

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)补体调节因子 CFH 和 CFHR2 基因的分子特征及表达分析*

郭宝英 张川 祁鹏志 张建设 管奥 陈宇 毋玉婷 吴常文

(浙江海洋学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022)

摘要 补体是鱼类免疫系统重要的组分,具有识别和消除外来病原体,激活免疫细胞,调控获得性免疫等功能。在免疫组织中,补体调节因子大约占据了补体成分的二分之一,当受到外界病原刺激时会迅速活化补体成分,并且进一步聚合形成酶复合物发挥一系列免疫效应。CFH 和 CFHR2 是补体替代途径重要的调节因子,对于补体系统正常运转必不可少。为此,本文测定了大黄鱼补体调节因子 CFH 和 CFHR2 基因的 cDNA 全序列,并对基因组织特异性表达和溶藻弧菌刺激后基因 mRNA 表达量的变化等方面进行了研究。CFH 和 CFHR2 序列全长分别为 1332 bp 和 1170 bp,分别编码 443 和 389 个氨基酸,N 端信号肽序列分别为 24 和 32 个氨基酸。推导的氨基酸序列结构分析表明大黄鱼 CFH 和 CFHR2 基因具有 RCA 蛋白家族的典型特征,即含有多个保守的 CCP 结构(补体控制蛋白)。实时荧光定量 PCR 结果显示,CFH 和 CFHR2 在健康大黄鱼的肝、脾、肾、肠、脑、胃、心和肌肉这 8 种组织中都有表达,其中肝脏的表达量显著高于其它几种组织。溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)侵染了健康的大黄鱼之后,CFH 和 CFHR2 的 mRNA 表达量均明显上调,并且随着感染时间的变化呈现不同的上升趋势。结果表明补体调节因子 mRNA 表达量的变化与溶藻弧菌的侵染密切相关,表明了 CFH 和 CFHR2 可能在大黄鱼自身免疫机制中发挥重要的作用。

关键词 大黄鱼(*Larimichthys crocea*); 大黄鱼补体调节因子 CFH; 大黄鱼补体调节因子 CFHR2; 分子特征; 表达分析

中图分类号 Q785; Q516 doi: 10.11693/hyhz20150300094

大黄鱼(*Larimichthys crocea*),隶属鲈形目、石首鱼科(Sciaenidae),俗称黄花鱼,曾广泛分布于中国东海、南海以及黄海南部。大黄鱼肉质细嫩、味道鲜美,是我国沿海传统“四大海产”之一。由于野生资源衰竭,大黄鱼人工养殖业发展迅速,养殖主要集中于浙江、广东和福建等沿海地区。大黄鱼现已发展成为我国海水网箱养殖量最大的鱼种,经济效益巨大(张彩兰等, 2002; Zheng *et al.*, 2006)。近年来,由弧菌属细菌引起弧菌病呈爆发趋势。该病发病迅速、传播速度快、流行时间长、死亡率高(金珊等, 2005),对大黄鱼养殖业造成严重冲击。实际生产中,常用抗生素及化学药物

来预防治疗该病,虽然防治效果明显,但会导致耐药性增加,药物残留等一系列不良效果。近年来研究人员试图通过提高大黄鱼自身免疫力来防御病害侵袭,而这需要在深入阐释大黄鱼免疫调控机制的基础上进行。目前,已有相当数量的大黄鱼免疫相关基因被发现,其参与疾病发生的响应模式也被陆续鉴定(Wang *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014),大黄鱼基因组测序也已完成(Wu *et al.*, 2014; Ao *et al.*, 2015)。这些研究为最终阐释大黄鱼响应疾病发生的免疫调节机制提供了理论基础。

* 国家高技术研究发展计划(863 计划), 2012AA10A403 号; 浙江省水产新品种选育重大科技专项, 2012C12907 号; 浙江省自然科学基金项目, Y14C190008 号; 舟山市科技计划项目, 2013C41001 号; 海洋科学浙江省重中之重学科开放课题, 20130101 号。郭宝英, 副教授, E-mail: guobaoying@zjou.edu.cn

收稿日期: 2015-03-28, 收修改稿日期: 2015-10-31

补体是鱼类免疫系统重要的组分,在免疫组织中,约有二分之一的补体成分作为调节因子存在的,而其中大部分都存在于血清和细胞表面中。当受到病原体刺激后,补体各成分依赖于一系列丝氨酸蛋白酶的酶解级联反应被活化,产生具有生物活性的多肽片段,聚合形成具有酶活性的复合体,发挥识别和消除外来病原体,辅助吞噬、裂解细胞,免疫调节等作用。同哺乳动物类似,鱼类补体系统可通过经典途径、旁路途径、凝集素途径被激活,3条途径既相对独立又相互联系(Boshra *et al*, 2006)。哺乳动物中补体系统的活化是由许多与膜结合的可溶性补体调节蛋白来调节的,这些补体调节蛋白可以避免自身组织由于过度激活而造成损伤(Molina *et al*, 2004)。补体调节因子CFH属于RCA家族,是单链血清糖蛋白,在替代途径中可与细胞膜结合膜蛋白发挥作用,也可以以可溶性状态发挥作用。CFH可以通过和C3b的结合加速C3转化酶的分解,同时作为CFI的辅因子,提高了CFI与C3b的亲合力,促进丝氨酸蛋白酶切割C3b分子。研究表明各种补体效应分子能够与多种调控蛋白质相结合,形成复合物,进而识别补体受体,形成补体膜穿孔复合物,杀伤靶细胞(Buresova *et al*, 2011)。除了CFH以外,已经有5种CFH家族补体调节因子CFHR1-5在人类中被鉴定克隆出来。它们彼此之间具有高度的同源性,由数量不等的短的重叠SCRs序列复制而成,每一个SCR结构域包含约60个进化上高度保守的氨基酸(Hourcade *et al*, 1989)。CFH和CFHR基因已经在老鼠(Demberg *et al*, 2002)、猪(Hegasy *et al*, 2003)、斑马鱼(sun *et al*, 2010)等生物中被鉴定。虽然补体系统在鱼类机体免疫中发挥至关重要作用,但有关大黄鱼补体研究的报道较少,仅本团队前期对大黄鱼补体分子C3/C4进行了分子鉴定及表达分析,但对于补体调节因子的研究依然空白。本文鉴定了大黄鱼补体调节因子CFH和CFHR2,并分析了其组织表达特异性及响应溶藻弧菌感染的表达特征。本文研究成果可望为大黄鱼响应溶藻弧菌感染的免疫调节机制的最终阐释提供资料支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用200条健康大黄鱼均取自浙江海洋学院福建苍南养殖基地,均约500g/尾。实验前将大黄鱼养殖在恒温养殖池内,温度控制在24°C,投喂商业

饲料。

两周后随机选取健康大黄鱼6尾,用致死剂量的MS-222处死。迅速解剖,取脑、肌肉、心脏、鳃、肠、肝脏、脾脏和肾脏等8种组织,置于RNA保存液中,-80°C保存备用。

将实验室保存的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)菌种活化,扩大培养,然后稀释菌液到 10^8 CFU/mL备用。随机选取100条健康大黄鱼,等分为实验组和对照组,每组50尾。实验组采用腹腔注射法每尾注射200 μ L溶藻弧菌悬液,对照组每尾注射200 μ L PBS。分别于注射后0h, 6h, 12h, 24h, 36h和48h采样。每次取样4尾,取肝、脾、肾3种组织,-80°C保存备用。用Trizol (Invitrogen)提取总RNA,试剂盒(Fermentas)逆转录成cDNA,用于大黄鱼CFH和CFHR2基因的克隆扩增及表达检测。

1.2 *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 基因克隆及全长 cDNA 的获得
分析本实验室测序的大黄鱼全基因组序列,获取大黄鱼CFH和CFHR2的基因全长。在起始密码子区和终止密码子区设计特异性引物P1和P2,PCR扩增获得大黄鱼CFH和CFHR2基因(*Lc-cfh*和*Lc-cfhr2*)ORF区全长。

1.3 序列分析

采用NCBI数据库中ORF finder程序预测*Lc-cfh*和*Lc-cfhr2*氨基酸序列,并进行同源序列比对。采用SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和SignalP 4.0程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分别进行结构域分析和信号肽预测。利用CLUSTALX软件进行氨基酸序列的多重比对。采用邻接法(Neighbour-joining)构建系统发育树,通过自举分析(bootstrap)进行置信度检测,重复次数为1000次。

1.4 *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 特异性表达分析

根据*Lc-cfh*和*Lc-cfhr2*基因的cDNA序列跨内含子区设计一对特异性引物P3和P4,用于荧光定量分析(qPCR),选取 β -actin作为内参基因(黄左安等, 2011)。

荧光定量检测试剂采用SYBR定量检测试剂盒(TaKaRa),qPCR采用10 μ L反应体系,含SYBR Premix ExTaq (2 \times)缓冲液5 μ L,正向和反向引物(10 μ mol/L)各0.6 μ L,cDNA模板0.5 μ L,灭菌水补足至10 μ L。扩增反应在Applied Biosystems 7500P荧光定量PCR仪上进行,95°C变性120s后,按以下程序进行40个循环:95°C 15s,59°C 45s,72°C 30s。实验结束时采用熔解曲线分析,流程为95°C 30s,72°C

60s, 95°C 30s, 每样品重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.*, 2001) 分析相对定量结果, 显著性水平采用

SPSS18.0 软件中的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行统计, $P < 0.05$ 为差异显著。

表 1 PCR 引物序列
Tab.1 Primers used for PCR amplification

代号		引物序列(5'-3')	用途
P1	F:	ATGGAGGGGAGTCCTTACAGAAC	<i>Lc-cfh</i> ORF 区扩增
	R:	TTAATGGCAAGTGGCAGTGTTA	
P2	F:	ATGACCTGGGCTCTCCACTCTG	<i>Lc-cfhr2</i> ORF 区扩增
	R:	TCAGTTATACCCGAGATACTCTGC	
P3	F:	TCAGAAGAGTCCAGATTAGC	<i>Lc-cfh</i> qPCR
	R:	ACCCAAGTGGCAGCACAATA	
P4	F:	TGCTTTGCTCCAACATATCCC	<i>Lc-cfhr2</i> qPCR
	R:	TGTTGTTTTCTGCTCCCTCT	
β-actin	F:	TGCGTGACATCAAGGAGAAG	内参
	R:	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG	

2 结果与分析

2.1 *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 基因 cDNA 序列分析

Lc-cfh 基因 cDNA 序列全长 1332bp 个核苷酸 (GenBank 登录号: KP710858), 编码一个由 443 个氨基酸组成的前体蛋白, 其预测的相对分子质量为 49.96 kDa, 等电点为 6.66。前体蛋白 N 端 24 个氨基酸为信号肽序列。利用 SMART 数据库对结构域检测分析显示, *Lc-cfh* 蛋白包含 5 个 CCP 结构域(图 1a)。序列存在 1 个潜在的 N-糖基化位点(Asn237)。*Lc-cfhr2* 基因 cDNA 序列全长 1170bp 个核苷酸(GenBank 登录号: KP710859), 编码一个由 389 个氨基酸组成的前体蛋白, 相对分子质量 43.53 kDa 等电点为 5.61, 前体

蛋白 N 端 32 个氨基酸为信号肽序列, 包含 4 个 CCP 结构域(图 1b)。序列存在 3 个潜在的 N-糖基化位点(Asn90, Asn112, Asn148)。虽然在两个基因中, 糖基化位点数不同, 但是它们都处于 CCP 结构中。同样人的 CFH 基因发现与肝素的三个结合位点分别位于 SCRs7, SCRs13, SCRs20 上(Krushal *et al.*, 1998)。

比对 *Lc-cfh*、*Lc-cfhr2*、*Hs-cfh* 及 *Hs-cfhr2* CCP 结构序列, 发现半胱氨酸(Cys)残基具有高保守性, 所有 CCPs 均包含 4 个 Cys 残基, 且排列位置大致相同。同时, 脯氨酸、天冬氨酸以及甘氨酸残基也相对保守(图 2)。

为了研究 *Lc-cfh*、*Lc-cfhr2* 在进化过程中所处的位置, 构建以金仓鼠(*Mesocricetus auratus*)和半滑舌

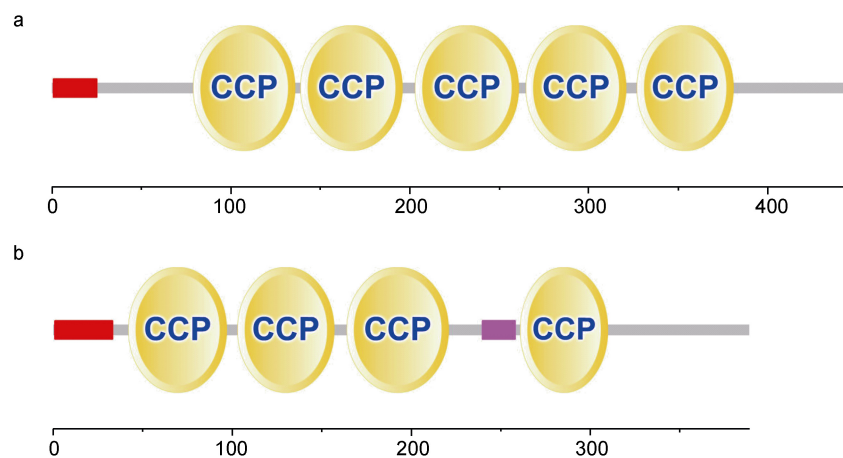


图 1 大黄鱼 *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 结构域

Fig.1 Structural domains of *Lc-cfh* and *Lc-cfhr2* putative amino acids sequences
a. *Lc-cfh* 结构域; b. *Lc-cfhr2* 结构域

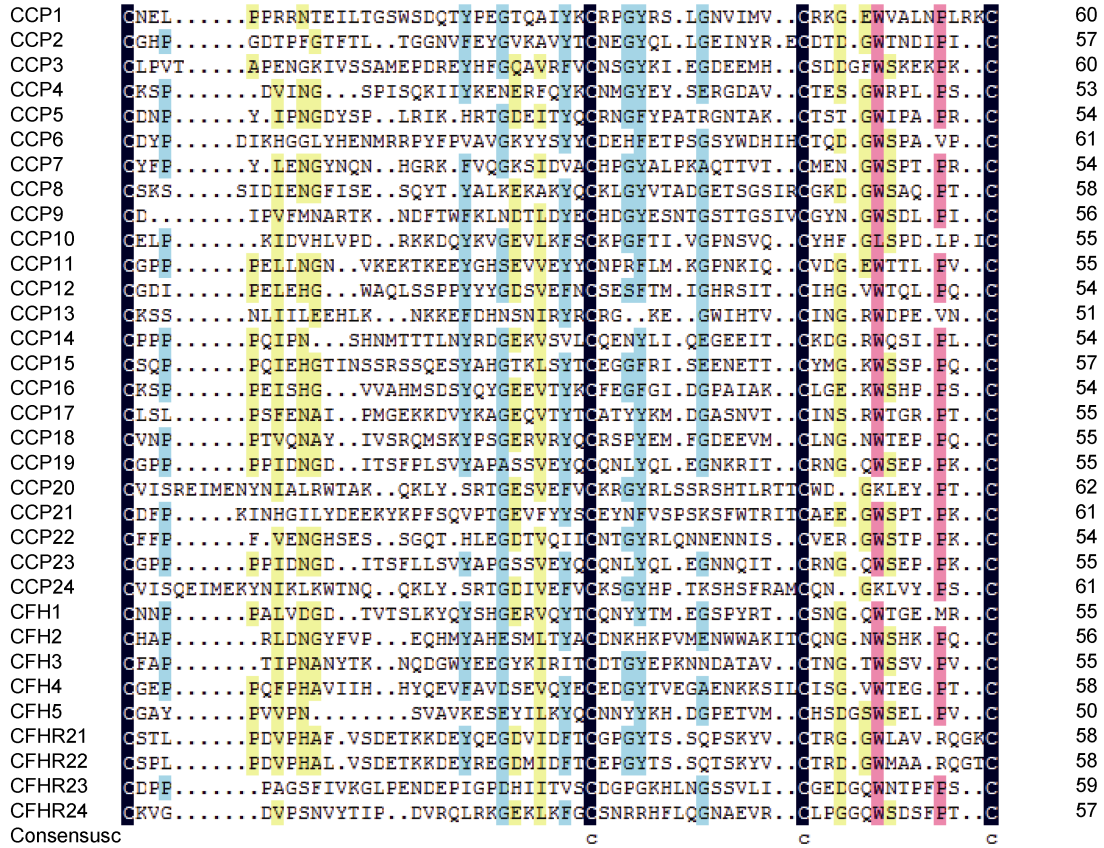


图2 *Lc-cfh*、*Lc-cfhr2*、*Hs-cfh* 及 *Hs-cfhr2* CCP 结构序列比对图

Fig.2 CCP alignment of *Lc-cfh*, *Lc-cfhr2*, *Hs-cfh* and *Hs-cfhr2*

左边为 CCPs 代号, 其中 CCP1-20 为 *Hs-cfh* CCPs, CCP21-24 为 *Hs-cfhr2* CCPs, CFH1-5 为 *Lc-cfh* CCPs, CFHR21-24 为 *Lc-cfhr2* CCPs; 右边数字为 CCPs 长度; 空缺氨基酸残基用圆点表示, 彩色表示同源性>50%的氨基酸残基, 完全相同的氨基酸残基用深蓝色表示

鳎(*Cynoglossus semilaevis*)CFI 基因为外群的系统发育树。如图 3 所示, *Lc-cfh*、*Lc-cfhr2* 分别和其它鱼类 CFHs 及 CFHR2s 聚合成单独分支, 然后再与哺乳类相关同源物聚成一大类, 聚类结果符合传统的分类方法。总体来看, CFH 和 CFHR2 基因在进化树中聚合成独立的大支, 独立于外群 CFI 基因, 表明两个补体调节因子较近的亲缘关系。

2.2 *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 组织表达特征

如图 4 所示, 在所检测的大黄鱼脾脏、肾、肠、脑、心脏、肌肉、鳃、肝脏等 8 种组织中, *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 均有表达, 二者均发现在肝脏中表达量最高, 显著高于其它组织, 而在脑中的二者表达量均最低。除肝脏外, *Lc-cfh* 在肠道中也检测到较高表达量, 显著高于其它组织, 而 *Lc-cfhr2* 依次在肾脏、鳃和肠中呈现显著表达。

2.3 溶藻弧菌感染后, *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 表达特征分析

检测了溶藻弧菌感染后, *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 在肝脏、脾脏、肾脏三种组织中的表达情况。如图 5 所示,

溶藻弧菌感染后, *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 在肝、脾、肾中的表达量都呈现不同程度上升。在肝脏中, 溶藻弧菌感染后 6h, *Lc-cfh* 表达量出现显著升高, 感染后 24h 达到峰值, 为正常表达量的 11.4 倍, 此后 *Lc-cfh* 表达量呈逐渐下降趋势。而 *Lc-cfhr2* 表达量在弧菌感染后呈现温和上升, 与 *Lc-cfh* 相似, *Lc-cfhr2* 也在弧菌感染后 24h 达到峰值, 但仅为正常表达量的 4.3 倍(图 5a)。在肾脏中, 溶藻弧菌感染后, *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 表达量均呈现明显变化。感染后 6h, 两基因表达量开始显著升高, 并呈现温和上升趋势, *Lc-cfh* 表达量在 36h 时达到峰值, 为正常表达量 3.5 倍, 而 *Lc-cfhr2* 在 48h 时达到峰值, 为正常表达量的 6.1 倍。除感染后 12h 外, 在其它各时间点, *Lc-cfhr2* 表达量明显高于 *Lc-cfh*, 表明在肾脏组织中, 受弧菌刺激后, *Lc-cfhr2* 相比 *Lc-cfh* 具有更高的响应效率(图 5b)。在脾脏中, 弧菌刺激后, *Lc-cfh* 表达量温和上升, 感染后 24h 表达量显著上升, 感染后 48h 达到峰值, 为正常量的 8.4 倍, 而 *Lc-cfhr2* 在感染后 24h 即达到峰值, 为正常值

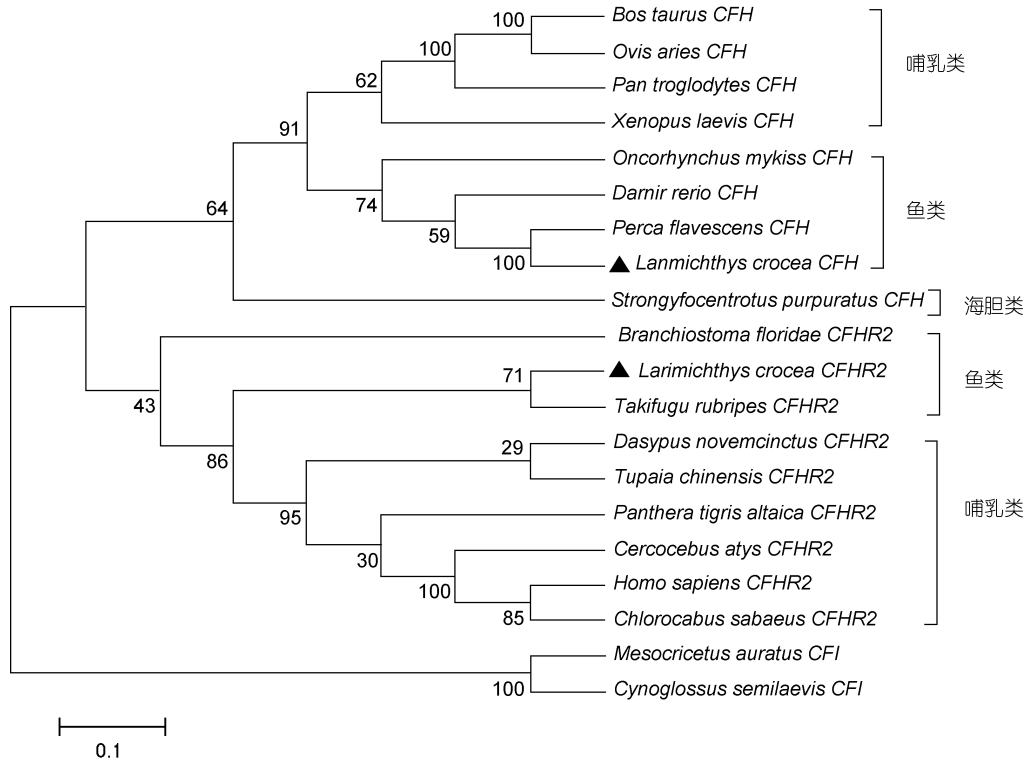
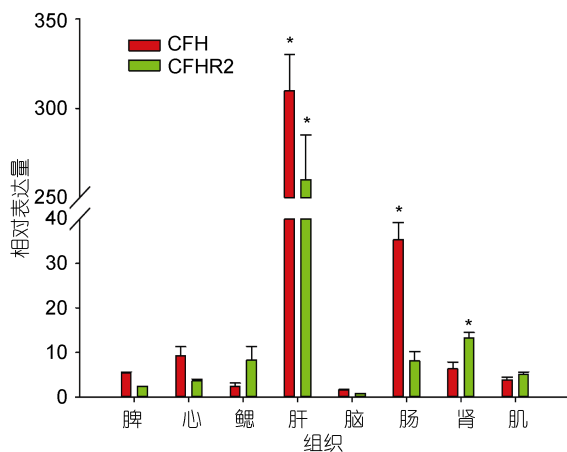


图 3 基于邻近法的 CFH 和 CFHR2 系统发育树

Fig.3 The phylogenetic tree of CFH and CFHR2 based on neighbor-joining method

各物种 GenBank 登录号如下: *Larimichthys crocea* CFH(大黄鱼 KP710858.1); *Oncorhynchus mykiss* CFH(虹鳟 NP 001117899.1); *Oreochromis niloticus* CFH(罗非鱼 XP 013131964.1); *Pan troglodytes* CFH(黑猩猩 XP 003308708.1); *Danio rerio* CFH(斑马鱼 NP 001186119.1); *Perca flavescens* CFH(金鲈 ADX97184.1); *Homo sapiens* CFH(人 ABB02180.1); *Bos taurus* CFH(牛 NP 001029108.1); *Oreochromis niloticus* CFH(罗非鱼 XP 005476028.1); *Xenopus laevis* CFH(非洲爪蟾 NP 001079684.1); *Larimichthys crocea* CFHR2 (大黄鱼 KP710859.1); *Strongylocentrotus purpuratus* CFH(紫海胆 XP 003724666.1); *Takifugu rubripes* CFHR2(红鳍东方鲀 XP 011614930.1); *Dasyptus novemcinctus* CFHR2(九带犴狨 XP 004476415.1); *Panthera tigris altaica* CFHR2(东北虎 XP 007096167.1); *Tupaia chinensis* CFHR2(树鼩 XP 006155519.1); *Mesocricetus auratus* CFHR2(金仓鼠 XP 012971310.1); *Cercocebus atys* CFHR2(白眉猴 XP 011891503.1); *Chlorocebus sabaues* CFHR2(绿猴 XP 007987272.1); *Mesocricetus auratus* CFI 金仓鼠(XP 012978061.1); *Cynoglossus semilaevis* CFI(半滑舌鲷 AKN79751.1)

图 4 *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 基因组织表达特征分析Fig.4 Tissue distributions of *Lc-cfh* and *Lc-cfhr2**表示显著性差异 $P < 0.05$

4.6 倍, 后逐渐降低。暗示受到溶藻弧菌感染, 脾脏组织中感染前期 *Lc-cfhr2* 发挥主导作用, 而感染 24h 后,

Lc-cfh 开始发挥主要作用(图 5c)。

3 讨论

3.1 *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 分子特征

本文利用大黄鱼基因组数据库, 获得了大黄鱼补体调节蛋白 CFH 和 CFHR2 的全长 cDNA 序列, 在 ORF 区设计特异引物, 获得了 *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* ORF 全序列(GenBank: KP710858.1, KP710859.1)。序列分析表明, *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 包含多个保守的 CCPs 序列(补体控制蛋白), 含有 CCP 结构域的蛋白质一般分为两类, 即补体激活调节蛋白质(regulators of complement activation, RCA)和非补体激活调节蛋白质(non-RCA)(Zipfel *et al*, 2009)。CCP 结构域大约包含 60 个氨基酸残基, 结构分析表明, CCP 结构域具有“Cys-Cys-Cys-Trp-Cys”基序(LHR), 这一序列与其功能直接相关(Soares *et al*, 2005)。 *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2*

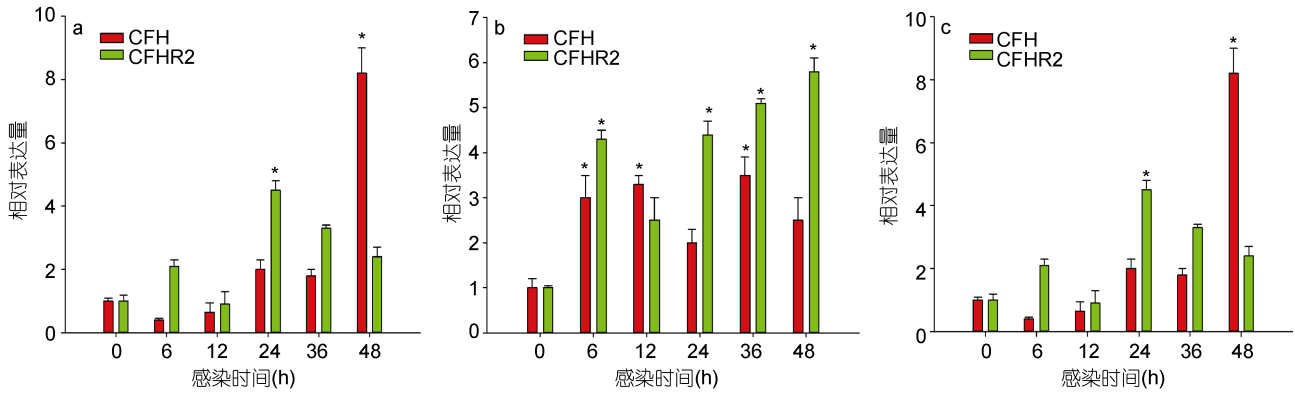


图5 溶藻弧菌感染后, *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 在肝(a)、肾(b)、脾(c)中表达量变化

Fig.5 Expression characteristic analysis of *Lc-cfh* and *Lc-cfhr2* in croaker liver (a), kidney (b) and spleen (c) induced by *V. alginolyticus*

*表示显著性差异 $P < 0.05$

CCP 结构域均具有 4 个高度保守的 Cys 残基, 具有 RCA 蛋白家族的典型特征。CFH 是一种补体激活途径的抑制因子, 它在 C3b 的表面有多个结合位点, 能够有效地抑制 FB 与 C3b 结合形成 C3 转化酶, 也可以作为 CFI 的辅因子加速 C3 转化酶的衰变(Yates *et al.*, 2007)。C3b 与 CFH 的 1—4 个 CCP 结构域形成的复合物会改变其结构, 使得 C3b 的第一个键暴露在外, 易于被 CFI 切割, 而其它的键是随着构象的改变而被切割(Janssen *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009)。高度保守的半胱氨酸残基之间可以形成二硫键, 使得 SCR 成为一个空间环状结构(Hourcade *et al.*, 1989)。并且在 CCPs 序列中分布若干数量不等的糖基化位点, 而糖基化普遍被认为和免疫作用相关(Van Kooyk *et al.*, 2008)。尽管所有物种 SCRs 结构相对保守, 但不同物种 CFH 及 CFHRs 包含的 CCP 数量却有较大差异, CFH 差异更为明显。大黄鱼 CFH 含有 5 个 CCP 结构域, 而哺乳动物 CFH 一般含有 20 个 CCP 结构域, 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)含有 7 个 CCP 机构, 而硬骨鱼中的斑马鱼(*Danio rerio*)含有 15 个 CCPs, 黄金鲈(*Perca flavescens*)则含有 4 个 CCP 结构, 文昌鱼含有 2 个 SCRs 结构域(Cai *et al.*, 2014), 这可能是补体调节因子相关功能区在进化过程中对调控需求不同造成的。系统发育图显示鱼类和哺乳类的 CFH、CFHR2 分别形成个不同的支系, 然后再聚成一大类, 基本符合传统分类法。整体上看, CFH 和 CFHR2 具有较近的亲缘关系。CFH 和其相关蛋白 CFHRs(CFHR1-5)共同组成 CFH 基因家族, 它们彼此之间具有高度的同源性, 由数量不等的短的重叠 SCRs 序列复制而成(Skerka *et al.*, 2013)。通过比对 *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* 的

CCP 结构, 发现所有 CCPs 在 N 端和 C 端都具有高度保守性, CFH1 和 CFHR21 具有 55.1%的相似度, CFH1 和 CFHR23 具有 47.6%的相似度, CFH2 和 CFHR21 也有 49%的相似度。这些序列同源性也表明, 补体调节蛋白功能的正常发挥与这些短的同源序列紧密相关。

3.2 大黄鱼 CFH 和 CFHR2 基因表达特性分析

组织表达特异性显示, 健康大黄鱼 CFH 基因和 CFHR2 在肝中表达量最高。在斑马鱼(sun *et al.*, 2010)和鼠(Hellwage *et al.*, 2006)的肝脏组织中, CFH 基因 mRNA 表达量也显著高于其它组织。肝脏作为主要的解毒器官, 在机体受到外界病原体侵染时对机体免疫起重要作用。同时, 肝脏也是许多免疫因子尤其是各补体成分的主要发生器官(Zipfel *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008b)。肝脏作为补体调节因子的主要合成器官, 也已经在斑马鱼(Sun *et al.*, 2010)和虹鳟(Anastasiou *et al.*, 2011)上得到了证明。但同时应注意在不同物种中, 肝脏并不作为补体因子的唯一发生器官, 这可能与蛋白在每个物种中的特异性功能有关。

溶藻弧菌感染后, *Lc-cfh* 和 *Lc-cfhr2* mRNA 在肝、脾、肾中的表达量都呈现一个上升趋势。肝脏中 CFH 的 mRNA 表达量在 6h 和 24h 达到峰值, 表达量明显高于对照组。肾脏中 CFH 的 mRNA 表达量水平在受到感染后 6h 增加到对照组的 3 倍, 并且一直维持这个水平直到 48h。在肝、肾中 CFHR2 mRNA 表达量水平增长同样明显, 在 24h 和 48h 达到峰值, 分别是对照组的 4.6 倍和 6.2 倍。说明受到病原体侵袭后, 鱼类免疫器官能迅速对此作出免疫应答, 大量合成补体调节因子避免补体分子过度激活, 从而

有效的保护机体不受伤害。此外, CFH 作为一种粘附蛋白, 通过细胞表面与 CR3 受体结合, 清除凋亡细胞、保护细胞对抗慢性炎症(Boshra *et al*, 2006)。在脾脏中 CFH mRNA 表达量在 6h 下降到低于对照组的水平, 直到 24h 又高于对照组, 而 CFHR2 mRNA 在 6h 的表达量显著高于对照组水平。这说明补体调节因子在免疫途径中的调节有可能是多方面的, CFHR2 的表达量水平可能会对 CFH 造成影响, 作为同源基因共同在替代途径中发挥调节作用。在溶藻弧菌侵染后 6h, CFHR2 的 mRNA 表达量在三种免疫组织中都显著增加, 说明大黄鱼 CFHR2 分子具有重要的免疫调节作用, 但其具体的调节机制还需要更加深入的研究。

综上所述, 本文报道了大黄鱼补体调节因子 CFH 和 CFHR2 的分子特征, 并对其组织表达特异性以及感染溶藻弧菌的大黄鱼肝、脾、肾中的表达量变化进行了相关研究, 为大黄鱼抗弧菌免疫的深入研究奠定了基础。

参 考 文 献

- 张彩兰, 刘家富, 李雅瑾等, 2002. 福建省大黄鱼养殖现状分析与对策. 上海水产大学学报, 11(1): 77—83
- 金 珊, 王国良, 赵青松等, 2005. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的流行病学研究. 水产科学, 24(1): 17—19
- 黄左安, 陈 炯, 陆新江等, 2011. 香鱼凝血因子 X 基因表达与鳃利斯顿菌感染的相关性. 动物学研究, 32(5): 492—498
- Anastasiou V, Mikrou A, Papanastasiou A D *et al*, 2011. The molecular identification of factor H and factor I molecules in rainbow trout provides insights into complement C3 regulation. *Fish Shellfish Immunol*, 3: 491—499
- Ao J, Mu Y, Xiang L X *et al*, 2015. Genome sequencing of the perciform fish *Larimichthys crocea* provides insights into molecular and genetic mechanisms of stress adaptation. *PLoS Genetics*, 11(4): 100—118
- Boshra H, Li J, Sunyer J O, 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol*, 20: 239—262
- Buresova V, Hajdusek O, Franta Z *et al*, 2011. Function algenomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system. *J Innate Immun*, 3(6): 623—630
- Demberg T, Pollok-Kopp B, Gerke D *et al*, 2002. Rat complement factor H: molecular cloning, sequencing and quantification with a newly established ELISA. *Scand J Immunol*, 156: 149—160
- Hegasy G A, Willhoeft U, Majno S A *et al*, 2003. Pig complement regulator factor H: molecular cloning and functional characterization. *Immunogenetics*, 55: 462—471
- Hellwege J, Eberle F, Babuke T *et al*, 2006. Two factor H-related proteins from the mouse: expression analysis and functional characterization. *Immunogenetics*, 58: 883—893
- Hourcade D, Holers V M, Atkinson J P, 1989. The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv Immunol*, 45: 381—416
- Janssen B J, Christodoulidou A, McCarthy A *et al*, 2006. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature*, 444: 213—216
- Krushal J, Kemper C, Gigli I, 1998. Ancient origin of human complement factor H. *J Mol Evol*, 47: 625—630
- Li C H, Chen J, 2013. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a novel wap65-1 gene from *Plecoglossus altivelis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 165(2): 144—152
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Lu Cai, Jiu Zhu, Denghua Yin *et al*, 2014. Identification and characterization of complement factor H in *Branchiostoma belcheri*. *Gene*, 553: 42—48
- Molina H, 2004. Complement and immunity. *Rheum Dis Clin North Am*, 30: 175—191
- Qian T, Wang K, Mu Y *et al*, 2013. Molecular characterization and expression analysis of TLR 7 and TLR 8 homologs in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Fish and Shellfish Immunology*, 35(3): 671—679
- Rodriguez de Cordoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge *et al*, 2004. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*, 41: 355—367
- Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V *et al*, 2013. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Molecular Immunology*, 56: 170—180
- Soares D C, Gerloff D L, Syme N R *et al*, 2005. Large-scale modeling as a route to multiple surface comparisons of the CCP module family. *Protein Eng Des Sel*, 18: 379—388
- Sun G, Li H, Wang Y *et al*, 2010. Zebrafish complement factor H and its related genes: identification, evolution, and expression. *Funct Integr Genomics*, 10: 577—587
- Tian C, Chen Y, Ao J *et al*, 2010. Molecular characterization and bioactivity of a CXCL13 chemokine in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(3): 445—452
- Van Kooyk, Y, Rabinovich G A, 2008. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 9: 593—601
- Wang K J, Cai J J, Cai L *et al*, 2009. Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide. *Peptides*, 30(4): 638—646
- Wang Z, Zhang S, Wang G, 2008. Response of complement expression to challenge with lipopolysaccharide in embryos larvae of zebrafish *Danio rerio*: acquisition of immunology competent complement. *Fish Shellfish Immunology*, 25: 264—270
- Wu J, Wu Y Q, Ricklin D *et al*, 2009. Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat Immunol*, 10: 728—733
- Zheng W B, Liu G Z, Ao J Q *et al*, 2006. Expression analysis of immune-relevant genes in the spleen of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) stimulated with poly (I: C). *Fish Shellfish Immunol*, 21: 414—430
- Zhou Q J, Su Y Q, Niu S F *et al*, 2014. Discovery and molecular

cloning of piscidin-5-like gene from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish and Shellfish Immunology*, 41(2): 417—420
Zipfel P F, Skerka C, 2009. Complement regulators and

inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*, 9: 729—740
Zipfel P F, Skerka C, Hellwage J *et al*, 2002. Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem Soc Trans* 30: 971—978

CHARACTERIZATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF COMPLEMENT REGULATOR FACTOR CFH AND CFHR2 IN LARGE YELLOW CROAKER *LARIMICHTHYS CROCEA*

GUO Bao-Ying, ZHANG Chuan, QI Peng-Zhi, ZHANG Jian-She, GUAN Ao, CHEN Yu, WU Yu-Ting, WU Chang-Wen

(National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract The complement system is an important component in fish innate immunity which can recognize, facilitate the elimination of pathogens, promote the function of phagocyte, activate immune cell as well as modulate the adaptive immune response. In the immune tissues, about half of the complement components exist as regulating factors, which play key role in complement activation. CFH and CFHR2 are important regulator factors in alternative pathways of complement system and maintain component system function well. Although the complement system of *Larimichthys crocea* has been extensively studied, the expression and evolution of CFH and CFHR2 remain unknown. In this study, we reported the primary sequence of *Larimichthys crocea* complement regulator factor H and HR2. CFH open reading frame (ORF) is 1332 bp and encodes for 443 amino acids with a putative signal peptide of 24 amino acid residues. CFHR2 open reading frame (ORF) is 1170 bp and encodes for 339 aa with a putative signal peptide of 32 amino acid residues. Deduced amino acid sequence of the structure analysis indicated that the *L. crocea* CFH and CFHR2 have typical characteristics of RCA protein family, possessing several conservative CCP structures (complement control protein). Real-time PCR analysis showed that the Liver displayed the most abundant expression level of three genes among the tested tissues of the healthy individuals. We found that *Vibrio alginolyticus* exposure up-regulated the expressions significantly in the early induction. As the change of infection time, the expression present different rising trend. The result showed that CFH and CFHR2 gene are very sensitive to pathogenic substances, which indicated that complement regulator factors may play an significant role in immunologic mechanisms of croaker.

Key words Large yellow croaker *Larimichthys crocea*; complement regulator factor CFH; complement regulator factor CFHR2; molecular characterization; expression analysis