



# 大黄鱼 DIGIRR 通过抑制 MyD88-NF- $\kappa$ B 的激活参与免疫调控

罗云江, 柳盈, 姚翠鸾\*

(集美大学水产学院, 海水养殖生物育种全国重点实验室, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 为研究大黄鱼双免疫球蛋白白细胞介素 1 受体相关分子 (double immunoglobulin interleukin-1 receptor-related molecule, DIGIRR) 在免疫反应中的作用, 本实验克隆了大黄鱼 *digirr* (*Lcdigirr*) 的编码区序列; 采用荧光定量 PCR (qPCR) 对大黄鱼各组织及免疫刺激后的脾脏、头肾等组织及大黄鱼肾细胞系 (LCK) 中的 *Lcdigirr* 表达情况进行了检测; 构建了重组表达质粒 pTurboGFP-DIGIRR 及 pcDNA3.1-DIGIRR, 分别以绿色荧光蛋白 (GFP) 为报告基因及双荧光素酶报告系统, 研究了 *LcDIGIRR* 的亚细胞定位及过表达后对 *NF- $\kappa$ B* 启动子活性的调控。结果显示, *Lcdigirr* 的开放读码框 (ORF) 包含 1 575 bp 核苷酸, 编码 524 个氨基酸, 理论分子量为 59.4 ku、等电点 (pI) 为 5.76, N 端包含 2 个免疫球蛋白 (Ig) 结构域、1 个跨膜区及 1 个 Toll/白细胞介素-1 受体 (TIR) 结构域, 属于保守的硬骨鱼类 DIGIRR 家族; qPCR 结果显示, *Lcdigirr* 在大黄鱼多组织均有表达, 其中在肠道中表达量最高; 采用变形假单胞菌及脂多糖 (LPS)、鞭毛蛋白、多聚肌-胞苷酸 [poly (I:C)] 等分别进行体内与体外刺激, 均可诱导其表达量显著增加; 亚细胞定位结果显示, *LcDIGIRR* 主要存在于细胞的膜质区; 过表达 *LcDIGIRR* 能够显著抑制 *nf- $\kappa$ b* 及 MyD88 介导的 *nf- $\kappa$ b* 的转录激活。综上表明, *Lcdigirr* 可能通过抑制 *nf- $\kappa$ b* 的转录激活, 在大黄鱼的免疫反应中发挥负调控作用。对于深入理解大黄鱼的免疫反应机制具有重要意义。

**关键词:** 大黄鱼; DIGIRR; 表达特征; 过表达; MyD88; NF- $\kappa$ B; 负调控

中图分类号: S 942

文献标志码: A

先天性免疫反应在鱼类抵抗水体中病毒、细菌、真菌、寄生虫等病原的侵染中发挥重要作用, 但是过度免疫反应可能导致免疫损伤并危害宿主健康。因此, 机体免疫反应中的负调控因子在调控过度免疫反应, 减少免疫损伤中扮演重要角色<sup>[1]</sup>。

Toll/白细胞介素-1 受体 (Toll/Interleukin 1 receptor, TIR) 超家族成员包含保守的 TIR 结构域,

作为跨膜蛋白, 广泛存在于各种类型的细胞膜或特定细胞器膜上<sup>[2-3]</sup>。基于膜外区的差异, TIR 超家族主要包括两类亚家族, 一类是富含亮氨酸丰富区 (rich in leucine repeats, LRR) 的 Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 亚家族, 通过髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖或非依赖途径, 识别不同病原中共有的病原相关分子模式 (pathogen associate molecular pattern,

收稿日期: 2024-02-26 修回日期: 2024-04-06

资助项目: 福建省自然科学基金 (2022J02043)

第一作者: 罗云江 (照片), 从事水产动物功能基因研究, E-mail: luoyunjiang97@foxmail.com

通信作者: 姚翠鸾, 从事水产动物分子免疫学研究, E-mail: clyao@jmu.edu.cn



PAMP), 防御各种病原侵袭并激活免疫, 成为抵抗外来病原入侵的第一道防线<sup>[2]</sup>; 另一类亚家族成员的膜外区主要包含免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 结构域, 包括白细胞介素 1 受体 I 与 II (IL-1RI 与 IL-1RII)、IL-18 受体 (IL18-R)、生长刺激表达基因 2 蛋白 (growth stimulation expressed gene 2, ST2)、单免疫球蛋白白细胞介素受体相关分子 (single immunoglobulin interleukin-1 receptor-related molecule, SIGIRR) 及双免疫球蛋白白细胞介素受体相关分子 (double immunoglobulin interleukin-1 receptor-related molecule, DIGIRR) 等, 在免疫反应中发挥多种重要作用<sup>[2-4]</sup>。

SIGIRR 与 DIGIRR 均属于含有 Ig 结构域的 TIR 超家族成员, 它们具有相似的分子结构, 均包含膜外的 Ig 结构域、1 个跨膜区及 1 个膜内的 TIR 结构域。其主要区别在于, 典型的 SIGIRR 的膜外区通常只包含一个 Ig 结构域, 而 DIGIRR 包含 2 个 Ig 结构域<sup>[4-6]</sup>。哺乳动物及鱼类中发现的 SIGIRR 在抑制 TLR 信号途径中发挥重要作用<sup>[7-11]</sup>。鱼类中鉴定的 DIGIRR 也主要通过负调控 IL-1 信号途径在机体的免疫反应中发挥重要作用, 但目前尚未在哺乳动物中发现 DIGIRR 的存在<sup>[12]</sup>。有研究推测, 鱼类的 DIGIRR 可能与 SIGIRR 起源于共同的祖先<sup>[12]</sup>, 但是对其结构与功能的研究还不够深入。随着测序技术的发展, 研究者获得了不同物种的海量基因组数据。由于哺乳动物中可能缺乏含有 2 个 Ig 结构域的 DIGIRR<sup>[12]</sup>, 因此, 对不同鱼类中存在的含有两个 Ig 结构域的白细胞介素受体相关分子, 在基因组数据库中常常被注释为 SIGIRR 或 DIGIRR, 也不统一<sup>[7-14]</sup>。

研究者克隆了绿河鲶 (*Tetraodon nigroviridis*)、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 等模式鱼中含有 2 个 Ig 结构域的 *digirr* 基因序列, 研究表明, 它们结构较为保守, 可以通过抑制脂多糖 (LPS) 及 IL-1 $\beta$  诱导的斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎中 *nf- $\kappa$ b* (核因子激活的 B 细胞的  $\kappa$ -轻链增强子) 的激活, 在免疫反应中发挥重要的负调控作用<sup>[12]</sup>。近年有研究表明, 鲢 (*Miichthys miui*) 的 DIGIRR 在负调控 LPS 诱导 NF- $\kappa$ B 的激活中发挥重要作用<sup>[13]</sup>; 卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) DIGIRR 可与 MyD88 相互作用, 抑制免疫反应的过度激活<sup>[14]</sup>。但目前关于其他鱼类 DIGIRR 的结构、功能及调控机制的研究还较少。

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国海水网箱

养殖量最大的经济鱼类。但近年来细菌、病毒、寄生虫等感染引起的病害问题也严重制约着大黄鱼养殖业的健康发展。前期的研究表明, 依赖 MyD88 的 Toll 样受体信号通路在大黄鱼的免疫识别与激活中发挥重要作用<sup>[15-16]</sup>。但过度的免疫反应可能会导致机体严重损伤<sup>[17]</sup>, 因此, 负调节因子在调控过度免疫反应、维持机体免疫稳态中发挥重要作用。

本研究克隆了大黄鱼 *digirr* (*Lcdigirr*) 的 cDNA 序列, 分析了其分子结构特征; 检测了其在大黄鱼组织及免疫反应中的时空表达变化; 通过亚细胞定位揭示了 *LcDIGIRR* 在细胞内的分布; 并通过对 *LcDIGIRR* 进行过表达, 研究了其对 *nf- $\kappa$ b* 和 MyD88 介导的 *nf- $\kappa$ b* 启动子的调控作用, 研究结果将为揭示 *Lcdigirr* 在大黄鱼先天性免疫中的作用提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验大黄鱼、细胞系及免疫刺激

实验用大黄鱼幼鱼 [体重 ( $75.2 \pm 20.8$ ) g, 体长 ( $18.7 \pm 2.3$ ) cm] 购自福建宁德的一家大黄鱼养殖场。在实验室暂养 1 周后进行实验 (密度 40 尾/m<sup>3</sup>, 温度 25 °C, 盐度 26)。采用丁香酚对大黄鱼麻醉后, 断尾取血, 将血液与抗凝剂按 1:1 混合 (体积比)<sup>[15]</sup>, 4 °C 800  $\times$  g 离心 5 min 收集血细胞; 对大黄鱼进行解剖, 取肌肉、鳃、皮肤、肝脏、脾脏、心脏、肾脏、胃、肠、头肾及脑等组织并立即置于液氮中, 随后置 -80 °C 保存, 用于总 RNA 提取及基因的组织表达分析。所有组织样本均取自 6 尾鱼 ( $n=6$ )。本研究获得了集美大学科技伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守集美大学科技伦理委员会规定的对实验动物处理及处置的伦理规范, 并按照集美大学科技伦理委员会制定的规章制度执行。

实验用人胚胎肾细胞系 (HEK293T) 与大黄鱼肾细胞 (LCK, 来源于大黄鱼肾脏细胞) 细胞株均购自中国典型培养物保藏中心 (武汉), HEK293T 细胞采用 DMEM 培养基于 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱常规培养; LCK 细胞采用 DME-F/12 培养基于 28 °C CO<sub>2</sub> 培养箱进行培养。

体内免疫刺激 将 200  $\mu$ L 溶于磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 的变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 对大黄鱼进行腹腔注射 (终浓度  $1 \times 10^5$

CFU/mL), 以同体积 PBS 为对照。分别在注射后 0、3、6、12、24 及 48 h 收集包括脾脏、头肾、皮肤、鳃、小肠与肝脏等免疫相关组织 ( $n=6$ ),  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 用于总 RNA 提取及免疫诱导后基因表达变化分析。

**体外免疫刺激** 免疫刺激采用病原模拟物 LPS (L2 630, Sigma, 美国), 鞭毛蛋白 [Flagellin (FliC), SRP8 029, Sigma, 美国] 及多聚肌-胞苷酸 [poly (I:C), P1 530, Sigma, 美国], 加入 LCK 细胞培养液对其进行免疫刺激。具体操作: 将数量为  $1\times 10^6\sim 2\times 10^6$  的 LCK 细胞传至 6 孔细胞培养板, 培养 24 h 待其贴壁后, 分别加入  $10\text{ }\mu\text{L}$  溶于 PBS 的上述病原模拟物进行免疫刺激, LPS、FliC 及 poly (I:C) 的终浓度分别为 5、1 和  $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ , 细胞加入等体积的 PBS 为对照<sup>[17]</sup>。在免疫刺激后 6、12、24 和 48 h 分别取样 ( $n=3$ ), 加入  $500\text{ }\mu\text{L}$ /孔 RNA 裂解液冰上裂解细胞后  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 用于 *Lcdigirr* 的表达变化分析。

## 1.2 RNA 提取及 cDNA 的合成

总 RNA 提取按照说明书进行 (Easstep<sup>®</sup> Super Total RNA Extraction Kit, Promega, 美国), 采用 Nanodrop 测定 RNA 浓度, 对其进行定量后, 取  $1\text{ }\mu\text{g}$  总 RNA 进行反转录及 cDNA 第一链的合成, 具体操作按照说明书进行 (GoScript<sup>™</sup> Reverse Transcription System GoScript<sup>™</sup> Reverse Transcription System, Promega, 美国)。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用于目的基因的克隆及实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析。

## 1.3 大黄鱼 *digirr* 基因的克隆及序列分析

根据本实验室测得的大黄鱼转录组数据库, 设计引物 pcDNA3.1-DIGIRR-F 和 pcDNA3.1-DIGIRR-R (表 1)。以大黄鱼组织 cDNA 为模板, 退火温度  $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ , PCR 扩增 *Lcdigirr* 的编码区序列, 测序验证后进行下一步分析及实验。

表 1 本研究所用的引物

Tab. 1 Primers used in this study

| 引物名<br>primers     | 序列 (5'-3')<br>sequences (5'-3') | 目的<br>purpose                                  |
|--------------------|---------------------------------|--|
| pcDNA3.1-DIGIRR-F  | <i>GAATTC</i> GTATGTCCTCCTCAGT  | cDNA 克隆及过表达<br>cDNA cloning and overexpression |
| pcDNA3.1-DIGIRR-R  | <i>CTCGAG</i> ATGGCTGTGATTTTAG  |  |
| qDIGIRR-F          | GCAGGTGCTCTATGTGGG              | 定量PCR<br>qPCR                                  |
| qDIGIRR-R          | GATTGGTGAGGGGTTGGT              |  |
| q $\beta$ -actin-F | TTACTCCTTCACCACCACAG            |  |
| q $\beta$ -actin-R | ATCCGCAAGATTCCATAC              |  |
| pT-DIGIRR-F        | <i>CTCGAG</i> ATGGCTGTGATTTTAG  | 亚细胞定位<br>subcellular localization              |
| pT-DIGIRR-R        | <i>GAATTC</i> GTATGTCCTCCTCAGT  |  |

注: 斜体分别为 *Xho* I、*Eco*R I 酶切位点。

Notes: Letters in italics represent *Xho* I and *Eco*R I digestion sites.

序列同源性比对采用 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析, 推测的氨基酸序列、理论分子量、理论等电点 (pI) 及三级结构的预测采用 EXPASY (<https://www.expasy.org>) 及 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 网站在线进行分析。来源于不同物种的 DIGIRR 的序列从 NCBI 获得。DIGIRR 氨基酸序列的多重比对采用 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 进行, 进化树采用 MEGA11.0 软件, 用邻位相连法构建 (置信值 1 000)。

## 1.4 组织表达和免疫刺激后的表达分析

以大黄鱼不同组织的 cDNA 为模板, 采用

qPCR 检测 *Lcdigirr* 在不同组织中的表达特征; 以免疫刺激后不同时间的脾脏、头肾、皮肤、鳃、小肠、肝脏及 LCK 细胞 cDNA 为模板, 检测免疫刺激后 *Lcdigirr* 的表达变化。PCR 体系及扩增程序参考 Bao 等<sup>[18]</sup> 的方法, 以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 所用基因特异性引物 qDIGIRR-F、qDIGIRR-R 及内参基因引物 q $\beta$ -actin-F 与 q $\beta$ -actin-R 序列见表 1, *Lcdigirr* 在转录水平的表达量通过  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算<sup>[19]</sup>。

## 1.5 质粒构建

亚细胞定位质粒的构建: 利用正反向引物 pT-DIGIRR-F/R (表 1), 将不含有终止密码子的 *Lcdigirr* 的编码序列克隆到 pTurboGFP-N 载体中

(Evrogen, 俄罗斯), 构建重组表达质粒 pTurboGFP-DIGIRR, 测序验证后用于后续的亚细胞定位研究。

过表达质粒的构建: 以 pcDNA3.1-SIGIRR-F/R 为正反向引物, 将不含有终止密码子的 *Lcdigirr* 的编码序列克隆至 pcDNA3.1/myc-His(-)A 载体 (Invitrogen, 美国) 中, 构建重组表达质粒 pcDNA3.1-DIGIRR, 测序验证后用于过表达分析基因的转录调控功能。

### 1.6 *LcDIGIRR* 的亚细胞定位

将数量约为  $3 \times 10^5$  个/mL 的 HEK293T 细胞传至 6 孔板,  $37^\circ\text{C}$  培养 20 h 后, 每孔加入 2  $\mu\text{g}$  的 pTurboGFP-DIGIRR 质粒, 以表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的质粒 pTurboGFP-N 作为对照, 具体转染方法按照 Lipofectamine (Lipo) 3 000 (Invitrogen, 美国) 说明书进行。转染 24 h 后加入 Hoechst 33 342 (Sigma, 美国) 室温染色 15 min。使用激光共聚焦显微镜 (Leica, 德国) 采集图像。

转染后目的基因的表达采用免疫印迹 (Western blot) 进行验证。具体操作: 收集转染 24 h 的细胞, 采用 RIPA 裂解液对细胞进行裂解, 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质, 转印至 PVDF 膜, Western blot 验证融合蛋白 *LcSIGIRR*-GFP 的表达, 一抗为 anti-GFP 抗体 (AG279), 二抗为辣根过氧化物 (HRP) 标记的山羊抗兔抗体 (A0 208), 所有抗体均购自碧云天生物技术有限公司, 采用 ECL (Advansta, 美国) 进行显色, 显色结果使用 Image-Quant Las 4 000 mini 成像系统观察及拍照 (GE, 美国)。

### 1.7 过表达及双荧光素酶报告系统检测 NF- $\kappa$ B 活性

转染及过表达 将 HEK293T 细胞以  $1 \times 10^5$  个细胞/孔的密度接种到 24 孔板中, 培养过夜使细胞贴壁。待细胞铺满培养板的 70%~80% 时, 分别将各 100 ng 的 pcDNA3.1/myc-His(-)A (空载对照)、过表达质粒 pcDNA3.1-*LcDIGIRR*、pcDNA3.1-*LcMyD88* (本室保存) 及 pcDNA3.1-*LcDIGIRR* 与 pcDNA3.1-*LcMyD88* 等量混合物, 与哺乳动物 NF- $\kappa$ B-luc 启动子报告质粒 (Clontech, 美国) 及 10 ng 的海肾荧光素酶内参质粒 pRL-TK (Promega, 美国) 共同转染细胞。转染试剂采用

Lipofectamine 3 000 (Promega, 美国), 具体操作按说明书进行。*LcDIGIRR* 重组目的蛋白的表达采用 Western blot 验证, 方法同上。一抗为 anti-C-myc 单克隆抗体 (AM926, 碧云天), 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠抗体 (A0216, 碧云天)。

双荧光素酶报告系统检测 NF- $\kappa$ B 启动子活性 按照 Promega 双荧光素酶检测试剂盒说明书, 收集转染后的细胞裂解产物。荧光素酶活性采用荧光素 GloMax<sup>®</sup>20/20 生物/化学发光检测仪 (Promega, 美国) 进行测定, 以海肾荧光素酶活性进行标准化, 计算 NF- $\kappa$ B 报告子的荧光素酶活性。

### 1.8 统计学分析

*Lcdigirr* 基因在不同组织中的表达水平及表达变化来自 6 个独立的生物学样本 ( $n=6$ ); 其他实验如果没有特别说明均采用 3 个生物学重复 ( $n=3$ )。所有的数据以平均值 $\pm$ 标准误 (mean  $\pm$  SE) 表示。实验组与对照组之间的组间比较采用 student's *t* 检验, 数据分析采用 SPSS S (15.0 版),  $P < 0.05$  与  $P < 0.01$  分别设定为差异显著 (\*) 及差异极显著 (\*\*), 采用 GraphPad Prism (9.0) 作图。

## 2 结果

### 2.1 *Lcdigirr* 基因的 cDNA 序列分析

测序结果显示, 本实验克隆的目的条带大小为 1 575 bp。BLSAT 分析显示, 该基因与来源于硬骨鱼类的 DIGIRR 及 SIGIRR 序列相似度为 45%~94%, 表明所获序列为大黄鱼的 *digirr*。

序列分析表明, 所得的 *Lcdigirr* 基因编码 524 个氨基酸 (aa)。预测的理论分子量 59.4 ku, 理论等电点 (pI) 为 5.76。SMART 对蛋白结构分析显示, 预测的 *LcDIGIRR* 蛋白质 N 末端包含 2 个 Ig 结构域, 分别位于 33~116 aa 及 138~221 aa, 1 个跨膜区位于 233~255 aa, 以及位于 C 端的 1 个胞内的 TIR 结构域 (279~425 aa)(图 1)。

SMART 结构分析及 ClustalW 多重比对表明, 预测的 *LcDIGIRR* 蛋白序列与来自卵形鲳鲷、三刺鱼、红鳍东方鲀、绿河鲀的 DIGIRR 具有相似的结构 (图 2-a), 与它们的序列相似性分别为 79.77%、73.41%、72.68%、68.19%。其中, TIR 结构域保守性较高, 但是 2 个 Ig 结构域保守性较低。与人的 SIGIRR 的序列相似性仅为 27.81%

```

1 atggctgtgattttagtcgctctcttatttgggtgcactgttgaatgggacaagatttattcgacgcgctcagctcctgtgtggatgagagcaagtttaaggagcaggtgctctatgtg 120
I M A V I L V A L L L V C T V E W D K S L F A A A Q S C V D E S K F K E Q V L Y V 40
121 gggcagcagtgccctccatcggctgaactgccctctggagctgtccagctccagagctcaccgccactcaagctgacctggcagaagactgtcagcagttccccaccaggaagg 240
41 G Q Q W P P Y R L N C P L E L V Q S Q S S P Q L K L T W Q K D C Q Q F P T Q E G 80
241 aaggcctacgtggagtttggcagcctcagctccaagaccaaggaattacacctgtgtgcaacagggcaacagcacaacctcattcacagtgcgtctcatagttaaagagtcaccagtc 360
81 K A Y V E F A S L S F Q D Q G N Y T C V Q Q G N S T T S F T V R L I V K E S Q C 120
361 tccaaagccagagtttaaaccaatgggaatctgactagactcgggagaaatgttggatccacgtgatactgaactgctcctcctctctgggaccaaaagagaagaatgt 480
121 S K A P E F K P N G N L T R L G R N V G S T V I L N C S A L L F W D P K E K Q C 160
481 gacaccagctgcagtgagtaaatgaccaaccctccaatcacacctttacacgataatattctctatggctcctgttgcggccagctgatgtaaacagctgctggag 600
161 D T T L Q W S K D D Q P L T N H T L Y T H N I F S W S P V A G Q L M V N S L L E 200
601 atcaccctcaggagctggagcactttgggctctacagttgctgcagtgaggaaactttcctctgatttcagcttagacaattcaagctaccagccacacggctgctgttattgcagcc 720
201 I T L R E L D D F G L Y S C A V R N V S S D F S L D N S S V P S H T A A V I A A 240
721 atcatcctcctctgttactgagtatagctgctgtctgttctccagtgctcacctaaatatacaactgtgttacagaaacacctacggagactgaactcaatgatggcaaatatata 840
241 I I L L L L L S I A A V V F S Q C H L N I K L W Y R N T Y G D Y E L N D G K L Y 280
841 gatgcctatactcgtactgaacaacgacctgacaggaagtttgcactttattctcaaacctcacctggagataaaaaatgcatacaagtgcatctcaatgtaaacgaaatccta 960
281 D A Y I S Y V N N D H D R K F V N F I L K P H L E N K N A Y K V H L N V N E I I 320
961 cctggctcagaacctctcggagctgctcatgaacataagtcgctctcggcgtctgactgctgctcctctatgcttaccttgagcagcagcggctgctgcaataactcagacagggc 1 080
321 P G S E P S A E L L M N I S R S R R L I V V L S Y A Y L E Q D R C C N N F R Q Q 360
1 081 cttctgactgttggagtatgtaagagtcaccctcctcatctgttagagggtcagtcacaacgcatgaggcctgaaatcaagcagcagctcagtgaaaccagcaccgctcactgta 1 200
361 L L H L L E L C K S P I L I M L E G Q S K R M R P E I K Q Q L S E H Q H R L T V 400
1201 cttacctggaggtacaactcctgactcctcctcagctcttctgggaaggagctggccttagcagatgcctcgcacaaagctgcttttcgagtgagctgttagtgacccctcagactatgta 1 320
401 L T W R Y N S V T P S S V F W K E L A L A M P R K V V F R S E S V G D P Q T M L 440
1 321 caagatgacaaggaccatgctgacctcaacccgactacctagactgccgctcagacagcggacctgctggagatctagggttcgctcctctgtgtacaagccatgacctgtaaa 1 440
441 Q D D K D P M L T L N P D Y L D C R S D T D P A G D L G L R L P V Y K A M T C K 480
1 441 gccctgtcctcctcctgctaccatgaatgcagctgagcccaaacctgtggacatcagctgtcggacctggggtcacgtaactatggagcccgtcagacttctactgctggtgact 1 560
481 A P V L P P A T M N A A E P K P V D I D V S D L G S R N Y G A R S D F Y C L V T 520
1 561 gaggagcatatga 1575
521 E E D I * 524

```

图1 *Lcdigirr* 基因的 cDNA 及预测的蛋白质序列

*Lcdigirr* 基因 cDNA 及预测的氨基酸序列, atg 为起始密码子, tga 为终止密码子; 单下划线为预测的 2 个 Ig 结构域, 分别位于 33~116 aa 及 138~221 aa, 双下划线为跨膜区 (233~255 aa), 方框内为 TIR 结构域, 位于 279~425 aa。

Fig. 1 The cDNA sequence of and predicted amino acid sequence of *Lcdigirr*

The cDNA and predicted protein sequence of *Lcdigirr*, the start code atg and stop code tga are bolded, the two predicted Ig domains (33-116 aa and 233-255 aa) are single underlined, the transmembrane region is double underlined (233-255 aa), the C-terminal TIR domain (279-425 aa) is boxed.

(图 2-b)。

进化分析表明, 来源于大黄鱼的 DIGIRR 与来自其他鱼类的 SIGIRR 及 DIGIRR 具有更近的进化关系, 并聚为一个亚组, 其中与预测的棘头梅童鱼 (*Collichthys lucidus*) 的 SIGIRR 进化关系最近; 来自两栖类、爬行类、鸟类、哺乳类等动物的 SIGIRR 分别在其相应的进化支, 并聚为另一个亚组 (图 3)。

### 2.2 *Lcdigirr* 的组织表达

荧光定量 PCR 分析结果表明, *Lcdigirr* 在所检测的 12 个大黄鱼组织中广泛存在, 其中在肠道中的表达量最高, 肝脏、头肾和脾脏次之, 在心脏中的表达量最低 (图 4)。

### 2.3 免疫刺激后 *Lcdigirr* 的表达变化

受到变形假单胞菌刺激后, 在所检测的脾脏、

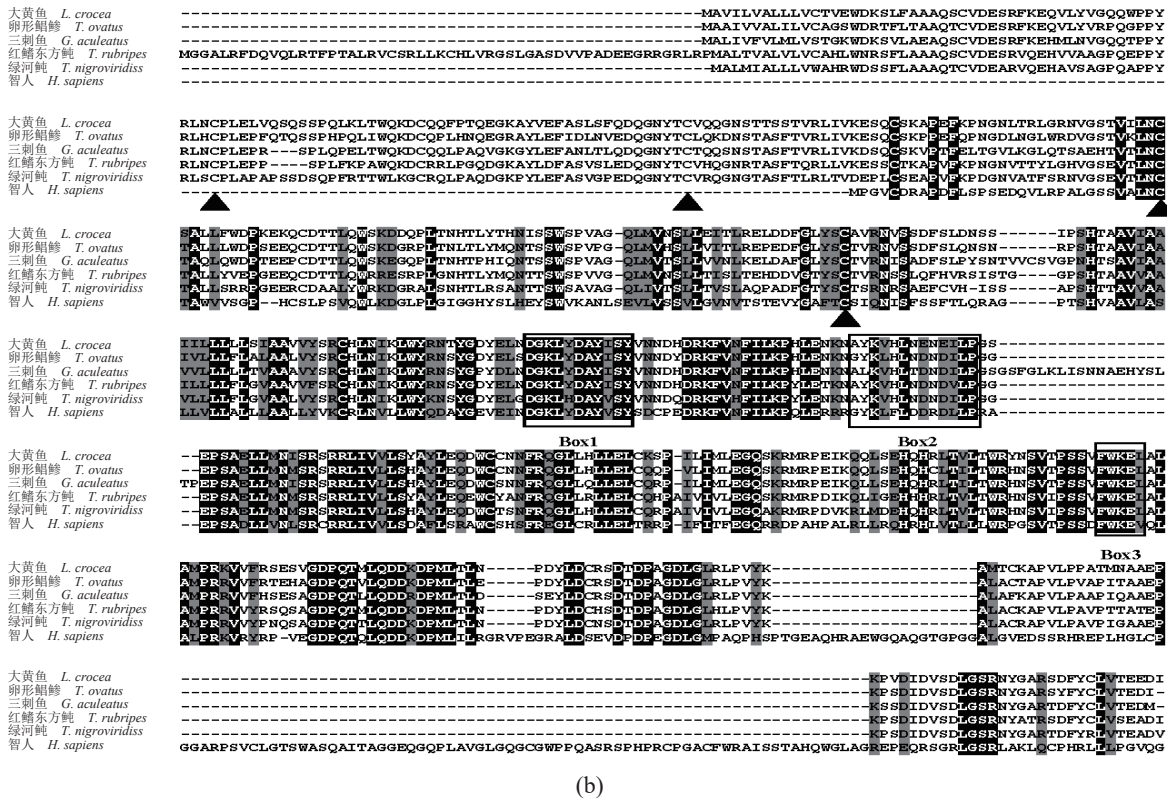
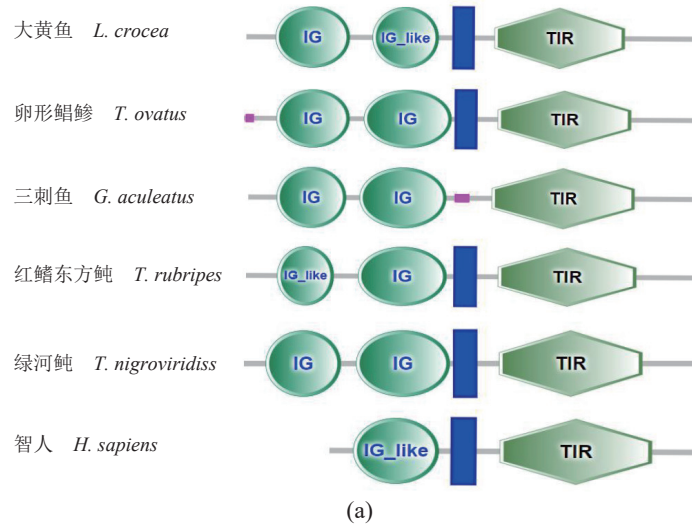


图 2 DIGIRR 的结构及多重序列比对

(a) SMART 在线分析预测的 *LcDIGIRR* 的主要结构域; (b) 来源于不同硬骨鱼及人类的预测的 DIGIRR 蛋白质序列的多重比对; *LcDIGIRR* 与来源于卵形鲳鲹 (MW239681)、红鳍东方鲀 (EU305619.1)、三刺鱼 (EU360722.1)、绿河鲀 (EF095151.1) 的 DIGIRR、及智人 (NP\_001128525.1) 的 SIGIRR 的氨基酸序列的多重序列比对, 3 个 TIR 结构域的保守基序 (Box1、Box2 和 Box3) 用实线框出, 黑色三角形表示半胱氨酸预计会形成一个类似于 Ig 的结构域的二硫键。

Fig. 2 DIGIRR multiplex sequence alignment

(a) the predicted domains of *LcDIGIRR* by SMART. (b) multiple analysis of predicted DIGIRR from teleosts and SIGIRR from human; the sequences used in the study were from *T. ovatus* (MW239681), *T. rubripes* (EU305619.1), *G. aculeatus* (EU360722.1), *T. nigroviridis* (EF095151.1) and *H. sapiens* (NP\_001128525.1), three conserved motifs (Box1, Box2, and Box3) in TIR domain are boxed out in solid lines, and black triangles indicate cysteines predicted to form the disulfide bonds of an Ig-like domain fold.

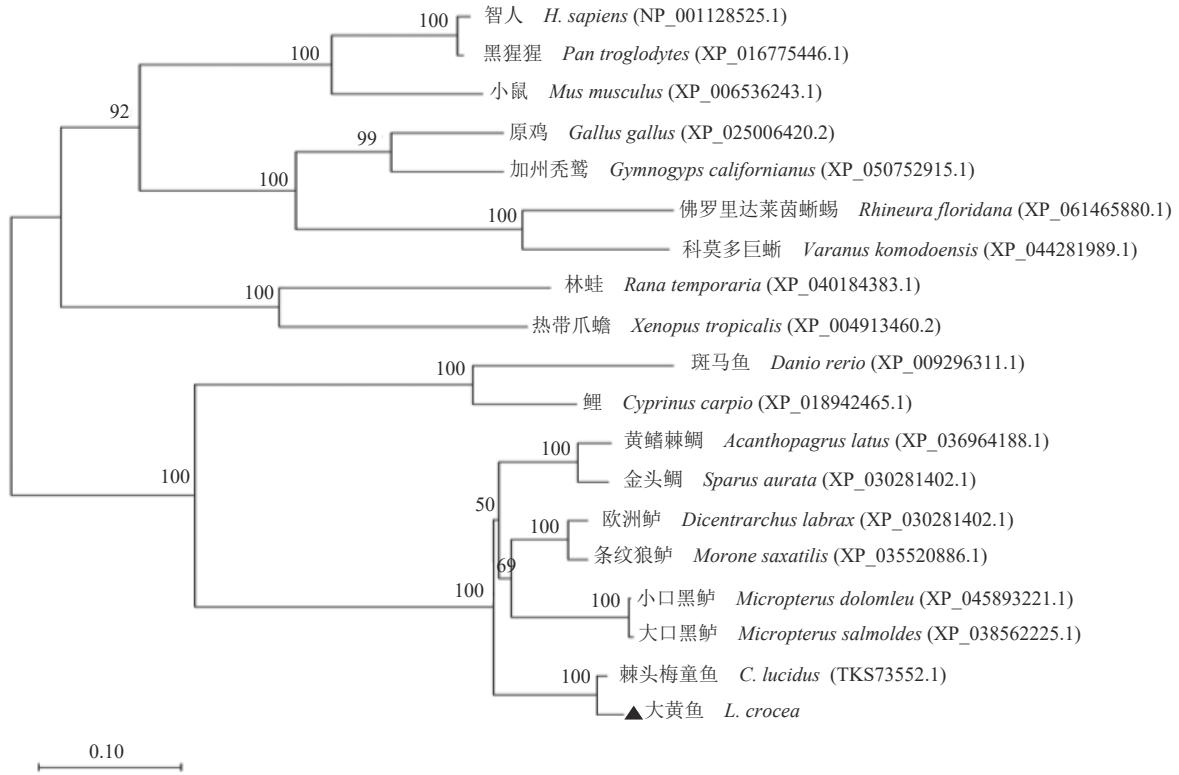


图 3 DIGIRR 系统进化树的构建

Fig. 3 Phylogenetic tree construction of DIGIRR

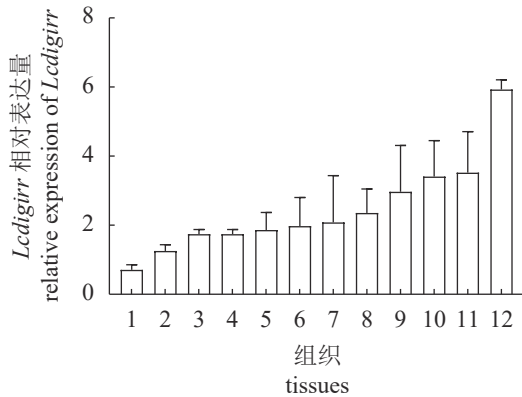


图 4 *Lcdigirr* 基因在大黄鱼不同组织中的表达分析

1. 心, 2. 脑, 3. 血, 4. 鳃, 5. 胃, 6. 肾脏, 7. 肌肉, 8. 皮肤, 9. 脾脏, 10. 头肾, 11. 肝脏, 12. 肠。

Fig. 4 The transcriptional expression of *Lcdigirr* in different tissues of *L. crocea*

1. heart, 2. brain, 3. blood, 4. gill, 5. stomach, 6. kidney, 7. muscle, 8. skin, 9. spleen, 10. head-kidney, 11. liver, 12. intestine.

头肾、皮肤、鳃、肠道及肝脏组织中, *Lcdigirr* 的表达水平随时间均逐渐上升, 并在免疫刺激后 12 h 达到最高值 ( $P < 0.05$ )。其中, 受到病原刺激后, 肝脏中的 *Lcdigirr* 诱导率最高, 大约为对照组的 6 倍。随后逐渐下降, 除肠道稍高之外, 其余组

织中 *Lcdigirr* 的表达量均在 48 h 恢复至对照组水平 (图 5)。

体外实验表明, 受到 LPS、鞭毛蛋白与 poly I:C 刺激后, 在刺激早期 LCK 细胞中的 *Lcdigirr* 表达量也被显著诱导, LPS 与 poly I:C 刺激后, *Lcdigirr* 的表达水平在免疫诱导后 6 h 达到最高, 分别为对照组的 3.0 及 3.3 倍 ( $P < 0.01$ ); 当鞭毛蛋白刺激后, *Lcdigirr* 的表达量在刺激后 12 h 达到最高, 约为对照组的 31.7 倍 ( $P < 0.01$ )。随着时间的延长, 其表达量均逐渐下降, 在刺激后 48 h 分别约为对照组的 31%、47% 与 29% ( $P < 0.01$ ) (图 6)。

## 2.4 *LcDIGIRR* 的亚细胞定位

HEK293T 细胞在转染 pTurboGFP-DIGIRR 质粒 24 h 后, 采用激光扫描共聚焦显微镜可以观察到绿色荧光主要聚集在细胞膜质区, 并在细胞质和细胞膜边缘上有连续分布现象。而转染 GFP pTurbo-GFP-N1 空载体的细胞 GFP 分布在细胞核及细胞质 (图 7-a)。转染相应质粒后, 采用 Western blot 对重组蛋白在 HEK293T 细胞中的表达分析验证结果显示, 对照组的 GFP 蛋白与包含目的

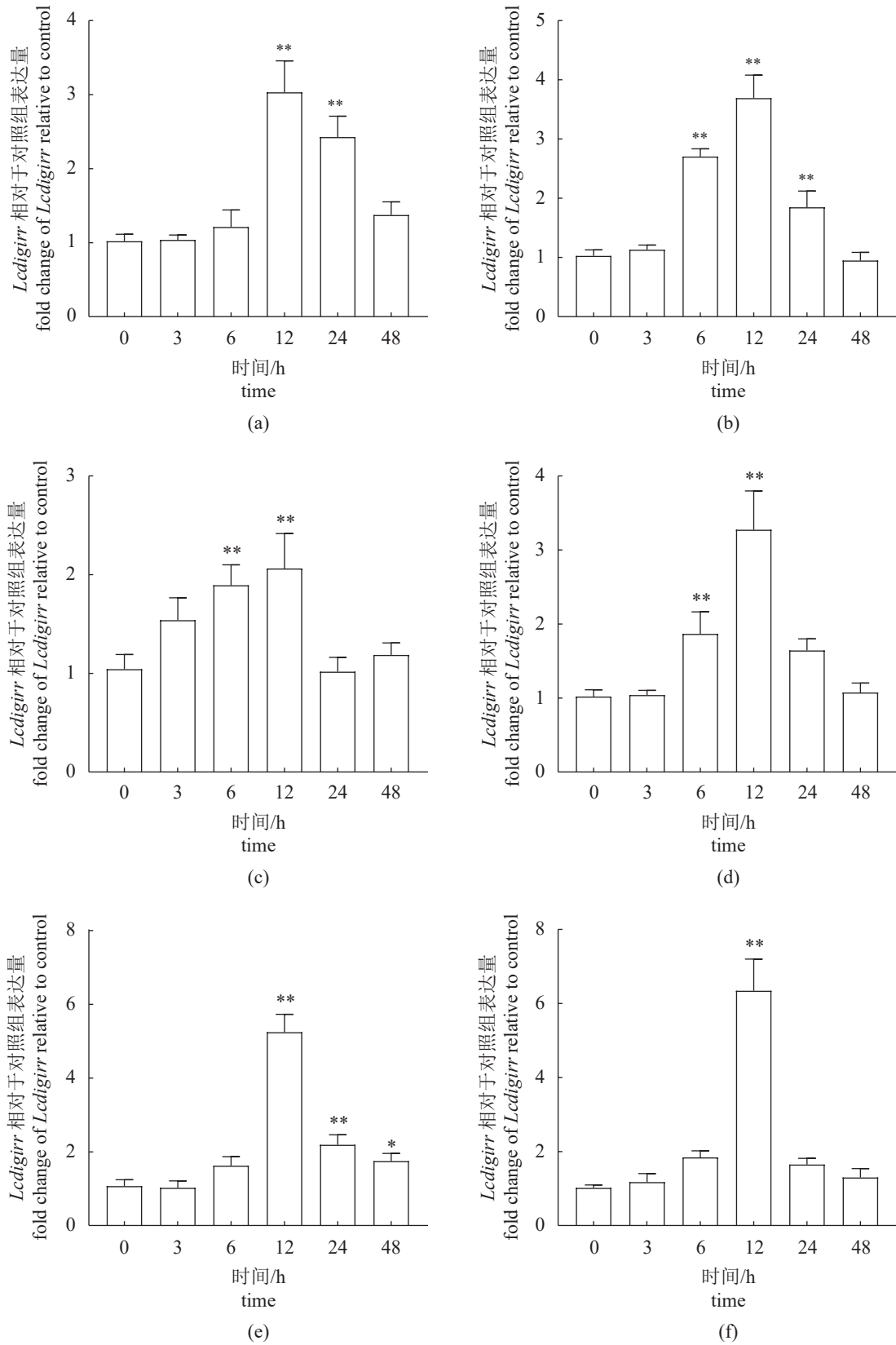


图5 *Lcdigirr* 在假单胞菌刺激后大黄鱼不同组织中的转录表达分析

(a) 脾脏, (b) 头肾, (c) 皮肤, (d) 鳃, (e) 肠道, (f) 肝脏。

Fig. 5 The transcriptional expression analysis of *Lcdigirr* in different tissues of *L. crocea* after *P. plecoglossicida* stimulation

(a) spleen, (b) head-kidney, (c) skin, (d) gill, (e) intestine, (f) liver.



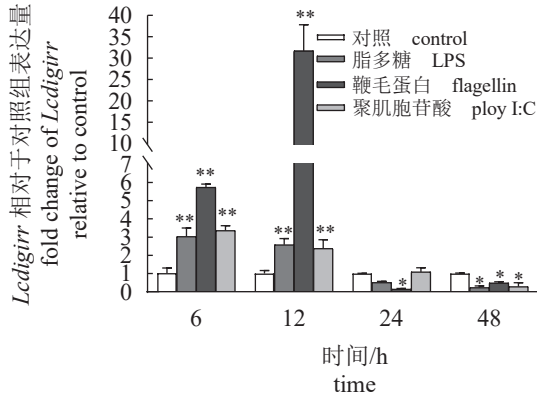


图 6 免疫刺激后 *Lcdigirr* 在 LCK 细胞中的表达变化  
 Fig. 6 The expression levels of *Lcdigirr* in LCK cell after immune challenge

基因的重组融合蛋白 GFP-DIGIRR 分别在 26 和 84 ku 处显示单一特异性条带, 与预期分子量大小一致, 表明 *LcDIGIRR* 在 HEK293T 细胞中成功表达 (图 7-b)。

### 2.5 *LcDIGIRR* 过表达对 *nf-κb* 启动子的影响

双荧光素酶报告系统检测表明, 将包含目的基因的重组质粒 pcDNA3.1-DIGIRR 转染 HEK293T 细胞, *LcDIGIRR* 在细胞中过表达导致 *nf-κb* 启动子活性的极显著降低, 仅为对照组的 50% ( $P < 0.01$ )。过表达 *LcMyD88* 则引起 *nf-κb* 启动子活性

的显著增加, 为对照组的 190 倍 ( $P < 0.01$ )。另外, 共表达 *LcDIGIRR* 与 *LcMyD88* 则会导致 *MyD88* 介导的 *nf-κb* 启动子活性的显著下降 ( $P < 0.05$ ) (图 8-a)。

Western blot 验证结果显示, 在转染 pcDNA3.1-DIGIRR 的 HEK293T 细胞中检测到分子量约为 59 ku 的特异性条带, 与预测的 *LcDIGIRR*-myc 重组融合蛋白分子量相符, 表明 *LcDIGIRR* 重组蛋白得到成功表达 (图 8-b)。

### 3 讨论

本研究获得的 *Lcdigirr* 包含 2 个 N 端的 Ig 结构域、1 个跨膜结构域以及 1 个 C 端的 TIR 结构域 (图 1, 图 2), 与来源于鳃、卵形鲳鲹、三刺鱼、红鳍东方鲀等硬骨鱼类的 DIGIRR 具有相似的一级及高级结构 [12-14]。在哺乳动物中, 这类基因的经典结构在 N 端只包含 1 个 Ig 结构域, 因此称为 SIGIRR [5-8], 而鱼类中存在 N 端含有一个 Ig 结构域的 SIGIRR 与包含 2 个 Ig 结构域的 DIGIRR, 说明鱼类进化及基因组倍增过程中, 这类基因可能发生了分化。另一方面, 我们推测由于环境病原微生物的多样与复杂, 因此鱼类的先天性免疫分子的种类可能更为丰富, 以补偿其尚不完善的获得性免疫防御系统。

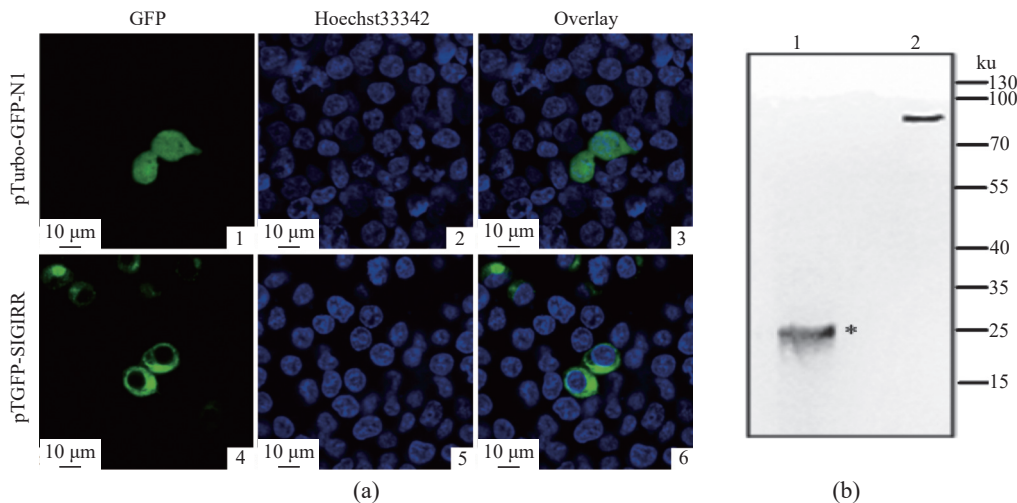


图 7 *LcDIGIRR* 在 HEK293T 细胞中的亚细胞定位

(a) *LcDIGIRR* 的亚细胞定位, 上面的 3 张图片为 GFP 对照, 下面的 3 张图片为 *LcDIGIRR*-GFP 重组融合蛋白在细胞内的分布, (b) Western blot 验证 *LcDIGIRR*-GFP 重组融合蛋白在细胞内的表达; 1. GFP 对照, 2. *LcDIGIRR*-GFP 重组融合蛋白。

Fig. 7 Subcellular localization of *LcDIGIRR* in HEK293T cells

(a) subcellular localization of *LcDIGIRR*. The 3 images on top are GFP controls, and the 3 images at bottom are intracellular distribution of *LcDIGIRR*-GFP recombinant fusion protein, (b) Western blot verification of the intracellular expression of *LcDIGIRR*-GFP recombinant fusion protein; 1. the GFP control, 2. the *LcDIGIRR*-GFP recombinant fusion protein.

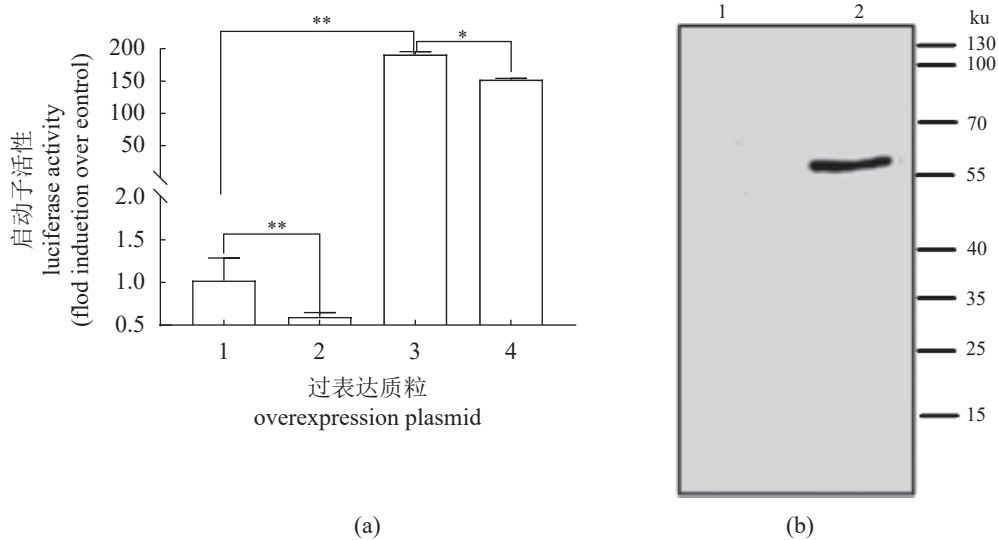


图 8 过表达 *LcDIGIRR* 对 *nf- $\kappa$ b* 启动子活性的影响

(a) 在 HEK293T 细胞中过表达 *LcDIGIRR* 对 *nf- $\kappa$ b* 启动子, 及 MyD88-介导的 *nf- $\kappa$ b* 启动子活性影响, 1. pcDNA3.1, 2. DIGIRR, 3. MyD88, 4. DIGIRR+MyD88; “\*”表示显著差异 ( $P < 0.05$ ), “\*\*”表示极显著差异 ( $P < 0.01$ ); (b) Western blot 验证 *LcDIGIRR*-myc 重组蛋白的表达: 1. 转染空白质粒 pcDNA3.1 的 HEK293T 细胞, 2. 转染 pcDNA3.1-DIGIRR 的 HEK293T 细胞, 所用一抗为 anti-C-myc 单克隆抗体。

Fig. 8 The effect of overexpression of *LcDIGIRR* on luciferase of *nf- $\kappa$ b*

(a) the effect of overexpression of *LcDIGIRR* on luciferase of *nf- $\kappa$ b*, and MyD88-mediated *nf- $\kappa$ b* activation, 1. pcDNA3.1, 2. DIGIRR, 3. MyD88, 4. DIGIRR+MyD88; asterisk “\*” and double asterisk “\*\*” represent significant ( $P < 0.05$ ) and extreme significant differences ( $P < 0.01$ ) between the compared groups, respectively; (b) the expression of recombinant *LcDIGIRR* protein is verified by Western blot with the primary antibody anti-C-myc monoclonal antibody, 1. the HEK293T cells transfected with plasmid pcDNA3.1-DIGIRR, 2. the HEK293T cells transfected with empty vector pcDNA3.1.

哺乳动物的 SIGIRR 可以通过抑制 NF- $\kappa$ B、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和 c-Jun 氨基酸末端激酶 (C-Jun N-terminal kinase, JNK) 等通路中关键分子的激活, 在免疫反应及多种信号传递的过程中发挥重要的负调控功能<sup>[5-8]</sup>。多重比对及进化分析显示, 来自不同物种的 SIDIRR 与 DIGIRR 分别聚到其相应的分支 (图 2, 图 3)。前人的研究表明, DIGIRR 与 SIGIRR 可能起源于一个共同的 IL-1R 样的分子, 在进化过程中, 该 IL-1R 丢失其胞外的 1 个或 2 个 Ig 结构域, 形成 DIGIRR 或 SIGIRR。DIGIRR 可能是 IL-R 与 SIGIRR 之间的“过度分子”, 代表了从受体分子到负调控分子之间的转换形式<sup>[12]</sup>。本研究所获得的大黄鱼 DIGIRR 具有 2 个 Ig 结构域, 可能是由于 IL-1R 丢失了 1 个 Ig 结构域所致, 也属于鱼类中存在的从受体 IL-1R 到负调控分子 SIGIRR 之间的过渡类型。

组织表达分析发现, *Lcdigirr* 在大黄鱼的多组织中均有表达, 其中在肠道、肝脏、头肾和脾脏等免疫相关器官或组织中表达量较高 (图 4)。研究表明, 来自卵形鲳鲹的 *digirr* 在肠道、肝脏

与头肾等组织中表达量较高<sup>[14]</sup>, 鳊的 *digirr* 也在肝脏等组织中表达量较高<sup>[13]</sup>, *sigirr* 缺陷型的小鼠更容易发生结肠炎<sup>[9]</sup>。上述结果提示, 不同种类硬骨鱼的 *digirr* 可能具有相似的表达特征, *Lcdigirr* 可能参与大黄鱼多种组织的免疫反应, 其中在肠道、肝脏和头肾中可能更为重要。

无论是在大黄鱼受到病原菌刺激后, 还是采用细菌及病毒来源的不同 PAMPs 刺激细胞后, *Lcdigirr* 的表达量均在早期表现出明显上调, 但是, 随着时间的延长, 其表达量逐渐下降 (图 5, 图 6)。受到病原菌、LPS、poly I:C 等刺激后, 卵形鲳鲹的 *digirr* 也可以被显著诱导<sup>[14]</sup>; 病原刺激所诱导的草鱼 *sigirr* 表达量也表现出随着刺激时间增长而逐渐下降的趋势<sup>[11]</sup>。这些结果说明 *LcDIGIRR* 可能在大黄鱼应对不同病原感染中均发挥重要作用, 特别是在免疫反应早期可能更为重要。

斑马鱼及哺乳动物的 SIGIRR 主要存在于细胞膜<sup>[6, 10]</sup>, 亚细胞定位显示, 卵形鲳鲹的 DIGIRR 主要存在于胞质<sup>[14]</sup>; 来源于绿河鲀、三刺鱼及红鳍东方鲀的 DIGIRR 主要存在于高尔基体膜上<sup>[12]</sup>, 但是目前关于其他鱼类 DIGIRR 的亚细胞定位研

究还不多见。本研究表明, *LcDIGIRR*-GFP 重组融合蛋白主要聚集在细胞的膜质区(图 7), 由于预测的 *LcDIGIRR* 的蛋白分子中存在跨膜结构, 因此, 我们推测大黄鱼的 *LcDIGIRR* 作为一个跨膜蛋白, 可能存在于细胞膜或高尔基体等特定的细胞器膜上, 但是更精细的定位需要结合对特定细胞结构的分离、特异性的细胞器标记染色或电镜观察等手段进一步研究。

单独过表达 *LcDIGIRR* 能够极显著抑制 *nf- $\kappa$ b* 启动子激活。同样, 过表达鳊的 *DIGIRR* 也可以显著抑制 *nf- $\kappa$ b* 的激活<sup>[13]</sup>。MyD88 作为 Toll 样受体介导的信号传导通路中的关键分子, 可以显著诱导 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[19-21]</sup>。本研究发现, *LcDIGIRR* 也可以显著抑制 MyD88 介导的 *nf- $\kappa$ b* 的激活。免疫共沉淀研究发现, 卵形鲳鲹的 *DIGIRR* 可以与 MyD88 直接相互作用<sup>[14]</sup>, 本研究表明, *LcDIGIRR* 不仅可以直接抑制 *nf- $\kappa$ b* 的激活, 也可以抑制 MyD88 介导的 *nf- $\kappa$ b* 的过度激活, 这种调控可能是通过与 MyD88 相互作用, 在抑制机体的过度炎症反应中发挥重要作用。

综上所述, 本研究表明大黄鱼 *digirr* 基因属于鱼类的 *digirr* 亚家族, 并具有该家族保守的结构特征。*Lcdigirr* 主要存在于大黄鱼的免疫组织, 并在调控细菌及病毒感染中可能发挥重要作用; *LcDIGIRR* 可以直接抑制 *nf- $\kappa$ b* 启动子活性, 也可以通过抑制 MyD88 介导的 *nf- $\kappa$ b* 的过度激活, 在大黄鱼免疫反应中发挥重要的负调控功能。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 783-801.
- [2] Bowie A, O'Neill L A J. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000, 67(4): 508-514.
- [3] Garlanda C, Dinarello C A, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future[J]. *Immunity*, 2013, 39(6): 1003-1018.
- [4] Boraschi D, Italiani P, Weil S, et al. The family of the interleukin-1 receptors[J]. *Immunological Reviews*, 2018, 281(1): 197-232.
- [5] Che Y Y, Shi X, Zhong X D, et al. Resveratrol prevents liver damage in MCD-induced steatohepatitis mice by promoting SIGIRR gene transcription[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2020, 82: 108400.
- [6] Wald D, Qin J Z, Zhao Z D, et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling[J]. *Nature Immunology*, 2003, 4(9): 920-927.
- [7] Yu W, Haque I, Venkatraman A, et al. SIGIRR mutation in human necrotizing enterocolitis (NEC) disrupts STAT3-dependent microRNA expression in neonatal gut[J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2022, 13(2): 425-440.
- [8] Thomassen E, Renshaw B R, Sims J E. Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily[J]. *Cytokine*, 1999, 11(6): 389-399.
- [9] Li X X, Qin J Z. SIGIRR/TIR8: a negative regulator of toll-IL-1R signaling[J]. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*, 2005, 4(1): 21-27.
- [10] Feng W, Gu Y F, Nie L, et al. Characterization of SIGIRR/IL-1R8 homolog from zebrafish provides new insights into its inhibitory role in hepatic inflammation[J]. *The Journal of Immunology*, 2016, 197(1): 151-167.
- [11] Gao J D, Jiang X Y, Wang J Y, et al. Phylogeny and expression modulation of interleukin 1 receptors in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 99: 103401.
- [12] Gu Y F, Fang Y, Jin Y, et al. Discovery of the DIGIRR gene from teleost fish: a novel Toll-IL-1 receptor family member serving as a negative regulator of IL-1 signaling[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(5): 2514-2530.
- [13] Zhou R X, Song W H, Liu X Z, et al. DIGIRR as a member of the toll/IL-1R family negative regulates NF- $\kappa$ B signaling pathway in miiuy croaker[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 100: 378-385.
- [14] Xie Y S, Gao S S, Cao Y W, et al. Molecular characterization and functional analysis of DIGIRR from golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 974310.
- [15] Huang X N, Wang Z Y, Yao C L. Characterization of Toll-like receptor 3 gene in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(1): 98-106.
- [16] Sun Q X, Huang X N, Pan Y, et al. Promoter analysis of TLR5M and TLR5S revealed NF- $\kappa$ B might be a conserved cis-element in TLR5S promoter of large yellow croaker[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*

- Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2022, 257: 110675.
- [17] Liew F Y, Xu D M, Brint E K, *et al.* Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses[J]. Nature Reviews Immunology, 2005, 5(6): 446-458.
- [18] Bao S Y, Sun Q X, Yao C L. The interaction of TAK1 and TAB1 enhances LPS-induced cytokine release via modulating NF- $\kappa$ B activation (*Larimichthys crocea*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 74: 450-458.
- [19] 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.
- [20] Li Y J, Yao C L. Tollip suppresses MyD88-mediated NF- $\kappa$ B activation by enhancing MyD88 ubiquitination levels in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 128: 455-465.
- [21] Tan Q, Yao C L. NEMO involves in NF- $\kappa$ B activation by interaction with p65 and promoting its nuclear translocation in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 134: 108637.

## LcDIGIRR is involved in immune response by suppressing MyD88-NF- $\kappa$ B activation in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

LUO Yunjiang, LIU Ying, YAO Cuiluan\*

(State Key Laboratory of Mariculture Breeding, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Double immunoglobulin interleukin-1 receptor-related molecule (DIGIRR) plays an important role in piscine immune response. To investigate the function of DIGIRR in immune response of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), the cDNA sequence of digirr was cloned, named *Lcdigirr*. Transcriptional expression levels of *Lcdigirr* in different tissues and immune challenged spleen, headkidney, skin, gill, intestine, and liver tissue and LCK cells (a kidney cell line from a large yellow croaker) were determined by real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR (qPCR). Then the recombinant plasmid pTurboGFP-DIGIRR was constructed and transfected into HEK293T cells for subcellular localization analysis. The role of LcDIGIRR in *nf- $\kappa$ B* activation was determined by transfecting the recombinant plasmid pcDNA3.1-DIGIRR into HEK293T cells using dual luciferase reporter system. Sequence analysis showed that the open reading frame (ORF) of *Lcdigirr* was 1,575 bp in length, encoding 524 amino acids. The LcDIGIRR protein contained two conserved N-terminal immunoglobulin (Ig) domains, a transmembrane region, and a typical C-terminal Toll/IL-1 receptor (TIR) domain. Multiple alignments suggested that DIGIRR was highly conserved among the analyzed species. Phylogenetic analysis showed that LcDIGIRR was clustered with bony fish DIGIRR and closely related to spiny-head croaker (*Collichthys lucidus*). Transcriptional expression analysis indicated that *Lcdigirr* was expressed in the examined tissues with the most predominant expression in intestine, followed by liver, head-kidney, and spleen. However, the expression of *Lcdigirr* in heart was very weak. After challenge with pathogenic *Pseudomonas plecoglossicida* *in vivo* and LPS, flagellin and poly (I:C) *in vitro*, *Lcdigirr* transcripts in main immune tissues and LCK cells were significantly induced at the early stage after stimulation ( $P < 0.05$ ). Subcellular localization revealed that LcDIGIRR mainly existed in membrane-cytoplasm. The luciferase activities of NF- $\kappa$ B and MyD88-mediated *nf- $\kappa$ B* were significantly suppressed by overexpression of LcDIGIRR. These findings indicated that *Lcdigirr* could negatively regulate *nf- $\kappa$ B* and MyD88-mediated *nf- $\kappa$ B* activation. The present study might be helpful for better understanding the function of LcDIGIRR in innate immune signaling transduction of large yellow croaker.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; DIGIRR; expression characterization; overexpression; MyD88; NF- $\kappa$ B; negative regulation

**Corresponding author:** YAO Cuiluan. E-mail: [clyao@jmu.edu.cn](mailto:clyao@jmu.edu.cn)

**Funding projects:** Key Program of Natural Science Foundation of Fujian Province (2022J02043)