

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)脾脏酪氨酸激酶 SYK 的鉴定及其介导的 MAPK 信号通路研究*

孙 娇¹ 聂 力^{1①} 苗 亮¹ 陈 炯^{1,2}

(1. 宁波大学海洋学院 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室 宁波 315211;

2. 宁波大学海洋学院 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315832)

摘要 脾脏酪氨酸激酶(SYK)是一种非受体型酪氨酸激酶(non-receptor tyrosine kinase, NRTK)。在哺乳动物中, SYK 是重要的细胞信号通路接头分子, 其在免疫细胞活化、胞外刺激的信号转导和病原体识别等多种生命过程中扮演重要角色, 然而在鱼类中却鲜有报道。本研究以香鱼(*Plecoglossus altivelis*)为研究对象, 探讨了其 SYK(*PaSYK*)在应对病原微生物感染及在活化免疫信号通路中的作用。我们克隆获得了香鱼 SYK 的 cDNA 序列, 并利用多重序列比对、构建进化树等生物信息学方法分析 *PaSYK* 的进化地位; 采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法分析 *PaSYK* 在健康组织及鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后的表达变化; 亚细胞定位检测 *PaSYK* 在 HEK293T 细胞的分布情况; 在香鱼头肾单核/巨噬细胞(Monocyte/macrophage, MO/M Φ)中过表达 *PaSYK*, 研究其对炎症细胞因子表达的调控作用并在 HEK293T 细胞及香鱼头肾 MO/M Φ 中研究 *PaSYK* 对 MAPK 信号通路的活化作用。多重序列比对结果显示, SYK 的蛋白质序列和结构域在进化过程中是高度保守的。系统进化树结果表明, *PaSYK* 与河鲢的亲缘关系密切。RT-qPCR 结果表明, SYK 基因 mRNA 在检测的所有组织中均有表达, 鳃弧菌感染后免疫相关组织中 *PaSYK* 表达量均上调。此外, *PaSYK* 能显著诱导香鱼头肾 MO/M Φ 中促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达, 但对抑炎因子 TGF- β 和 IL-10 的表达起到略微的抑制作用。Western blot 结果证明 *PaSYK* 可以激活 MAPK 信号通路。综上所述, SYK 分子在进化上高度保守, 香鱼 SYK 与其哺乳动物中的同源物具有保守的功能, 均能活化 MAPK 信号通路并在炎症反应中发挥作用。

关键词 脾脏酪氨酸激酶(SYK); 香鱼; 鳃弧菌感染; 炎症细胞因子; MAPK 信号通路

中图分类号 Q78 doi: 10.11693/hyhz20191200249

固有免疫是抵抗病原体入侵的第一道防线(Lemaitre *et al.*, 1996)。宿主通过免疫反应来阻止病原体的感染与复制, 并将病原体彻底清除。这种反应的前提是固有免疫系统的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)识别病原相关分子模式(pathogen associated molecule patterns, PAMPs), 发生受体配体反应, 从而诱导产生一系列相关的细胞因子来介导宿主的抗病原机制(Uematsu *et al.*, 2006)。

酪氨酸激酶蛋白(protein tyrosine kinase, PTK)是一类具有酪氨酸激酶活性的蛋白质, 它们能催化蛋白质的酪氨酸残基使其发生磷酸化反应, PTK 包括受体型和非受体型两种(Huang *et al.*, 2005)。脾脏酪氨酸激酶(SYK)是一种非受体型酪氨酸激酶(non-receptor tyrosine kinase, NRTK), 它与 ZAP-70 关系最近, 同属 SYK 家族(Bolen *et al.*, 1997)。来自细胞外的信号通过 SYK 到达细胞质从而介导一连串信号转导过程

* 国家自然科学基金项目, 31702374 号, 31972821 号, 31772876 号; 浙江省自然科学基金项目, LZ18C190001 号, LQ17C190001 号; 宁波市科技创新团队项目, 2015C110018 号。孙 娇, 硕士研究生, E-mail: sunjiao215@163.com

通信作者: 聂 力, 博士, E-mail: nieli@nbu.edu.cn

收稿日期: 2019-12-04, 收修改稿日期: 2020-01-19

(Berton *et al.*, 2005)。SYK 含有 N 端的两个 SH2 结构域和一个 C 端激酶结构域(Wong, 2005)。免疫受体信号需要 SYK 的激酶活性以及两个 SH2 结构域进行传导。SYK 的激酶结构域在蛋白质的静息状态下是不活跃的, 但是可以通过将两个 SH2 结构域结合到双磷酸化的 ITAM 上而被激活(Mócsai *et al.*, 2010)。

研究表明, SYK 在信号转导过程中至关重要。在 B 细胞信号转导中, SYK 被激活后进一步激活鸟嘌呤核苷交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF), GEF 激活 Ras 和 Rac, 经促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)途径激活相关基因 (Buhl *et al.*, 1997)。在 T 细胞信号转导中, SYK 可与磷酸化 ITAM 结合, 进而启动下游 pre-T 细胞受体信号转导(Palacios *et al.*, 2007)。在 Fc 信号转导中, SYK 参与了 FcεRI 介导的 Ca^{2+} 内流和分泌、细胞因子产生、脱粒等代谢过程(Zhang *et al.*, 1996)。整合素是一个异二聚体跨膜受体家族, 参与白细胞粘附和迁移等, 在缺乏 SYK 的中性粒细胞(Attila *et al.*, 2006)、单核细胞、巨噬细胞(Vines *et al.*, 2001)、血小板(Obergfell *et al.*, 2002)和破骨细胞(Zou *et al.*, 2008)中, 整合素介导的信号转导受到抑制。同时, SYK 还调控了病原体活化的先天免疫信号通路。在真菌识别方面, Dectin-1 与 β -葡聚糖结合后促使 SYK 活化, 随后 MAPK、NF- κ B 发生磷酸化被激活, 并促进 TNF- α 、IL-6、IL-10 等炎症细胞因子的分泌, 增强抗真菌免疫能力(Drummond *et al.*, 2011)。除此之外, SYK 还可以识别组织损伤, 研究发现 CLEC9A 与 SYK 偶联后能够识别细胞损伤相关分子并介导下游信号转导(Sancho *et al.*, 2009)。

相比于在哺乳动物中较深透的研究, SYK 在硬骨鱼中的功能研究相对较少较浅。虽然在石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(Mo *et al.*, 2016)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(Bian *et al.*, 2018)等硬骨鱼中有所报道, 但是研究均集中在对该蛋白的生物信息学分析、不同应激条件下组织表达水平的研究, 而对其信号通路方面的研究, 特别是硬骨鱼类 SYK 是否也能像哺乳动物一样激活 MAPK 信号通路的研究几乎未有涉及。

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)是东亚地区重要的经济鱼类(史雨红等, 2017)。在香鱼养殖产业中, 由鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)引起的细菌性疾病是造成损失的主要原因(Lu *et al.*, 2016)。考虑到 SYK 在免疫应答

中的关键作用, 研究香鱼 SYK(PaSYK)的结构功能和活化的信号通路对后续的免疫防治至关重要。本研究分析了香鱼 SYK 基因的序列特征及其进化地位; 研究了不同健康组织及鳃弧菌感染后免疫组织中 PaSYK 基因 mRNA 的表达变化; 采用激光共聚焦技术确定了 PaSYK 的亚细胞定位; 除此之外, 研究了 PaSYK 对 MAPK 信号通路的活化作用及对炎症细胞因子表达的影响, 从而分析其在进化过程中功能的保守性。

1 材料与方法

1.1 实验用香鱼

本研究使用的香鱼(*Plecoglossus altivelis*)购自浙江省宁波市宁海县某渔场, 选择体重 40—50g 的健康鱼。实验前在 20—22℃ 的循环水系统中暂喂养两周。所有实验均按照中国实验动物管理法进行, 并经宁波大学动物伦理委员会批准。

1.2 PaSYK 基因 cDNA 序列测定及分析

提取香鱼健康组织的 RNA 并反转录获得 cDNA。从香鱼头肾单核/巨噬细胞(Monocyte/macrophage, MO/MΦ)的转录组数据获得 PaSYK 序列。使用 Primer 5.0 软件设计特异性引物(SYK F1/R1, 表 1), 以获得的 cDNA 为模板扩增其开放阅读框(ORF), 然后进行克隆和测序。PCR 反应体系如下: cDNA 1μL, 上下游引物各 1μL, dNTP (2.5mmol) 3.5μL, 10 × La Buffer 2.5μL, La Taq 0.25μL, ddH₂O 15.75μL。PCR 程序如下: 预变性 94℃ 2min; 变性 94℃ 30s, 退火 56℃ 30s, 延伸 72℃ 2min, 30 个循环; 延伸 72℃ 10min。使用 BioEdit 软件将克隆的 SYK 蛋白质序列与 GenBank 数据库进行比对。使用 ProtParam 在线分析其分子量和等电点。使用 Clustal W 软件对 PaSYK 进行多重序列比对和同源性分析。使用 MEGA 6.0 软件以邻接法(NJ)制作分子系统进化树。本研究使用的序列如表 2 所示。

1.3 真核表达及荧光载体构建

利用 Primer 5.0 软件分别设计真核表达引物(SYK F2/R2)及荧光载体引物(SYK F3/R3), PCR 扩增获得相应片段。将获得的片段分别利用 *Not* I/*Sfa* I 以及 *Eco*R I/*Bam*H I 进行双酶切, 克隆至真核表达载体 pcDNA3.1-flag 及绿色荧光载体 pEGFP-N1 上, 构建真核表达质粒及荧光表达质粒。构建的所有质粒均经测序验证。使用 EZNA™质粒 Midi 试剂盒(Omega Bio-Tek, 美国)制备用于转染的无内毒素质粒。

表 1 PCR 扩增和 RT-qPCR 所用引物及序列
Tab.1 Oligonucleotide primers used for PCR and RT-qPCR

引物	基因名称	核苷酸序列(5'—3')	扩增长度(bp)
SYK F1	<i>PaSYK</i>	ATGGCTGACAAAGTAAACA	1857
SYK R1		CGCTGAGCTATATCATAGTAATAATCTCTC	
SYK F2	<i>PaSYK</i>	ATGCGCGGCCGCAATGGCTGACAAAGTAAACA	1857
SYK R2		ATGCGCGATCGCCTGAGCTATATCATAGTAATAATCTCTC	
SYK F3	<i>PaSYK</i>	CGGAATTCGCCACCATGGCTGACAAAGTAAACA	1857
SYK R3		CGGGATCCCGCTGAGCTATATCATAGTAATAATCTCTC	
SYK qRT F	<i>PaSYK</i>	GCTGGTGTGTCTACTGAAAAAG	259
SYK qRT R		TCTGAGCCACGCCTACAAAGTG	
TNF- α qRT F	<i>PaTNF-α</i>	ACATGGGAGCTGTGTTCTC	115
TNF- α qRT R		GCAAACACACCGAAAAAGGT	
IL-1 β qRT F	<i>PaIL-1β</i>	TACCGGTGGTACATCAGCA	104
IL-1 β qRT R		TGACGGTAAAGTTGGTGCAA	
TGF- β qRT F	<i>PaTGF-β</i>	CTGGAATGCCGAGAACAAAT	88
TGF- β qRT R		GATCCAGAACCTGAGGGACA	
IL-10 qRT F	<i>PaIL-10</i>	TGCTGGTGGTGCTGTTTATGTGT	73
IL-10 qRT R		AAGGAGCAGCAGCGTCAGAA	
18S rRNA qRT F	<i>Pa18S rRNA</i>	GAATGTCTGCCCTATCAACT	103
18S rRNA qRT R		GATGTGGTAGCCGTTTCT	

表 2 研究中所用到的 SYK 蛋白序列信息
Tab.2 SYK protein sequences used in this study

登录号	物种		蛋白
	拉丁名	英文名	
MN599065	<i>Plecoglossus altivelis</i>	ayu	SYK
XP_020474432.1	<i>Monopterus albus</i>	swamp eel	SYK
XP_022600342.1	<i>Seriola dumerili</i>	greater amberjack	SYK
XP_019937198.1	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Japanese flounder	SYK
XP_010749830.1	<i>Larimichthys crocea</i>	large yellow croaker	SYK
XP_026195406.1	<i>Anabas testudineus</i>	climbing perch	SYK
XP_004564629.1	<i>Maylandia zebra</i>	zebra mbuna	SYK
XP_005449474.1	<i>Oreochromis niloticus</i>	Nile tilapia	SYK
XP_023142075.1	<i>Amphiprion ocellaris</i>	clown anemonefish	SYK
XP_023816381.1	<i>Oryzias latipes</i>	Japanese medaka	SYK
XP_021457254.1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	rainbow trout	SYK
XP_020313159.1	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	coho salmon	SYK
XP_024237245.1	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	chinook salmon	SYK
XP_029566306.1	<i>Salmo trutta</i>	river trout	SYK
NP_001167144.1	<i>Salmo salar</i>	Atlantic salmon	SYK
XP_018600403.1	<i>Scleropages formosus</i>	Asian bonytongue	SYK
XP_005155595.1	<i>Danio rerio</i>	zebrafish	SYK
XP_018937248.1	<i>Cyprinus carpio</i>	common carp	SYK
XP_022521290.1	<i>Astyanax mexicanus</i>	Mexican tetra	SYK

续表			
登录号	物种		蛋白
	拉丁名	英文名	
XP_026864836.1	<i>Electrophorus electricus</i>	electric eel	SYK
XP_026798309.1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	striped catfish	SYK
NP_035648.2	<i>Mus musculus</i>	mouse	SYK
NP_001032542.1	<i>Bos taurus</i>	cattle	SYK
NP_003168.2	<i>Homo sapiens</i>	human	SYK
NP_001086665.1	<i>Xenopus laevis</i>	African clawed frog	SYK
XP_002937073.2	<i>Xenopus tropicalis</i>	tropical clawed frog	SYK
XP_028604765.1	<i>Podarcis muralis</i>	common wall lizard	SYK
XP_025044887.1	<i>Pelodiscus sinensis</i>	Chinese softshell turtle	SYK

1.4 鳎弧菌感染与组织收集

鳎弧菌培养方法参考文献(Zhang *et al*, 2018)。简述如下: 把鳎弧菌接种到营养肉汤培养基中, 28℃ 恒温摇床过夜培养; 按照 1 : 100 的比例继续扩大培养, 在对数生长阶段收集菌体后用无菌的 PBS 洗涤、计数, 并用 PBS 将菌体稀释至最适浓度。感染组的每只香鱼腹腔注射 100μL 含有 1.2×10⁴ colony forming units (CFUs)鳎弧菌的 PBS, 对照组的香鱼注射等量的 PBS。在感染后 4、8、12、24 和 48hpi (hours post infection)收集香鱼的鳃、脾、头肾、肝和肠进行 RNA 提取。此外, 收集肠、脾、肝、鳃、头肾和皮肤等健康组织提取 RNA 并进行组织表达分析。

1.5 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

RT-qPCR 方法参考文献(Chen *et al*, 2016)。简述如下: 香鱼组织或细胞的总 RNA 抽提采用 RNAiso 试剂(TaKaRa, 大连), 反转录成 cDNA 放在-20℃ 冰箱备用。以上述 cDNA 为模板, 采用 SYBR 预混料 Ex Taq DNA 聚合酶(TaKaRa, 大连)利用 ABI Stepone RT-qPCR 系统(Applied Biosystems, 美国)进行 RT-qPCR 反应(引物见表 1)。PCR 反应条件如下: 95℃ 30s, 60℃ 20s, 72℃ 30s, 共 40 个扩增循环; 随后进行熔解曲线 94℃ 30s, 72℃ 30s, 94℃ 30s。采取 2^{-ΔΔCt} 的方法计算基因的相对表达, 以 Pa18S rRNA 作为标准化的内参。每组实验至少重复三次。

1.6 香鱼头肾单核/巨噬细胞培养

收集健康香鱼的头肾, 洗涤和研磨后利用 Ficoll (Invitrogen, 上海)密度梯度离心[(1.077±0.001)g/mL]获得头肾白细胞富集组分, 按照 2×10⁷/mL 的浓度将细胞接种到 35mm 培养皿中(Corning, 美国), 在含 5% CO₂ 的培养箱中 24℃ 过夜培养。去除未贴壁细胞, 贴壁细胞在完全培养基[RPMI 1640 (Invitrogen, 上海); 5% (V/V) FBS (Gibco, Life Technologies, 美国);

5% (V/V) 香鱼血清; 青霉素(100U/mL)和链霉素(100μg/mL)]中继续培养。HEK293T 细胞在含有 10% (V/V) FBS、青霉素和链霉素的 DMEM (Invitrogen, 上海)的培养基中, 在 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.7 瞬时细胞转染

HEK293T 细胞和香鱼头肾 MO/MΦ 按照 1×10⁵/mL 的浓度接种到 6 孔板(Corning, 美国)中, 细胞融合到 70%—90%后使用 Lipofectamine 3000 (Invitrogen, 上海)转染试剂将真核表达或绿色荧光载体转染进细胞中。

1.8 亚细胞定位

HEK293T 细胞接种在 6 孔板中的圆形盖玻片上。细胞培养 12h 后, 转染 pEGFP-*PaSYK* 重组质粒。连续培育 36h, 用 PBS 洗涤细胞两次, 并在 4% (V/V)多聚甲醛中固定 15min。PBS 洗涤两次, 用 Dil (Beyotime, 中国)染细胞膜 10min, PBS 洗两次, DAPI (Sigma, 美国)染核 5min。在激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM710 NLO, Carl Zeiss, 美国)下观察细胞荧光图像。

1.9 炎症细胞因子 mRNA 表达测定

将 pcDNA3.1-*PaSYK* 重组质粒转染至香鱼头肾 MO/MΦ, 转染 pcDNA3.1-flag 空白质粒作为对照。分别在 24、36 和 48hpt (hours post transfection)时收集细胞, RT-qPCR 检测炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β、TGF-β 和 IL-10 的 mRNA 表达。每组实验至少重复三次。

1.10 Western blot 分析

将 pcDNA3.1-*PaSYK* 重组质粒转染至 HEK293T 细胞和香鱼头肾 MO/MΦ 中, 转染 pcDNA3.1-flag 空白质粒作为对照。在 6、12、24 和 48hpt 时收集细胞, 加入 100μL 蛋白裂解液提取总蛋白, 使用 Bradford 法测定蛋白质浓度。取 15μL 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 并将蛋白转移至 PVDF 膜上(甲醇活化); 将 PVDF 膜置于含 5%脱脂奶粉(W/V)的 TBST 中室温封

闭 1h, 一抗孵育过夜。TBST 溶液洗膜 3 次, 每次 15min; 二抗采用山羊抗兔 IgG-HRP, 室温孵育 1.5h, TBST 溶液洗膜 3 次, 每次 15min。利用 ECL 发光液进行显色。用到的一抗为兔抗 phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)、兔抗 p38 MAPK、兔抗 phospho-JNK1/2 (Thr183/Tyr185)、兔抗 JNK1/2、兔抗 phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)(Thr202/Tyr204)和兔抗 P44/42 MAPK (ERK1/2)(Cell Signaling Technology, 上海)。

1.11 数据分析

实验结果表示为平均值±标准误(mean±SEM), 采用 SPSS 13.0 软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计, * $P < 0.05$ 和 ** $P < 0.01$ 被认为具有

统计学意义。

2 结果

2.1 *PaSYK* 基因 cDNA 序列测定及分析

PaSYK 的 ORF 长度为 1857bp, 编码的蛋白质含有 618 个氨基酸。该蛋白质的分子量(MW)为 70.78kDa, 等电点(pI)为 8.27。*PaSYK* 由两个 N 端的 SH2 结构域和一个 C 末端的激酶结构域组成。多重序列比对结果表明 SYK 的蛋白质序列和结构域在进化过程中是高度保守的, *PaSYK* 与河鲈 SYK 氨基酸序列相似度最高(82%)(图 1)。系统进化树分析显示, 所有鱼类的 SYK 归为一簇, 哺乳类、两栖类和

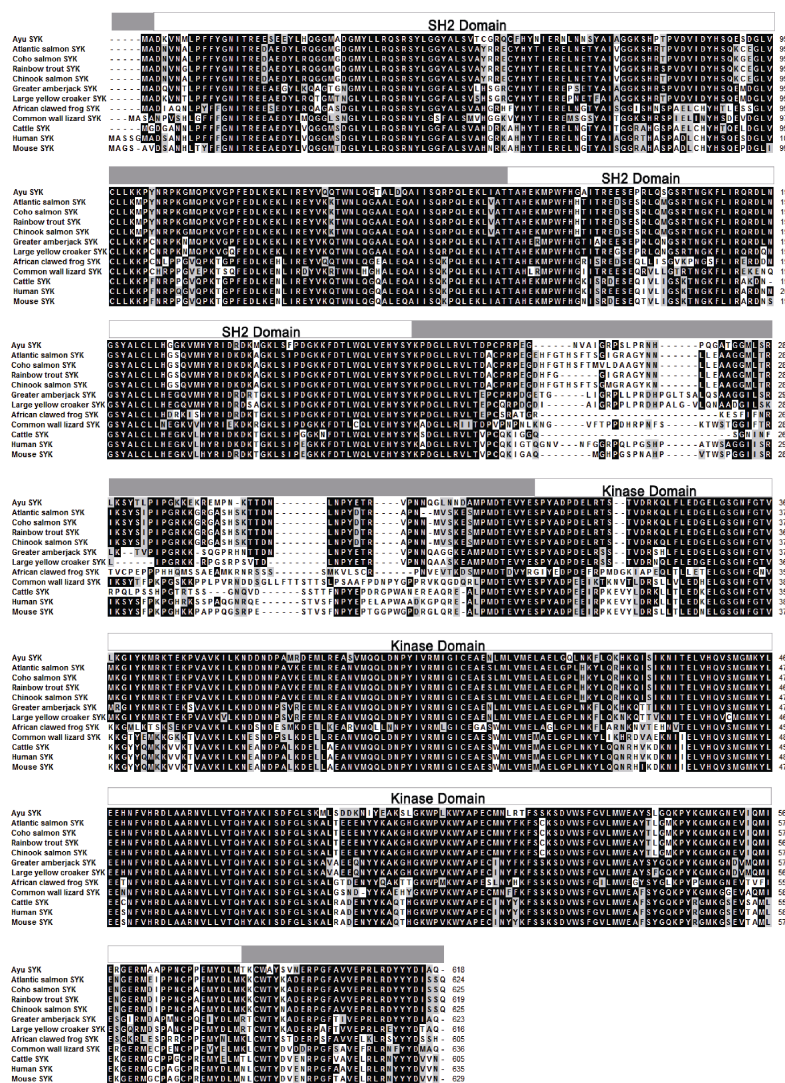


图 1 香鱼 SYK 氨基酸多序列比对

Fig.1 Multiple alignment of *PaSYK* amino acid sequences

注: 着色阈值大于 60%, 黑色背景表示相同的氨基酸, 灰色背景表示性质相似的氨基酸, 对齐间隙用“-”标识。相关序列信息见表 2。两个 SH2 结构域和一个激酶结构域显示在对齐上方

爬行类各为一簇, *PaSYK* 与河鲢的 SYK 进化关系最为密切(图 2)。

2.2 健康组织及鳃弧菌感染前后 *PaSYK* 基因 mRNA 的表达分析

在健康香鱼的肠、脾、肝、鳃、头肾和皮肤中均检测到 *PaSYK* 的 mRNA 表达, *PaSYK* 在皮肤中的表达量最高, 随后依次为头肾、鳃、肝、脾、肠(图 3a)。腹腔感染鳃弧菌后, 在所有检测的组织中 *PaSYK* 的 mRNA 表达均以时间依赖性方式显著上调。其中, 鳃组织中的 *PaSYK* 表达量在 4hpi 时上调, 24hpi 时表达最高。在脾脏中, 8hpi 时 *PaSYK* 表达上调, 12hpi 时

表达最高, 24hpi 时其表达下降并恢复至正常水平。在头肾中, 8hpi 时 *PaSYK* 表达上调, 并随着感染的持续表达量逐渐增加。在肝脏中, *PaSYK* 表达在 8hpi 时上调至最高, 然后逐渐降低至对照值水平。在 24hpi 时, 肠中的 *PaSYK* 表达上调最高(图 3b—f)。

2.3 *PaSYK* 亚细胞定位分析

HEK293T 细胞转染荧光载体 pEGFP-*PaSYK*, 激光共聚焦显微镜下观察 *PaSYK* 的亚细胞定位(图 4)。结果显示 *PaSYK* 主要分布在细胞质中, 少量分布在细胞膜上, 与 DAPI(细胞核指示剂)无共定位信号。

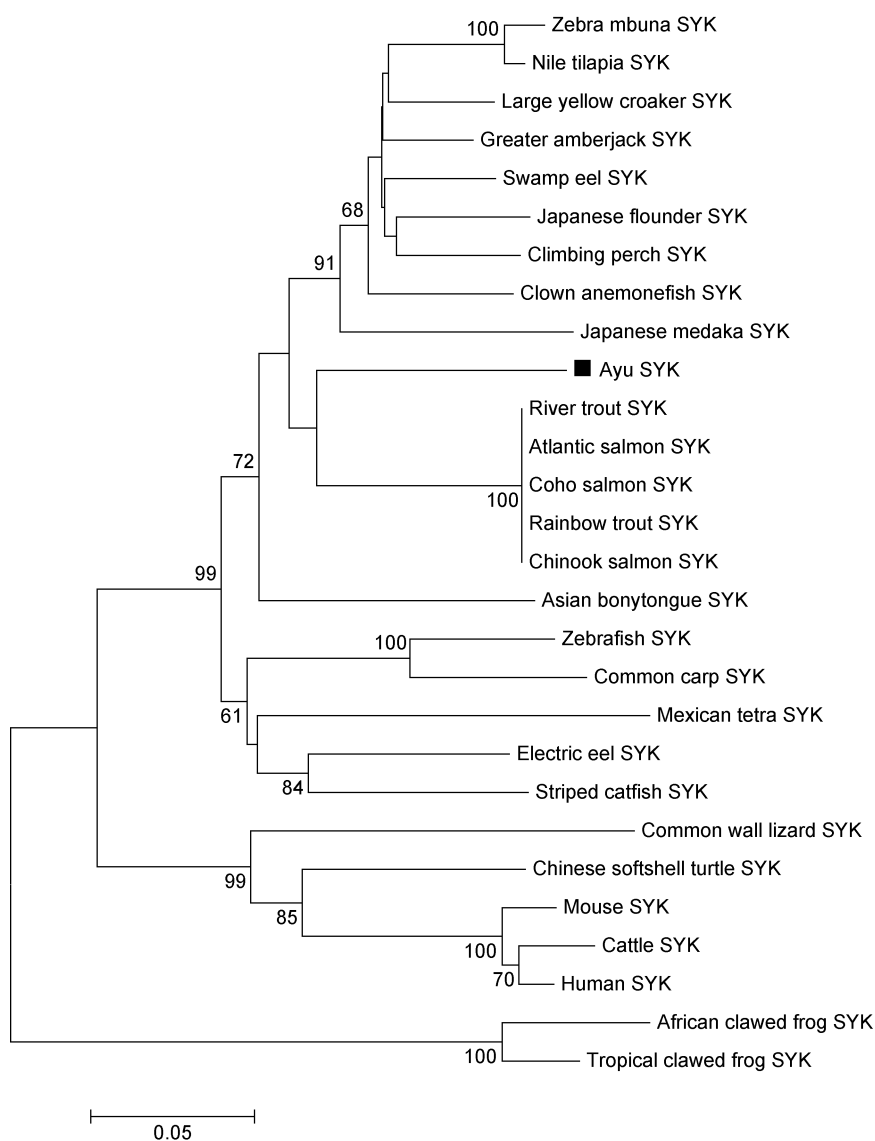


图 2 基于 NJ 法构建的香鱼和其他物种 SYK 的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree analysis of the SYK protein of ayu and other species using the neighbor-joining method

注: 分叉上的数值表示经过 1000 次重复抽样所得出的置信度百分比(仅显示>60%)。标尺长度表示每一位点发生 0.05 次置换。相关序列信息见表 2。香鱼 SYK 的位置标用“■”进行标注

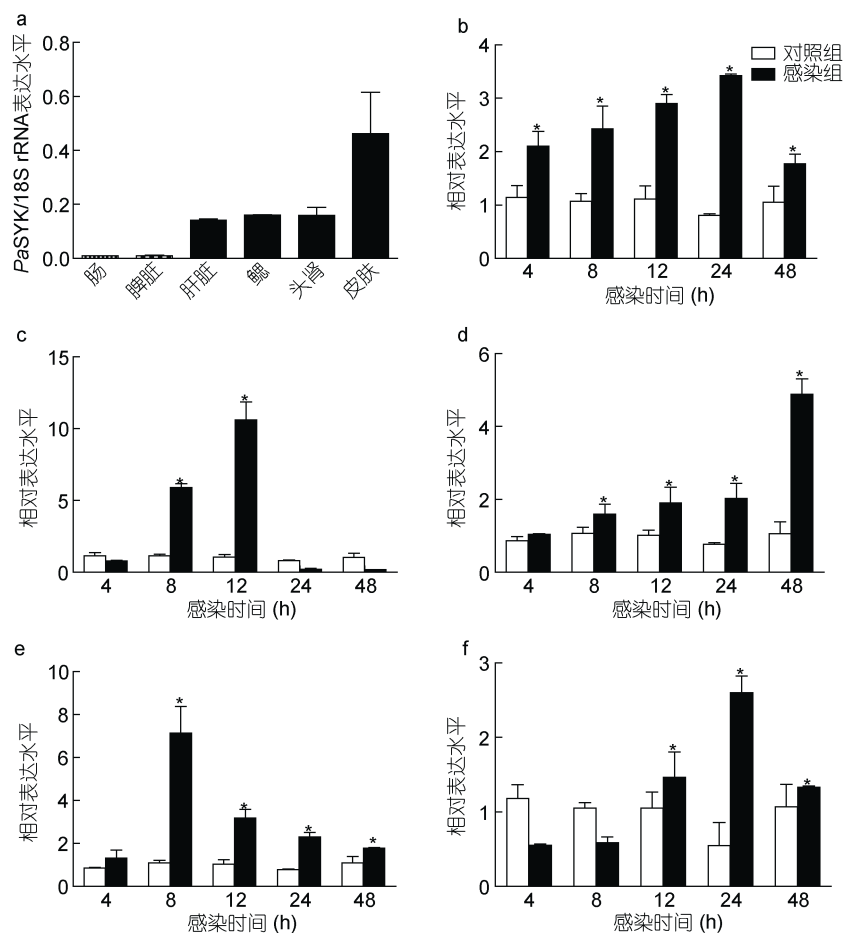


图3 健康香鱼组织和鳃弧菌感染后免疫组织中 *PaSYK* 表达模式

Fig.3 The expression patterns of *PaSYK* in healthy ayu tissues and immune tissues after *V. anguillarum* infection

注: a. 不同健康的香鱼组织(肠、脾、肝、鳃、头肾和皮肤)*PaSYK* 对 18S rRNA 的相对表达。相对表达以三次重复的平均值计算, 每个重复包括三个香鱼样本。b—f. 鳃弧菌感染前后 *PaSYK* 基因 mRNA 的表达差异。PBS 注射组为对照组, 4h PBS 注射组的 mRNA 水平正常化为 1。数据是三次重复结果的平均值±SEM。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

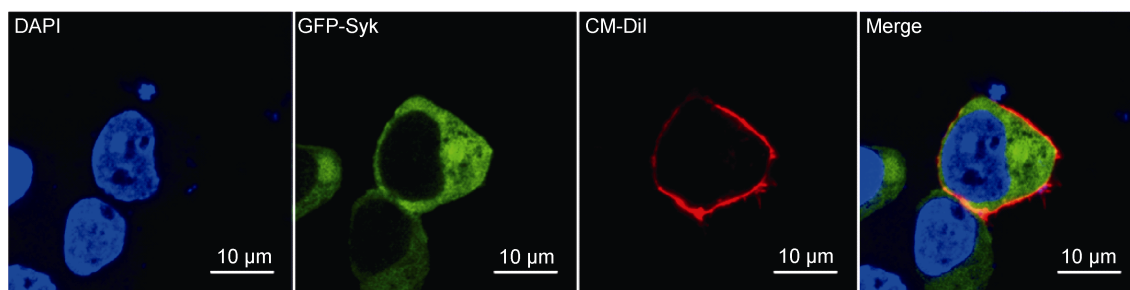


图4 *PaSYK* 亚细胞定位

Fig.4 Subcellular localization of *PaSYK*

注: 比例尺为 10μm, 原始放大倍数×640

2.4 *PaSYK* 对炎症细胞因子 mRNA 表达的影响

炎症是机体受到病原体破坏或入侵时炎症细胞被激活, 并分泌多种炎症细胞因子的保护反应。促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 以及抑炎因子 TGF- β 、IL-10 是巨噬细胞分泌的重要炎症因子。研究 TNF- α 、IL-1 β 、

TGF- β 和 IL-10 的 mRNA 表达水平, 旨在探讨 *PaSYK* 对机体炎症反应的调控作用。结果显示, 在香鱼头肾 MO/M Φ 中, *PaSYK* 过表达后会显著诱导 TNF- α 和 IL-1 β 的表达, 对抑炎因子的表达没有起促进作用甚至有略微的抑制(图 5a—d)。

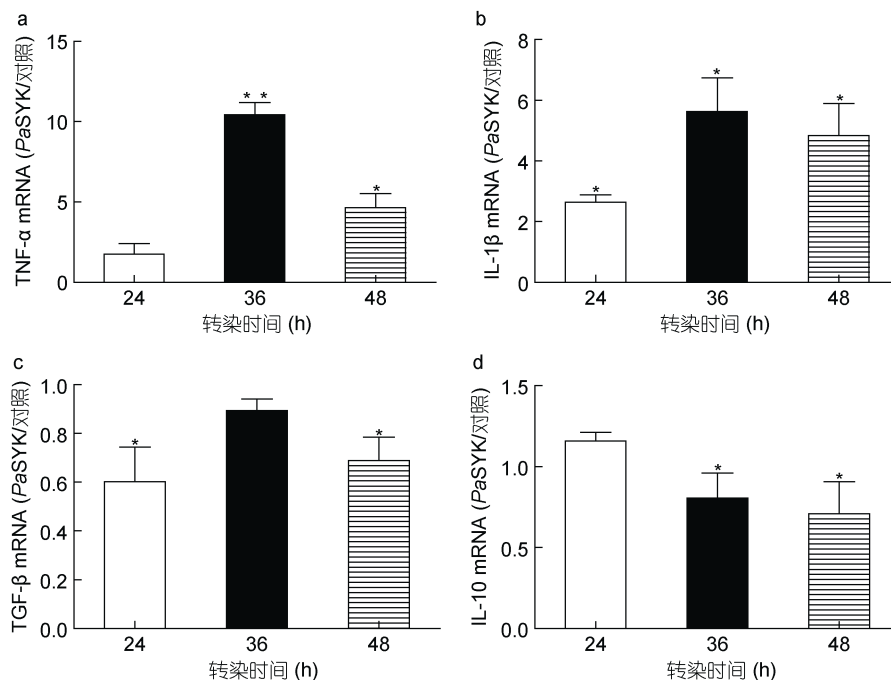


图5 *PaSYK* 影响炎症细胞因子 mRNA 表达

Fig.5 The cytokine mRNA expression affected by *PaSYK*

注: 数值为平均值±SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 *PaSYK* 活化 MAPK 信号通路

我们进一步研究了 SYK 活化的信号通路是否在进化过程中具有保守性。MAPK 信号通路是哺乳动物 SYK 激活的经典信号通路。我们分别在 HEK293T 细胞及香鱼头肾 MO/MΦ 中转染 SYK 以研究三条典型的 MAPK 信号通路 p38 MAPK、ERK1/2 MAPK 和 JNK1/2 MAPK 的活化情况。结果显示, 在 HEK293T 细胞和香鱼头肾 MO/MΦ 中过表达 *PaSYK* 后均能检测到三种 MAP 激酶的磷酸化, 代表相应的 MAPK 信号通路被激活。在 HEK293T 细胞中, 12hpt 时 p38 的磷酸化水平上升, 在 24hpt 时到达最大值, 随后磷酸化水平降低(图 6a)。ERK1/2 的磷酸化在 12hpt 达到最大值, 随后逐渐降低(图 6b)。JNK1/2 的磷酸化水平也在 12hpt 时呈现上升趋势, 在 36hpt 达到最大值后降低(图 6c)。香鱼头肾 MO/MΦ 在静息状态下能观察到 JNK1/2 磷酸化, 但在一个相对较低的水平(图 6f)。过表达 *PaSYK* 后, p38 和 ERK1/2 的磷酸化在 12hpt 时升高, 24hpt 达到最大值, 随后逐渐降低(图 6d—e)。JNK1/2 的磷酸化也在 12hpt 时显著升高, 24hpt 达到最大值, 随后维持相似的活化程度(图 6f)。

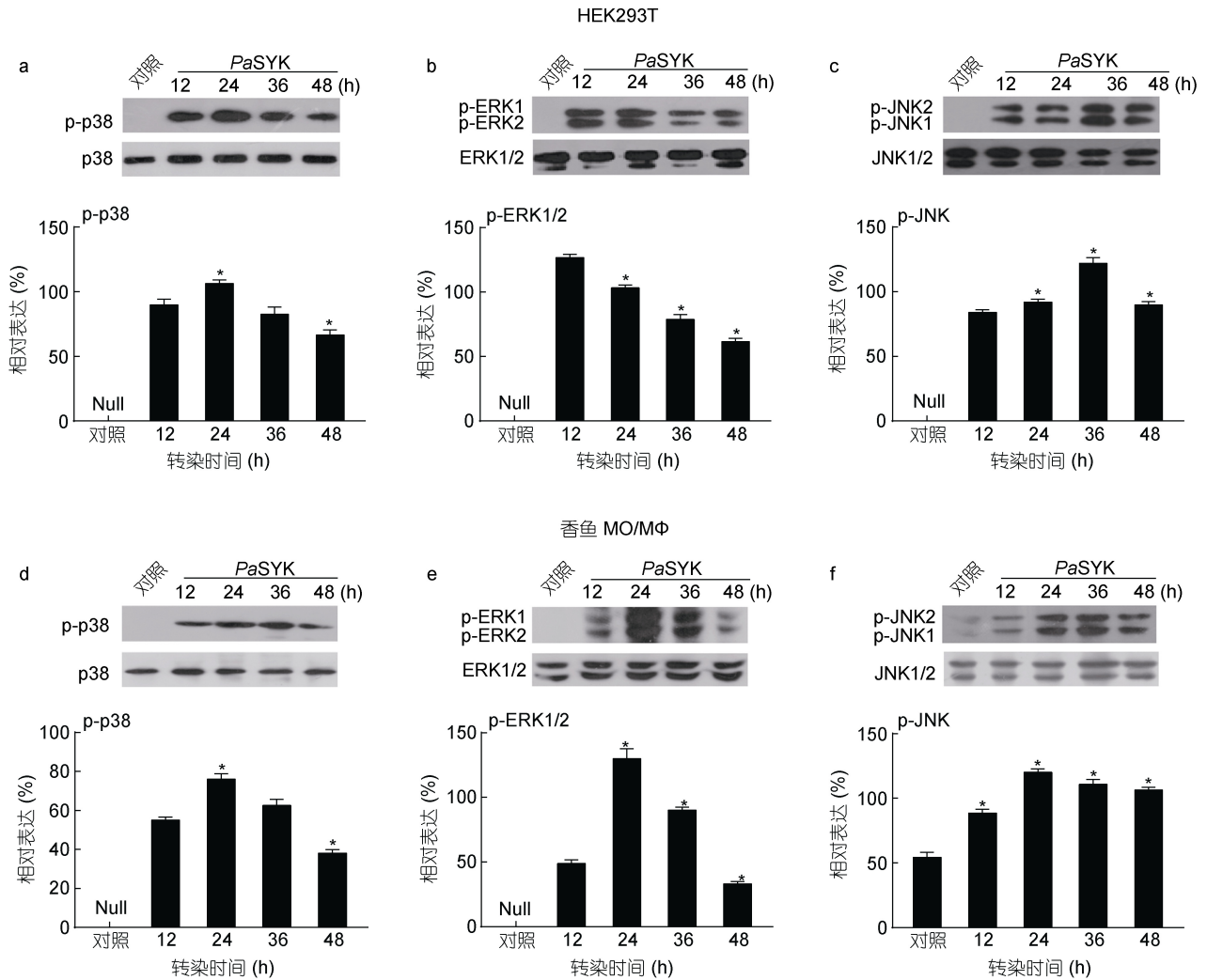
3 讨论

脾脏酪氨酸激酶 SYK 在免疫信号转导中起着关

键的作用。本研究从分子、蛋白质和细胞水平对香鱼 SYK 进行了分析, 结果表明香鱼 SYK 参与了鳃弧菌感染的免疫反应, 并能诱导炎症细胞因子的表达和激活 MAPK 信号通路。

本研究通过香鱼头肾 MO/MΦ 转录组测序结果获得 SYK 基因的 cDNA 序列。多重序列比对分析表明, *PaSYK* 具有典型的 SYK 结构特征, *PaSYK* 包含两个 N 端的 SH2 结构域和一个 C 端的激酶结构域, 这与以往关于人(Law *et al*, 1994)、七鳃鳗(Liu *et al*, 2015)、石斑鱼(Mo *et al*, 2016)、尼罗罗非鱼(Bian *et al*, 2018)等其他物种的报道一致。系统进化树分析表明, 哺乳动物、鸟类、两栖类和鱼类的 SYK 分别成簇, *PaSYK* 位于鱼类 SYK 这一个大簇, 且与河鲈 SYK 进化关系最近。

SYK 基因最开始是由 Taniguchi 等(1991)从猪脾 cDNA 中克隆出来。SYK 在人类的造血细胞中的表达量最高(Yanagi *et al*, 2001)。最初认为 SYK 只在造血细胞中表达, 后来研究发现 SYK 在乳腺上皮细胞(Coopman *et al*, 2000)、气道上皮细胞(Wang *et al*, 2005)、鼻成纤维细胞(Yamada *et al*, 2001)、血管内皮细胞(Crowley *et al*, 1997)、神经样细胞(Tsujimura *et al*, 2001)、肝细胞(Tsuchida *et al*, 2000)及黑色素细胞(Hoeller *et al*, 2005)等非造血细胞中也有广泛表达。

图 6 *PaSYK* 激活 MAPK 信号Fig.6 Activation of MAPK signaling by *PaSYK*

注: HEK293T 细胞(a, b, c)和彩虹鱼头肾 MO/MΦ(d, e, f)用 pcDNA3.1-*PaSYK* 或空白质粒转染。柱状图显示了磷酸化 p38、ERK1/2 和 JNK1/2 与其相应的总蛋白(磷酸化和非磷酸化)的相对带强度的变化。数值为平均值±SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

在七鳃鳗中, SYK 在神经上髓样体和白细胞中表达最高(Liu *et al*, 2015)。在石斑鱼中, SYK 的 mRNA 表达广泛, 其中在肝脏和免疫器官(包括脾脏和肾脏)中高表达(Mo *et al*, 2016), 尼罗罗非鱼与其结果相似(Bian *et al*, 2018)。本研究中, *PaSYK* 的 mRNA 在皮肤中的表达量最高, 随后依次为头肾、鳃、肝、脾、肠。此外, 鳃弧菌感染后鳃、脾、头肾、肝和肠免疫组织 *PaSYK* 基因 mRNA 表达量均呈现上调趋势。

炎症是一种病理过程, 病原体作用于机体后, 不仅会引发细胞的损坏, 也会使系统抗病能力提高, 从而到达清除病原体, 修复受损细胞的作用。在炎症反应中, 细胞能产生炎症细胞因子来抵抗外界的侵袭, TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 和 IL-10 是巨噬细胞分泌的重

要炎症因子。本研究结果表明, 将 SYK 基因转染到彩虹鱼 MO/MΦ 中, 促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达显著上调, 而抑炎因子 TGF- β 和 IL-10 的 mRNA 表达却受到略微的抑制。*PaSYK* 能够显著诱导促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达, 说明机体受到病原体入侵时, SYK 能够参与彩虹鱼头肾 MO/MΦ 的炎症反应。

细胞对外界变化做出的反应是通过一连串胞内信号转导来传导的, 信号通路整合各种信号, 通过基因和生理的改变来应对外界刺激。MAPK 被激活后会参与细胞增殖、分化及凋亡的调节, 并与炎症、肿瘤等多种疾病的发生密切相关(Takada *et al*, 2004)。Ras 作为一种 GTP 酶, 是 MAPK 磷酸化级联反应的主要调节分子。Ras-Raf-MAPK 信号级联是人和哺乳动物

细胞中主要的信号转导系统。有研究表明, 肥大细胞的 Fc ϵ RI 受体与抗原结合后, 依赖 SYK 衔接蛋白 Shc 磷酸化, 从而激活 Ras-Raf-MAPK 级联(Jabril-Cuenod *et al*, 1996)。为了探究香鱼 SYK 是否也能像哺乳动物那样激活 MAPK 信号通路, 本研究将 SYK 转染到 HEK293T 细胞和香鱼头肾 MO/M Φ 中, Western blot 的结果表示, PaSYK 过度表达后三种传统的 MAP 激酶均被激活, 说明 PaSYK 可以激活 MAPK 信号, 其在进化过程中高度保守。

4 结论

本研究从香鱼中克隆得到 SYK 基因, 通过蛋白序列分析发现, 在 SYK 存在典型的两个连接的 SH2 结构域和一个激酶结构域。通过表达分析发现, PaSYK 的表达会受到鳃弧菌感染的影响。亚细胞定位分析发现, PaSYK 分布于细胞质中, 细胞膜上也有少量的分布。RT-qPCR 结果分析发现, PaSYK 的过表达会促进促炎因子的表达并且抑制抑炎因子的表达。Western blot 结果证明, PaSYK 与其哺乳动物中的同源物一样, 能够活化 MAPK 信号通路, 说明了其在进化过程中, 结构及功能的保守性。

参 考 文 献

- 史雨红, 马海玲, 梁亚芳等, 2017. PaCLR 介导 PaLECT2 激活脂多糖刺激的香鱼(*Plecoglossus altivelis*)单核巨噬细胞功能. 海洋与湖沼, 48(3): 583—588
- Berton G, Mócsai A, Lowell C A, 2005. Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. Trends in Immunology, 26(4): 208—214
- Bian X, Wu L T, Mu L L *et al*, 2018. Spleen tyrosine kinase from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Molecular characterization, expression pattern upon bacterial infection and the potential role in BCR signaling and inflammatory response. Fish & Shellfish Immunology, 82: 162—172
- Bolen J B, Brugge J S, 1997. Leukocyte protein tyrosine kinases: potential targets for drug discovery. Annual Review of Immunology, 15: 371—404
- Buhl A M, Cambier J C, 1997. Co-receptor and accessory regulation of B-cell antigen receptor signal transduction. Immunological Reviews, 160(1): 127—138
- Chen J, Chen Q, Lu X J *et al*, 2016. The protection effect of LEAP-2 on the mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*) against *Edwardsiella tarda* infection is associated with its immunomodulatory activity on monocytes/macrophages. Fish & Shellfish Immunology, 59: 66—76
- Coopman P J P, Do M T H, Barth M *et al*, 2000. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. Nature, 406(6797): 742—747
- Crowley M T, Costello P S, Fitzer-Attas C J *et al*, 1997. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages. Journal of Experimental Medicine, 186(7): 1027—1039
- Drummond R A, Saijo S, Iwakura Y *et al*, 2011. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. European Journal of Immunology, 41(2): 276—281
- Hoeller C, Thallinger C, Pratscher B *et al*, 2005. The non-receptor-associated tyrosine kinase Syk is a regulator of metastatic behavior in human melanoma cells. Journal of Investigative Dermatology, 124(6): 1293—1299
- Huang W L, Zhu X F, 2005. Signal Transduction. Beijing: People's Medical Publishing House, 151—199
- Jabril-Cuenod B, Zhang C, Scharenberg A M *et al*, 1996. Syk-dependent Phosphorylation of Shc. A potential link between Fc ϵ RI and the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway through SOS and Grb2. Journal of Biological Chemistry, 271(27): 16268—16272
- Law C L, Sidorenko S P, Chandran K A *et al*, 1994. Molecular cloning of human Syk. A B cell protein-tyrosine kinase associated with the surface immunoglobulin M-B cell receptor complex. Journal of Biological Chemistry, 269(16): 12310—12319
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L *et al*, 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell, 86(6): 973—983
- Liu C, Su P, Li R R *et al*, 2015. Molecular cloning, expression pattern, and molecular evolution of the spleen tyrosine kinase in lamprey, *Lampetra japonica*. Development Genes and Evolution, 225(2): 113—120
- Lu X J, Chen Q, Rong Y J *et al*, 2016. Mobilisation and dysfunction of haematopoietic stem/progenitor cells after *Listonella anguillarum* infection in ayu, *Plecoglossus altivelis*. Scientific Reports, 6: 28082
- Mócsai A, Abram C L, Jakus Z *et al*, 2006. Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. Nature Immunology, 7(12): 1326—1333
- Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz V L J, 2010. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. Nature Reviews Immunology, 10(6): 387—402
- Mo Z Q, Yang M, Wang H Q *et al*, 2016. Grouper (*Epinephelus coioides*) BCR signaling pathway was involved in response against *Cryptocaryon irritans* infection. Fish & Shellfish Immunology, 57: 198—205
- Obergfell A, Eto K, Mócsai A *et al*, 2002. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with α IIb β 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. The Journal of Cell Biology, 157(2): 265—275
- Palacios E H, Weiss A, 2007. Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development. Journal of Experimental Medicine, 204(7): 1703—1715
- Sancho D, Joffre O P, Keller A M *et al*, 2009. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. Nature, 458(7240): 899—903

- Takada Y, Aggarwal B B, 2004. TNF activates Syk protein tyrosine kinase leading to TNF-induced MAPK activation, NF- κ B activation, and apoptosis. *The Journal of Immunology*, 173(2): 1066—1077
- Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J *et al*, 1991. Molecular cloning of a porcine gene Syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 266(24): 15790—15796
- Tsuchida S, Yanagi S, Inatome R *et al*, 2000. Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *The Journal of Biochemistry*, 127(2): 321—327
- Tsujimura T, Yanagi S, Inatome R *et al*, 2001. Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS Letters*, 489(2—3): 129—133
- Uematsu S, Akira S, 2006. PRRs in pathogen recognition. *Central European Journal of Biology*, 1(3): 299—313
- Wang G R, Guo X X, Floros J, 2005. Differences in the translation efficiency and mRNA stability mediated by 5'-UTR splice variants of human SP-A1 and SP-A2 genes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(3): L497—L508
- Vines C M, Potter J W, Xu Y *et al*, 2001. Inhibition of β 2 integrin receptor and SYK kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr. *Immunity*, 15(4): 507—519
- Wong W S F, 2005. Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade for asthma. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(3): 264—271
- Yamada T, Fujieda S, Yanagi S *et al*, 2001. Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production. *The Journal of Immunology*, 166(1): 538—543
- Yanagi S, Inatome R, Takano T *et al*, 2001. Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(3): 495—498
- Zhang J, Berenstein E H, Evans R L *et al*, 1996. Transfection of Syk protein tyrosine kinase reconstitutes high affinity IgE receptor-mediated degranulation in a Syk-negative variant of rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Journal of Experimental Medicine*, 184(1): 71—79
- Zhang L, Nie L, Cai SY *et al*, 2018. Role of a macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) in regulating monocyte/macrophage functions in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 74: 141—151
- Zou W, Reeve J L, Liu Y L *et al*, 2008. DAP12 couples c-Fms activation to the osteoclast cytoskeleton by recruitment of Syk. *Molecular Cell*, 31(3): 422—431

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A SYK HOMOLOGUE FROM AYU, *PLECOGLOSSUS ALTIVELIS*: INSIGHTS INTO ITS CONSERVED ROLE IN MAPK SIGNALING ACTIVATION

SUN Jiao¹, NIE Li¹, MIAO Liang¹, CHEN Jiong^{1,2}

(1. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract Spleen tyrosine kinase (SYK) is a non-receptor tyrosine kinase (NRTK). In mammals, SYK is an important adaptor that plays an essential role in the activation of immune cells, signal transduction of extracellular stimuli, and pathogen recognition etc. However, study regarding the function of this molecule in fish is limited. Therefore, the role of ayu *Plecoglossus altivelis* SYK (*PaSYK*) in pathogen infection and the activation of immune signaling pathways was studied. The cDNA sequence of *PaSYK* was retrieved; Multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis were conducted to analyze the evolutionary status of *PaSYK*. The expressions of SYK in healthy and *Vibrio anguillarum* infected tissues of ayu were revealed in real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). Subcellular localization was conducted in HEK293T cells to detect the cellular distribution of *PaSYK*. We overexpressed *PaSYK* in HEK293T cells and ayu head kidney monocyte/macrophage (MO/MΦ), and its regulatory role on cytokine expression and the activation of MAPK signaling pathway were deciphered. Multiple sequence alignment indicated that the protein sequences and functional domains of SYK were highly conserved during evolution. *PaSYK* was closely related to its homologue of river trout (*Salmo trutta*) as indicated in the phylogenetic tree. RT-qPCR results showed that the mRNA of SYK gene was expressed in all tissues examined, and the expression of *PaSYK* was up-regulated in all tissues detected after *V. anguillarum* infection. Furthermore, *PaSYK* significantly induced the expression of the pro-inflammatory factors TNF- α and IL-1 β , and slightly inhibited the expression of anti-inflammatory factors TGF- β and IL-10. Western blot results demonstrated that, like its homologues in mammals, *PaSYK* could activate the MAPK signaling pathway. Therefore, SYK is highly conserved during the evolution. *PaSYK* and its mammalian homologues have conserved functions, and both could activate MAPK signaling pathway and play a role in inflammatory response.

Key words spleen tyrosine kinase (SYK); ayu *Plecoglossus altivelis*; *Vibrio anguillarum* infection; cytokines; MAPK signaling pathway