hyclone, 美国) 在 37 °C、5% CO₂ 的二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 中培养。

pTRE3G 和 pTRE3G-LcAUF1 无内毒素质粒转染 RAW264.7 细胞使用 GP-transfect-Mate 转染试剂 (吉玛基因, 中国)。细胞按 2×10^5 细胞/孔接种 6 孔板培养 24 h, 3 μ g 质粒 DNA 与 6 μ L GP-transfect-Mate 试剂混合后加入到 400 μ L 无 FBS 的 DMEM 培养基中, 静置 20 min 后转

染 RAW264.7 细胞, 转染 24 h 后胰蛋白酶消化, 接种于 10 cm 培养皿, 含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素 (碧云天, 中国) 的 DMEM 完全培养基培养 48 h 后换含 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的 DMEM 完全培养基培养至克隆形成, 分离单克隆细胞接种于 24 孔板培养至汇集度 80%~90%, 胰蛋白酶消化后取部分细胞接种于 96 孔板培养至细胞贴壁, 强力霉素 (Doxycycline, Dox; 100 ng/mL ; 碧云天, 中国) 处理 48~72 h 诱导细胞表达重组蛋白, 荧光显微镜 (徕卡, 德国) 观察增强型绿荧光蛋白 (EGFP) 表达, 取 24 孔板中对应的稳转细胞株扩大培养用于后续实验。

1.7 调查 *LcAUF1* 对 RAW264.7 细胞 LPS 诱导的 *Tnf- α* 基因时序表达的影响

pTRE3G 稳转细胞和 pTRE3G-*LcAUF1* 稳转细胞按 2×10^5 细胞/孔分别接种于 6 孔板, 培养细胞汇集度至 80%~90%; 强力霉素 (100 ng/mL) 处理 48 h 诱导细胞表达重组蛋白, 再加入 LPS (100 ng/mL) 诱导 *Tnf- α* 表达, 分别在 LPS 处理 0、0.5、1.0、2.0、3.0 和 6.0 h 时每组各取 3 孔 ($n=3$) 收集细胞提取总 RNA, 按“RT-qPCR”部分检测 LPS 处理不同时间点 TNF- α mRNA 相对表达量。

1.8 调查 *LcAUF1* 对 TNF- α mRNA 稳定性的影响

pTRE3G 稳转细胞和 pTRE3G-*LcAUF1* 稳转细胞按 2×10^5 细胞/孔分别接种于 6 孔板, 培养细胞汇集度至 80%~90%; LPS (100 ng/mL) 处理 0.5 h 诱导 *Tnf- α* 表达, 再加入放线菌素 D (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 碧云天, 中国) 抑制 RAW264.7 细胞转录, 在放线菌素 D 处理 0、20、40、60 和 80 min 时每组各取 3 孔 ($n=3$) 收集提取总 RNA; 以放线菌素 D 处理 0 min 时为参照, 按“RT-qPCR”部分检测放线菌素 D 不同时间点 TNF- α mRNA 和 β -actin mRNA 相对于 0 min 的相对表达量。

1.9 数据分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 9.0 软件 (GraphPad software Inc., 美国) 进行分析, 以均值 \pm 标准差 (SD) 表示。组间统计学差异采用非配对 *t* 检验 (unpaired student's *t* test), *P* 值小于 0.05 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 *LcAUF1* mRNA 全长 cDNA 的克隆及序列分析

本研究克隆的大黄鱼 *LcAUF1* mRNA 全长 cDNA 1 413 bp [不包括 poly(A)], 其中 5'-非翻译区 (5' untranslated region, 5'UTR) 266 bp、3'-非翻译区 (3' untranslated region, 3'UTR) 193 bp、ORF 区 954 bp, ORF 区编码 317 个氨基酸残基, 与基于大黄鱼基因组测序预测的 AUF1 (登录号: XP_019134259.1 和 XP_019134260.1) 氨基酸序列一致性为 100% (图 1)。推导的 *LcAUF1* 理论分子质量为 35.67 ku, 理论等电点 (pI) 5.6; SignalP 6.0 分析显示 N 端没有信号肽序列 (信号肽概率为 0.000 7); NLStradamus 1.8 预测的核定位信号为 D₁₂₇PKKAKAMKSKEPVK₁₄₁ (概率 0.793; 图 1); NetNES 1.1 预测的核输出信号为 L₂₀₈SKCEIKVAM₂₁₇ (图 1)。使用 BLASTP 在 NCBI 非冗余蛋白质数据库中检索同源序列, 显示 *LcAUF1* 氨基酸序列与棘头梅童鱼 (*Collichthys lucidus*) AUF1 (登录号: TKS85014.1) 同源性最高, 氨基酸序列一致性为 99.37%; 其次为金头鲷 (*Sparus aurata*) AUF1 (登录号: XP_030291811.1), 氨基酸序列一致性为 98.74%; 与斑马鱼 (*Danio rerio*) AUF1 (登录号: XP_005155601.1) 的氨基酸序列一致性为 85.58%; 在人和小鼠的 4 个 AUF1 异构体中, *LcAUF1* 与 p42^{AUF1} 的氨基酸序列一致性最高, 分别为 83.15% (登录号: NP_112737.1) 和 83.51% (登录号: NP_001070734.1)。

人 AUF1 pre-mRNA 编码区由 8 个外显子 (exon) 组成, 其中外显子 2 和外显子 7 是可变剪接外显子, 经选择性剪接编码 p37^{AUF1}、p40^{AUF1}、p42^{AUF1} 和 p45^{AUF1} 4 种异构体^[12]。将 *LcAUF1* 与人的 4 个 AUF1 异构体以及小鼠 p42^{AUF1} 进行多序列比对显示, *LcAUF1* 缺失外显子 2, 保留外显子 7, 与人和小鼠 p42^{AUF1} 结构一致 (图 2)。除外显子 1 编码的区域外, AUF1 氨基酸序列在人、小鼠和大黄鱼中高度保守, 并且人和小鼠 AUF1 的重要功能型结构域: CBFNT (CARG 结合因子 A 样蛋白 N 端结构域)、RRM1、RRM2、Q-rich domain 等在 *LcAUF1* 中也高度保守 (图 2)。以上结果表明,

```

1   ACATGGGACACACGAAGAAGAAAACGCGATGAAAACAAACCGTCGCTCCTCAAATTACAGCGACTAATTAATATTTATGTAATTATCCTC
91  ATTACCAGGCTCGGTTAACGTACAGCTCGACTCGCGACACTATTAAACAGCTAGCTGTGAATTGGCGCAAAAAGCAGCTGCAC
181 AGCTCGGACAGAGCGTTAGCCGTTAGCTTAGCTTCCACAGTGTGACGTAGTTTGTAAAAACAAACACACAAACAAACATGT
1   M
271 CGGACGACTACGAGTTCAGCGACGACACCACCATGATGAGGATGGAGGAGGACGAGAGGCCAACAGCGACCCCGATGTCCGGCGCGG
2   S D D Y E F S D D T T M M R M E E D G E A N S D D P M S A A

361 GGGACTGCGGCTGATGGGGGGCAGGCCGAGGGGTCGCGGATCGACGCCAGCAAGAACGAGGAGGACGAGGGGAAGATGTTGTAGGAG
32  G D C G L M G G E A E G S R I D A S K N E E D E G K M F V G
      CBFNT
451 GACTCAGCTGGGACACGACCAAGAAGGATCTCAAAGATTACTTCTCCAAGTACGGGGAGGTCGTGGACTGCACGTTAAAGCTGGACCCCA
62  G L S W D T T K K D L K D Y F S K Y G E V V D C T L K L D P
      RRM1
541 TGACAGGTCGATCCAGAGGGTTCGGCTTCGTGCTCTTCAAAGACCCGAGAGTGTGACAAGGTCGCCTCACAGAAGGAACACAACTCA
92  M T G R S R G F G F V L F K D P E S V D K V A S Q K E H K L

631 ACGGAAAGGTCATCGACCCCAAAAAGCCAAGGCCATGAAGAGCAAGGAGCCCGTGAAGAAGATCTTTGTGGCGGCCTCTCCAGACA
122 N G K V I D P K K A K A M K S K E P V K K I F V G G L S P D
      NLS
721 CGCCCCAGGAGAAAAGTCAGAGAGTACTTTGGTGCCTTCGGAGAGGTGGAGTCGATCGAACTCCCATGGAGAAACAAAACAAAAGAC
152 T P E E K V R E Y F G A F G E V E S I E L P M E N K T N K R
      RRM2
811 GAGGCTTCTGCTTCATCAGTTCAAAGAGGAGCGGTGAAGAGCATCATGGAGAAAAGTACCACAACATTGGACTCAGCAAGTGTG
182 R G F C F I T F K E E E P V K S I M E K K Y H N I G L S K C
      NES
901 AAATCAAAGTGGCCATGTCAAAGGAGCAGTACCAGCAGCAGCAGTACTGGGAGGCCAGAGGAGGACACTCGTCCAGGTCAGGAGCAGAG
212 E I K V A M S K E Q Y Q Q Q Q Y W G G R G G H S S R S R G R
      Q-rich domain
991 GCGCGGTCCAATCAAACCTGGAACCCAGGGTTACGGCAACTACTGGAATCAAGGCTACGGCAACTACGGCAACTACGGTTACAATAATC
242 G G G P N Q N W N Q G Y G N Y W N Q G Y G N Y G N Y G Y N N
1 081 AAGGCTACGGAGGCTACGGTGGCTATGATTACCCAAGTTACAACAATATTACGGATACGGCGATTACAACGATCAGTCCGGCGGATACG
272 Q G Y G G Y G G Y D Y P S Y N N Y Y G Y G D Y N D Q S G G Y
1 171 GCAAGTCGCGACGTCGTGGTGGTACACCAACAGTTACAAGCCGTATTAACGGGGGGTGGGGACAAACCGTCGTCTTCAACGGAGCTTC
302 G K S P R R G G H T N S Y K P Y *
1 261 CTGCAAGCCATCATGAGCTGACTCCCAGATACTCTCACAGGGCCCGCTCAATGCGGACCGGGTACGAGAAGCATAACGCTCTCGAAT
1 351 GCTGCCATTGGTATGGTCTTACAACATCCTGTATCAGCATTCTAAACTAAAAACAAAACAAAAA

```

图1 *LcAUF1* cDNA 核酸序列和推导的氨基酸序列

* 终止密码子; 细下划线. CBFNT 结构域; 粗下划线. 核定位信号; 点下划线. 核输出信号; 阴影. RNA 识别结构域; 方框. 谷氨酰胺富集结构域; CBFNT. CARG 结合因子 A 样蛋白 N 端结构域; RRM1. RNA 识别结构域 1; RRM2. RNA 识别结构域 2; Q-rich domain. 谷氨酰胺富集结构域; NES. 核输出信号; NLS. 核定位信号。

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequence of *LcAUF1* gene from *L. crocea*

*. stop codon; thin underline. CBFNT domain; bold underline. nuclear localization signal; dot underline. nuclear export signal; shadow. RNA recognition motif; box. Q-rich domain; CBFNT. CARG-binding factor A-like proteins N terminal domain; RRM1. RNA recognition motif 1; RRM2. RNA recognition motif 2; Q-rich domain. glutamine-rich domain; NES. nuclear export signal; NLS. nuclear localization signal.

本研究克隆的 *LcAUF1* 属于 p42^{AUF1}。

2.2 *LcAUF1* 系统发生分析

为确定 *LcAUF1* 在脊椎动物 AUF1 家族中的系统发生地位, 选取脊椎动物不同类群代表性物种 AUF1 与 *LcAUF1* 基于邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建脊椎动物 AUF1 系统发生树。结果显示, 脊椎动物 AUF1 按类群各聚为一支; *LcAUF1* 与其他鱼类 AUF1 聚为一支 (置信度 100%), 且在鱼类进化中, 与同为鲈形目 (Perciformes) 的棘头梅童鱼和金头鲷 AUF1

聚为一支 (置信度 100%; 图 3)。以上结果表明本研究克隆的 *LcAUF1* 是大黄鱼 AUF1 家族成员。

2.3 *Lcauf1* 基因的组织表达特异性

基因的组织表达特异性与其生理、病理功能密切联系^[36]。本研究使用 RT-qPCR 技术检测大黄鱼 ($n=5$) 肌肉、胃、脑、心脏、脾脏、肾脏、头肾、肝脏、鳃等 9 种组织中 *Lcauf1* 的相对表达量。结果显示, 本次研究采集的 9 个组织中均检测到 *Lcauf1* 转录本; 其中肌肉 (208.37 ± 117.31) 中 *Lcauf1* 表达量最高, 而脑

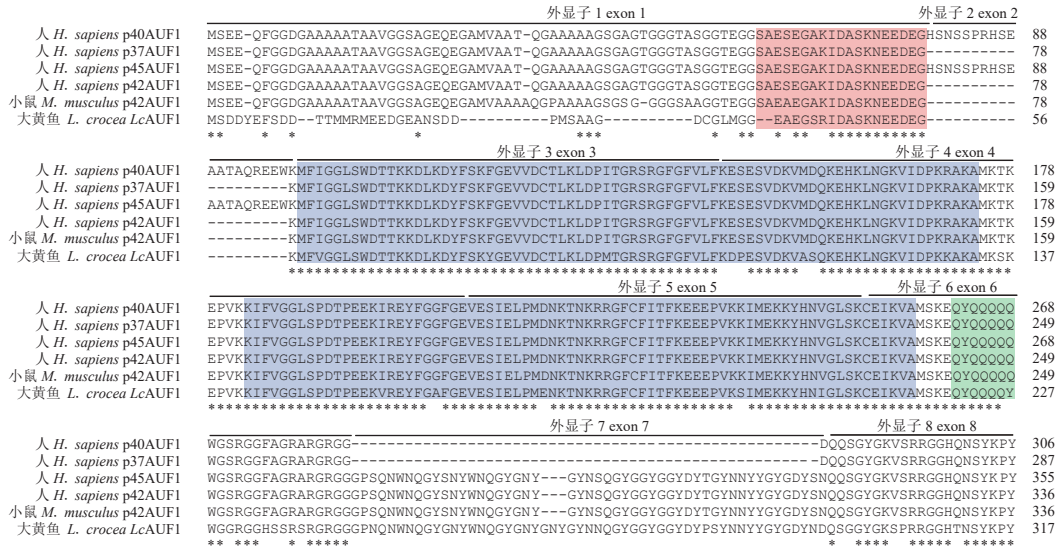


图 2 LcAUF1 与人和小鼠 AUF1 序列比对

*. 相同氨基酸位点; -. 氨基酸缺失位点; 上划线. 人 AUF1 外显子及其编码肽段; 红色阴影区. CBFNT 结构域; 蓝色阴影区. RNA 识别结构域; 绿色阴影区. 谷氨酰胺富集结构域.

Fig. 2 Multiple sequence alignment of the AUF1 amino acid sequences of L. crocea, H. sapiens and M. musculus

*. identical residues; -. alignment gaps; overlines. the exons and their coding peptide segments of H. sapiens AUF1; red shadow. CBFNT domain; blue shadow. RRM1 and RRM2 domain; green shadow. Q-rich domain.

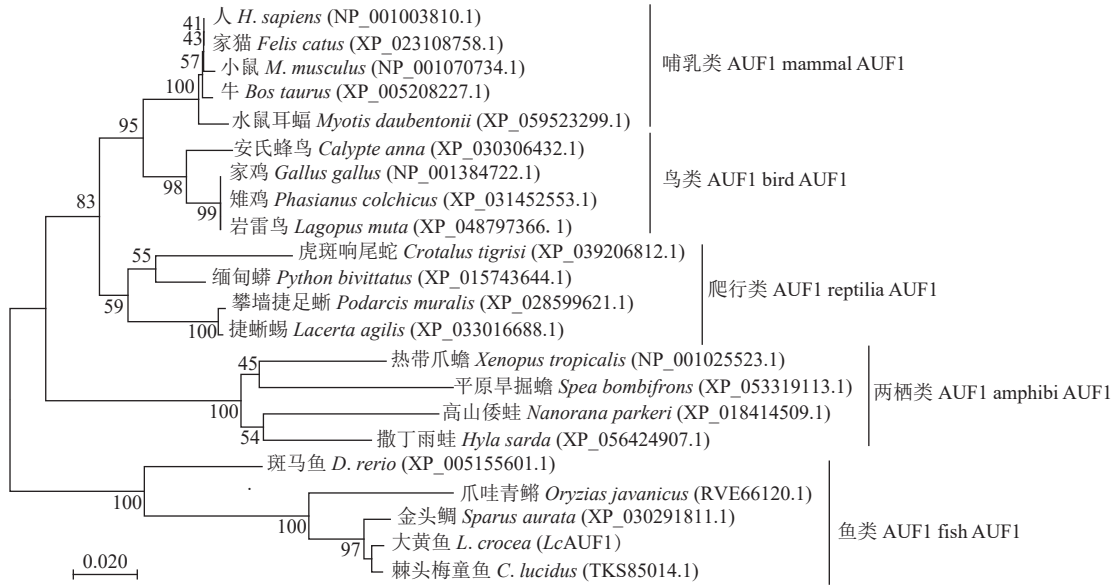


图 3 LcAUF1 的系统发生分析

使用 MEGA 7.0 软件包采用 NJ 法构建系统发育树; 分支数值为 1 000 次分析得到的 bootstrap 值; 比例尺代表分支长度; 箭头示 LcAUF1 在 NJ 树中的位置。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of LcAUF1

The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining methods using MEGA 7.0 and bootstrapped 1 000 times; the scale bar indicated a branch length of 0.020; the arrow indicated the site of LcAUF1.

(7.16±2.77)、心脏 (6.04±2.90)、脾脏 (5.19±2.40)、肝脏 (2.65±1.26)、肾脏 (1.13±0.54) 中 Lcauf1 表达量相对较低 (图 4)。

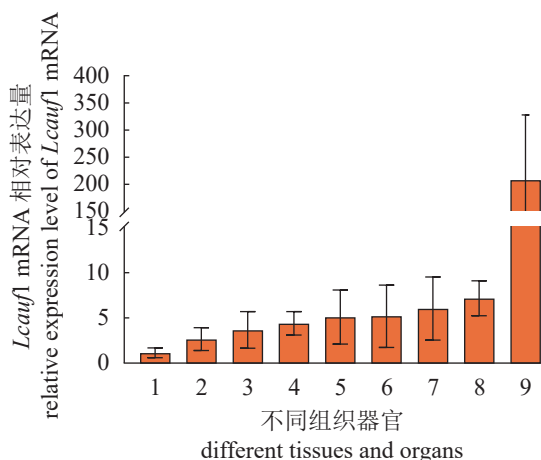


图4 健康大黄鱼不同组织中 *Lcauf1* 的相对表达量

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

Fig. 4 Relative expression levels of *Lcauf1* transcripts in different tissues of healthy *L. crocea*

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

2.4 大黄鱼脾脏和肾脏 *Lcauf1* 基因表达对副溶血弧菌攻毒的时序响应

为调查 *LcAUF1* 与大黄鱼抗感染免疫在免疫防御反应之间的关联性, 本研究调查大黄鱼主要免疫器官脾脏和肾脏 *Lcauf1* 表达对副溶血弧菌攻毒的时序响应。结果显示, 副溶血弧菌攻毒 24 h 显著下调脾脏 *Lcauf1* 表达水平 (0.39 倍, $P < 0.001$; 图 5-a); 而攻毒 2 h (0.51 倍, $P < 0.01$) 和 12 h (0.58 倍, $P < 0.001$) 时大黄鱼肾

脏 *Lcauf1* 表达水平也显著下调 (图 5-b)。以上结果提示, 大黄鱼肾脏和脾脏 *LcAUF1* 可能参与调节副溶血弧菌诱导的炎症因子表达。

2.5 *LcAUF1* 调节 RAW264.7 细胞 LPS 诱导的 *Tnf-α* 表达

鱼类和哺乳动物巨噬细胞功能相似, 都是病原入侵宿主表达炎症因子的主要免疫细胞^[37]。由于鱼类细胞转染效率低^[38-39], 因此, 本研究在小鼠 RAW264.7 细胞中过表达 *LcAUF1*, 探讨 *LcAUF1* 对 *Tnf-α* 表达的调节作用。强力霉素 (100 ng/mL) 处理 48 h 诱导 *LcAUF1* 表达后, 100 ng/mL LPS 诱导 *Tnf-α* 表达, RT-qPCR 检测 LPS 处理不同时间点 *Tnf-α* 相对表达量。结果显示, RAW264.7 细胞过表达 *LcAUF1*, 对基态 (0 h; $P > 0.05$) 以及 LPS 处理 1 h ($P > 0.05$) 和 2 h ($P > 0.05$) 时 *Tnf-α* 表达水平无显著影响, 但显著下调 LPS 处理 0.5 (0.84 倍, $P < 0.01$)、3.0 (0.70 倍, $P < 0.001$) 和 6.0 h (0.77 倍, $P < 0.01$) 时 *Tnf-α* 表达水平 (图 6)。

2.6 *LcAUF1* 促进 *TNF-α* mRNA 降解

结合靶 mRNA 3'-UTR 的 ARE 顺式作用元件促进 mRNA 降解是 AUF1 调节 *TNF-α* 等炎症因子 mRNA 表达的主要方式^[20]。为调查 *LcAUF1* 对 *TNF-α* mRNA 稳定性的调节作用, 本研究在 LPS (100 ng/mL) 处理 RAW264.7 细胞 0.5 h 诱导 *Tnf-α* 基因表达后, 以放线菌素 D (5 μg/mL)

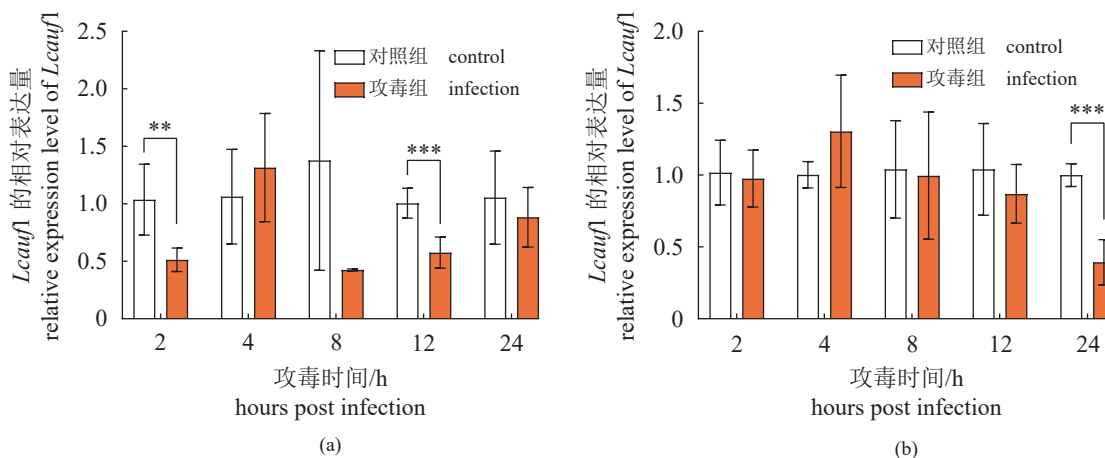


图5 副溶血弧菌攻毒大黄鱼脾脏和肾脏中 *Lcauf1* 基因的时序表达

(a) 脾脏中 *Lcauf1* 的时序表达; (b) 肾脏中 *Lcauf1* 的时序表达; “**” $P < 0.01$, “***” $P < 0.001$; 下同。

Fig. 5 Temporal expression of *Lcauf1* in the spleen and kidney after *V. parahaemolyticus* challenge

(a) temporal expression of *Lcauf1* in the spleen; (b) temporal expression of *Lcauf1* in the kidney; “**” $P < 0.01$, “***” $P < 0.001$; the same below.

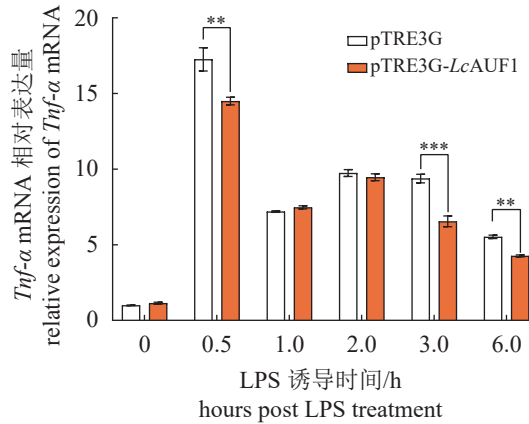


图6 LcAUF1 调节 RAW264.7 细胞 LPS 诱导的 *Tnf-α* 时序表达

Fig. 6 The overexpression of LcAUF1 regulated LPS-induced *Tnf-α* expression in RAW264.7 cells

抑制 RAW264.7 细胞转录, RT-qPCR 检测过表达 LcAUF1 对 TNF- α mRNA 降解速率的影响。结果显示, 过表达 LcAUF1 促进 TNF- α mRNA 降解, 显著下调放线菌素 D 抑制转录后 40 (0.40 倍, $P < 0.01$)、60 (0.39 倍, $P < 0.01$) 和 80 min (0.52 倍, $P < 0.05$) 时 TNF- α mRNA 的表达水平, pTRE3G 空载对照组和 LcAUF1 过表达组 TNF- α mRNA 半寿期 ($t_{1/2}$) 分别为 46.3 和 27.4 min (图 7-a); 同时过表达 LcAUF1 对 β -actin mRNA 表达水平没有显著影响 (图 7-b)。以上结果表明, LcAUF1 可通过促进 mRNA 降解调节 TNF- α mRNA 表达量。

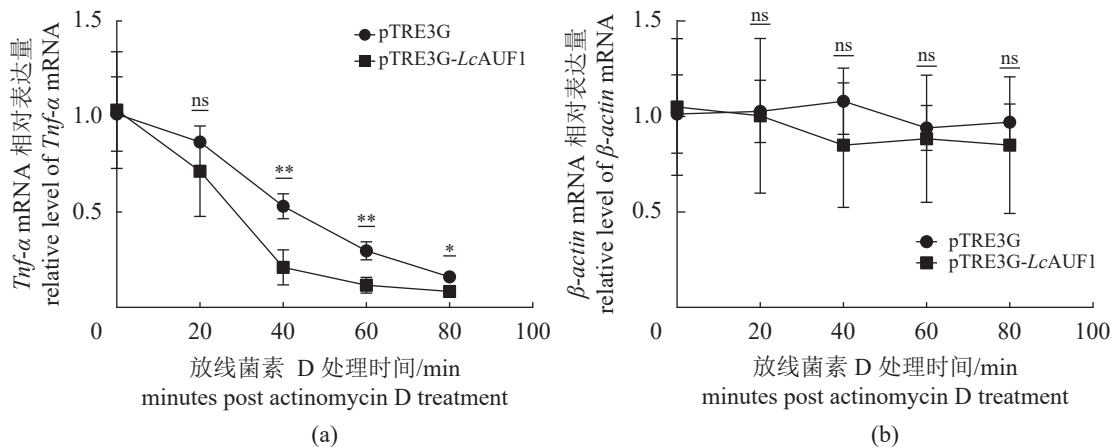


图7 LcAUF1 促进 *Tnf-α* mRNA 降解

(a) *Tnf-α* mRNA 降解曲线; (b) β -actin mRNA 降解曲线。

Fig. 7 LcAUF1 promotes *Tnf-α* mRNA decay

(a) degradation curve of *Tnf-α* mRNA; (b) degradation curve of β -actin mRNA.

3 讨论

炎症因子表达过量和高炎症反应是出血性败血症等鱼类感染性养殖病害的关键发病机制^[40-41]。例如, 维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 强毒株感染诱导中国花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 脾脏趋化因子和炎症因子表达水平快速上调, 引发急性败血症并导致个体死亡^[42]。RNA 结合蛋白 AUF1 在哺乳动物中可通过促进炎症因子 mRNA 降解, 下调炎症因子表达, 抑制炎症反应, 被认为是炎症性疾病治疗的潜在靶点^[20], 但鱼类 AUF1 的功能尚未见报道。本研究从大黄鱼中克隆了一个 AUF1 家族新成员 LcAUF1 mRNA 的全长 cDNA, 结构和功能分析显示, 在脊椎动物进化过程中 AUF1 的结构和功能高度保守, LcAUF1 也可通过促进 TNF- α mRNA 降解, 下调 TNF- α mRNA 表达量, 提示 LcAUF1 可能是大黄鱼炎症因子表达平衡的重要调节蛋白。另外, 诱导表达分析显示副溶血弧菌攻毒大黄鱼主要免疫器官脾脏和肾脏中 LcAUF1 表达发生时序响应, 提示 LcAUF1 可能参与大黄鱼抗感染炎症因子表达平衡调控, 是大黄鱼感染性养殖病害防治的潜在靶点。

本研究克隆的 LcAUF1 mRNA 的全长 cDNA 编码 317 个氨基酸残基, 与棘头梅童鱼、金头鲷、斑马鱼 AUF1 家族成员的氨基酸序列一致性高达 85.58%~99.37%, 且在系统发生树中 LcAUF1 与其他鱼类 AUF1 家族成员聚为一

支, 表明 *LcAUF1* 是大黄鱼 AUF1 家族成员。哺乳动物 AUF1 家族包含 4 个由 pre-mRNA 经选择性剪切形成的异构体, 即 8 个外显子编码的 p45^{AUF1}, 缺失外显子 2 的 p42^{AUF1}, 缺失外显子 7 的 p40^{AUF1} 以及外显子 2 和外显子 7 都缺失的 p37^{AUF1} [12]。与人和小鼠 AUF1 家族成员进行序列比对显示, *LcAUF1* 缺失外显子 2 编码的肽段, 一级结构与哺乳动物 p42^{AUF1} 相同; 并且 *LcAUF1* 与人和小鼠 p42^{AUF1} 氨基酸序列高度同源, 序列一致性分别为 83.15% (NP_112737.1) 和 83.51% (NP_001070734.1), 表明 *LcAUF1* 属于哺乳动物 p42^{AUF1} 同源物。哺乳动物 AUF1 中重要功能结构域在 *LcAUF1* 也高度保守。例如, N 端二聚体化结构域、串联的 RNA 识别结构域 (RRM1 和 RRM2)、谷氨酰胺富集结构域等 3 个与哺乳动物 AUF1 识别结合 ARE 顺式作用元件相关的结构域中 [13], RRM1、RRM2 和谷氨酰胺富集结构域在 *LcAUF1* 中高度保守; N 端二聚体化结构域虽然与 AUF1 二聚体形成相关的丙氨酸富集区在 *LcAUF1* 中缺失, 但与 RNA 结合相关的 CBFNT 结构域高度保守 (图 2)。以上结果表明, 脊椎动物进化过程中 AUF1 氨基酸序列和功能结构域都高度保守, 提示 AUF1 的功能可能也高度保守, 即 *LcAUF1* 可能也在转录后水平通过靶标 mRNA 3' UTR ARE 元件介导的促 mRNA 降解作用下调靶基因表达。

基因的组织表达模式与其生理功能密切相关, 调查基因的组织表达谱可为基因功能研究提供线索 [36]。Lafon 等 [43] 报道在小鼠脾脏、胸腺、肺、肝脏、肾脏、肠道、脑等组织中均检测到 *Auf1* 转录本, 免疫器官脾脏和胸腺中 *Auf1* 表达水平最高。Lu 等 [44] 报道 AUF1 蛋白也广泛分布于小鼠脾脏、胸腺、性腺、脑、小肠和肺等组织器官中, 且同样在脾脏和胸腺表达水平最高, 并主要在二者的淋巴细胞中表达。人 AUF1 基因的组织表达模式类似于小鼠, 并在免疫系统中高水平表达 [45]。与组织表达模式相对应, 功能研究显示, 人和小鼠 AUF1 参与炎症、脾脏发育等免疫相关以及神经发育、衰老、癌症等多样化的生理病理过程调控 [46]。本研究采集的大黄鱼 9 个组织样本中均检测到 *Lcauf1* 转录本, 表明 *Lcauf1* 在大黄鱼机体中广泛表达, 提示 *LcAUF1* 可能参与多样化的生理

病理过程调控。但 *Lcauf1* 组织表达特异性与人和小鼠存在差异, *Lcauf1* 在大黄鱼肌肉组织中表达水平最高, 免疫相关器官脾脏和头肾表达水平中等, 肾脏表达水平最低 (图 4)。Abadi 等 [47] 报道小鼠肌肉组织 AUF1 通过促进检查点蛋白 mRNA 降解调节肌肉发生, 因此, 大黄鱼肌肉组织 *Lcauf1* 高水平表达提示 *LcAUF1* 可能是肌肉发生的重要调节蛋白。尽管 *Lcauf1* 在健康大黄鱼免疫相关器官中表达水平相对较低, 但副溶血弧菌攻毒 2 h ($P < 0.01$) 和 12 h ($P < 0.001$) 的脾脏以及攻毒 24 h ($P < 0.001$) 的肾脏中, *Lcauf1* 表达水平都显著下调 (图 5), 提示 *LcAUF1* 可能参与调节大黄鱼抗副溶血弧菌感染炎症因子表达, 是大黄鱼感染性养殖病害防治新技术开发的潜在靶点。

结合靶标 mRNA 3' UTR 区 ARE 元件促进 mRNA 降解是哺乳动物 AUF1 调节靶基因表达的主要作用机制 [20]。AUF1 已鉴定的靶标 mRNA 中包括大量 3' UTR 含 ARE 元件的炎症因子 mRNA, 如 TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10 等炎症因子 mRNA, AUF1 通过促进 mRNA 降解, 下调这些炎症因子 mRNA 表达量, 抑制炎症反应 [20]。例如, 脂联素处理 RAW264.7 细胞诱导 AUF1 表达水平上调, AUF1 促进 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 等炎症因子的 mRNA 降解, 介导脂联素的抗炎作用 [48]; 而敲除小鼠巨噬细胞 *Auf1* 基因, *Tnf- α* 和 *Il-1 β* mRNA 降解速率下降, 半寿期延长, LPS 诱导的 TNF- α 和 IL-1 β 表达量上调 [21]。在本研究中, RAW264.7 细胞过表达 *LcAUF1* 对 LPS 处理 0、1.0 和 2.0 h 时 *Tnf- α* mRNA 表达水平没有影响 ($P > 0.05$), 但显著下调 LPS 处理 0.5、3.0 和 6.0 h 时 *Tnf- α* mRNA 表达量 ($P < 0.05$), 提示 *LcAUF1* 可能也是通过促进 mRNA 降解, 下调 *Tnf- α* mRNA 表达量。以放线菌素 D 抑制 RAW264.7 细胞转录后, 过表达 *LcAUF1* 加速 *Tnf- α* mRNA 降解, *Tnf- α* mRNA 半寿期缩短, 但 3' UTR 没有 ARE 元件的 *β -actin* mRNA 降解速率不受影响。表明 *LcAUF1* 也如哺乳动物 AUF1, 通过促进 mRNA 降解, 下调 *Tnf- α* mRNA 表达量, 而 *Tnf- α* mRNA 3' UTR 的 ARE 元件可能介导了 *LcAUF1* 的促 mRNA 降解活性。Roca 等 [49] 报道 mRNA 3' UTR 区的 ARE 元件是

脊椎动物进化过程中功能保守的顺式元件, 含 ARE 元件的硬骨鱼 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 3' UTR 不仅在硬骨鱼淋巴细胞中介导 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 降解, 也在人胚肾细胞系 HEK293 细胞中促进偶联的海肾荧光素酶 mRNA 降解。本研究中 *LcAUF1* 在小鼠 RAW264.7 细胞也促进 *Tnf- α* mRNA 降解, 表明 ARE 元件介导 AUF1 促炎症因子 mRNA 降解作用是脊椎动物进化过程中高度保守的炎症因子表达调节机制, 提示 *LcAUF1* 可能是大黄鱼炎症因子表达平衡的关键调节蛋白。因此, *LcAUF1* 在大黄鱼抗感染炎症因子表达平衡中的作用和地位及其潜在应用价值需进一步研究。

4 结论

本研究采用 RACE 技术克隆鉴定了大黄鱼 *LcAUF1* mRNA 的全长 cDNA 序列, 结构分析显示哺乳动物 AUF1 氨基酸序列和重要功能结构域在 *LcAUF1* 中高度保守, RAW264.7 细胞过表达 *LcAUF1* 促进 *Tnf- α* mRNA 降解, 下调 LPS 诱导的 *Tnf- α* mRNA 表达水平, 表明 AUF1 在脊椎动物进化中结构和功能都高度保守, *LcAUF1* 也可通过促进 mRNA 降解下调炎症因子 mRNA 表达。组织表达特异性分析显示, *Lcauf1* 在大黄鱼机体中广泛表达, 且大黄鱼主要免疫器官脾脏和肾脏中 *Lcauf1* 的时序表达受副溶血弧菌攻毒影响, 提示 *LcAUF1* 可能是大黄鱼抗感染炎症因子表达平衡的重要调节蛋白, 在大黄鱼感染性养殖病害防治新技术开发中有潜在应用价值。

参考文献 (References):

- [1] Wang Q C, Ji W, Xu Z. Current use and development of fish vaccines in China[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 96: 223-234.
- [2] 邓益琴. 水产动物弧菌病及其生物防治研究进展 [J]. *大连海洋大学学报*, 2023, 38(4): 553-563, Deng Y Q. Progress in research on vibriosis and biological control in animals in aquaculture: a review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2023, 38(4): 553-563 (in Chinese).
- [3] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 428-435.
- [4] Murray P J, Wynn T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11(11): 723-737.
- [5] Huang M, Cai S L, Su J Q. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(21): 5376.
- [6] Smale S T, Natoli G. Transcriptional control of inflammatory responses[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2014, 6(11): a016261.
- [7] Priester J, Dreute J, Kracht M, et al. Post-transcriptional control of mRNA metabolism and protein secretion: the third level of regulation within the NF- κ B system[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(9): 2108.
- [8] Guillemin A, Kumar A, Wencker M, et al. Shaping the innate immune response through post-transcriptional regulation of gene expression mediated by RNA-binding proteins[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 12: 796012.
- [9] Uchida Y, Chiba T, Kurimoto R, et al. Post-transcriptional regulation of inflammation by RNA-binding proteins via *cis*-elements of mRNAs[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2019, 166(5): 375-382.
- [10] Brewer G. An A+U-rich element RNA-binding factor regulates *c-myc* mRNA stability *in vitro*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(5): 2460-2466.
- [11] Zhang W, Wagner B J, Ehrenman K, et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(12): 7652-7665.
- [12] Wagner B J, DeMaria C T, Sun Y, et al. Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms[J]. *Genomics*, 1998, 48(2): 195-202.
- [13] DeMaria C T, Sun Y, Long L, et al. Structural determinants in AUF1 required for high affinity binding to A + U-rich elements[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(44): 27635-27643.
- [14] Sarkar B, Xi Q R, He C, et al. Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(18): 6685-6693.
- [15] Pont A R, Sadri N, Hsiao S J, et al. mRNA decay factor AUF1 maintains normal aging, telomere maintenance, and suppression of senescence by activation of telomerase transcription[J]. *Molecular Cell*, 2012, 47(1): 5-15.
- [16] Eversole A, Maizels N. *In vitro* properties of the conserved

- mammalian protein hnRNP D suggest a role in telomere maintenance[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(15): 5425-5432,
- [17] Enokizono Y, Konishi Y, Nagata K, *et al.* Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(19): 18862-18870,
- [18] Yu H, Sun Y H, Haycraft C, *et al.* MKP-1 regulates cytokine mRNA stability through selectively modulation subcellular translocation of AUF1[J]. *Cytokine*, 2011, 56(2): 245-255,
- [19] Gouble A, Grazide S, Meggetto F, *et al.* A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNP D overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice[J]. *Cancer Research*, 2002, 62(5): 1489-1495.
- [20] Gratacós F M, Brewer G. The role of AUF1 in regulated mRNA decay[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2010, 1(3): 457-473,
- [21] Lu J Y, Sadri N, Schneider R J. Endotoxic shock in *AUF1* knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs[J]. *Genes & Development*, 2006, 20(22): 3174-3184,
- [22] Sadri N, Schneider R J. *Auf1/Hnrnpd*-deficient mice develop pruritic inflammatory skin disease[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2009, 129(3): 657-670,
- [23] Gargani S, Lourou N, Arapatzi C, *et al.* Inactivation of AUF1 in myeloid cells protects from allergic airway and tumor infiltration and impairs the adenosine-induced polarization of pro-angiogenic macrophages[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 752215,
- [24] Hernández-Cabanyero C, Sanjuán E, Mercado L, *et al.* Evidence that fish death after *Vibrio vulnificus* infection is due to an acute inflammatory response triggered by a toxin of the MARTX family[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 142: 109131,
- [25] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2022 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 22.
- The Bureau of Fisheries and Fishery Administration, The Ministry of Agriculture, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2022 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2022: 22 (in Chinese).
- [26] 韩承义, 吴雄飞, 许斌福, 等. 2020 年中国大黄鱼产业现状分析及发展建议 [J]. *渔业研究*, 2022, 44(4): 395-406,
- Han C Y, Wu X F, Xu B F, *et al.* Analysis and development suggestions of *Larimichthys crocea* industry of China in 2020[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2022, 44(4): 395-406 (in Chinese).
- [27] Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, *et al.* Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions[J]. *Electrophoresis*, 1994, 15(1): 529-539,
- [28] Teufel F, Almagro Armenteros J J, Johansen A R, *et al.* SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(7): 1023-1025,
- [29] Nguyen Ba A N, Pogoutse A, Provarnt N, *et al.* NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction[J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(1): 202,
- [30] Fu S C, Imai K, Horton P. Prediction of leucine-rich nuclear export signal containing proteins with NESsential[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(16): e111,
- [31] Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, *et al.* NCBI BLAST: a better web interface[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(S2): W5-W9,
- [32] Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L Y, *et al.* CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D200-D203,
- [33] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948,
- [34] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874,
- [35] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408,
- [36] 刘伟, 孙志强, 谢红卫. 基因组组织特异性相关研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2016, 43(1): 5-13,
- Liu W, Sun Z Q, Xie H W. The progress of gene tissue specificity researches[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2016, 43(1): 5-13,
- [37] Grayfer L, Kerimoglu B, Yaparla A, *et al.* Mechanisms of fish macrophage antimicrobial immunity[J]. *Frontiers in Immunology*

- logy, 2018, 9: 1105,
- [38] 张宏祥, 李坤明, 王娜, 等. 斑石鲷肝脏细胞系的建立与鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(2): 360-368.
Zhang H X, Li K M, Wang N, *et al.* Establishment and characterization of a liver cell line from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(2): 360-368 (in Chinese).
- [39] 王贤慧, 慕鹏飞, 敖敬群. 大黄鱼头肾细胞系瞬时转染方法的选择及优化[J]. 生物技术, 2023, 33(3): 287-292,321.
Wang X H, Mu P F, Ao J Q. Selection and optimization for transient transfection method of large yellow croaker head kidney cells (LYCK)[J]. Biotechnology, 2023, 33(3): 287-292,321 (in Chinese).
- [40] Torraca V, Mostowy S. Zebrafish infection: from pathogenesis to cell biology[J]. Trends in Cell Biology, 2018, 28(2): 143-156,
- [41] Gomes M C, Mostowy S. The case for modeling human infection in zebrafish[J]. Trends in Microbiology, 2020, 28(1): 10-18.
- [42] Wang B T, Hu J M, Feng J, *et al.* Acute septicemia and immune response of spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) to *Aeromonas veronii* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 124: 47-55,
- [43] Lafon I, Carballès F, Brewer G, *et al.* Developmental expression of AUF1 and HuR, two *c-myc* mRNA binding proteins[J]. Oncogene, 1998, 16(26): 3413-3421,
- [44] Lu J Y, Schneider R J. Tissue distribution of AU-rich mRNA-binding proteins involved in regulation of mRNA decay[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(13): 12974-12979,
- [45] Masuda K, Marasa B, Martindale J L, *et al.* Tissue- and age-dependent expression of RNA-binding proteins that influence mRNA turnover and translation[J]. Aging, 2009, 1(8): 681-698,
- [46] Moore A E, Chenette D M, Larkin L C, *et al.* Physiological networks and disease functions of RNA-binding protein AUF1[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2014, 5(4): 549-564,
- [47] Abbadi D, Yang M, Chenette D M, *et al.* Muscle development and regeneration controlled by AUF1-mediated stage-specific degradation of fate-determining checkpoint mRNAs[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(23): 11285-11290,
- [48] Shrestha A, Pun N T, Park P H. ZFP36L1 and AUF1 induction contribute to the suppression of inflammatory mediators expression by globular adiponectin via autophagy induction in macrophages[J]. Biomolecules & Therapeutics (Seoul), 2018, 26(5): 446-457,
- [49] Roca F J, Cayuela M L, Secombes C J, *et al.* Post-transcriptional regulation of cytokine genes in fish: a role for conserved AU-rich elements located in the 3'-untranslated region of their mRNAs[J]. Molecular Immunology, 2007, 44(4): 472-478.

Molecular cloning of AUF1 gene from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and analysis of its TNF- α mRNA decay-promoting activity

HE Zhiqiao, WANG Huijuan, GUO Shengquan, ZHANG Xiaolin,
YAN Xiaojun, SHEN Wang*

Marine Science and Technical College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China

Abstract: Hyperinflammation, induced by the overproduction of inflammatory cytokines, is a key pathogenesis in infectious diseases of cultured fish, such as hemorrhagic septicemia. Therefore, the biosynthesis of inflammatory cytokines is precisely regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms to ensure tight control of the production. The importance of AU-rich element-binding factor 1 (AUF1), a ubiquitously expressed mRNA binding protein also known as heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (hnRNP D0), in maintaining the balance of inflammatory response has been well demonstrated in mammals, which it decreases the production of inflammatory cytokines by promoting mRNA decay. However, the regulatory effect of AUF1 on the expression of inflammatory factor mRNA in teleost fish remains unknown. To investigate the regulation of fish AUF1 on the mRNA expression of inflammatory factors, the full-length cDNA of an AUF1 homologue, *LcAUF1*, was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), and its tissue-specific expression pattern and temporal expression in the spleen and kidney following *Vibrio parahaemolyticus* infection were investigated by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Additionally, the regulatory effect of *LcAUF1* on TNF- α mRNA expression was detected by overexpression of *LcAUF1* in RAW264.7 cells using a tetracycline-regulated expression system. The full-length cDNA of *LcAUF1* was 1 413 bp in length, containing a 266 bp 5' untranslated region (5'UTR), a 294 bp 3'UTR, and a 954 bp open reading frame (ORF) encoding a polypeptide of 317 amino acids. Multiple alignment revealed that the amino acid sequences and typical functional domains of mammalian AUF1s are highly conserved in *LcAUF1*, and *LcAUF1* clusters with its homologues from other teleost fishes in the phylogenetic tree. In healthy large yellow croaker, *Lcauf1* transcripts were detected in all 9 tested tissues, with the highest level found in the muscle tissue. Upon *V. parahaemolyticus* challenge, the expression levels of *Lcauf1* were significantly down-regulated at 2 h (0.51-fold, $P < 0.01$) and 12 h (0.58-fold, $P < 0.001$) post-infection in the kidney, and at 24 h (0.39-fold, $P < 0.001$) in the spleen. In RAW264.7 cells, overexpression of *LcAUF1* significantly decreased the expression level of TNF- α mRNA at 0.5 (0.84-fold, $P < 0.01$), 3.0 (0.70-fold, $P < 0.001$) and 6.0 h (0.77-fold, $P < 0.01$) post LPS challenge. After inhibition of transcription by actinomycin D, overexpression of *LcAUF1* in RAW264.7 cells significantly increased the degradation rate of TNF- α mRNA, but had no significant effect on the degradation rate of β -Actin mRNA. These results collectively indicated the structure and function of AUF1 are highly conserved in vertebrates, and *LcAUF1* decreases the mRNA expression levels of inflammatory cytokine by promoting mRNA decay, suggesting that *LcAUF1* may be an important regulator of inflammatory responses during infection. This study provides reference data for further exploring the role of *LcAUF1* in the regulation of inflammatory cytokine expression and the application of *LcAUF1* in the prevention and control of infectious diseases in the large yellow croaker industry.

Key words: *Larimichthys crocea*; RNA binding protein; AU-rich element-binding factor 1, AUF1; mRNA decay; inflammatory cytokine

Corresponding author: SHEN Wang. E-mail: shenwang@zjou.edu.cn

Funding projects: Research Start-up Funding of Zhejiang Ocean University (2020); Key Project of Zhejiang Province Research and Development Plan (2020C02004)