

红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*) CD4 和 CD4-2 基因克隆与诱导表达*

黄郁葱^{1,2} 丁 燊^{1,2} 梁秀全^{1,4} 蔡双虎^{1,2} 吴灶和^{2,3} 简纪常^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088; 2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 湛江 524088;
3. 仲恺农业工程学院 广州 510225; 4. 广东省湛江市霞山区农业技术推广中心 湛江 524000)

摘要 应用 RT-PCR 和 RACE-PCR 技术克隆了红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*) CD4 和 CD4-2 基因, 并分析了它们在健康鱼不同组织的表达分布及免疫刺激物诱导后的表达变化。CD4 基因 cDNA 序列全长 2216bp, 包含 180bp 的 5' UTR(untranslated regions)、605bp 的 3' UTR 和 1431bp 的开放阅读框(open reading frame, ORF), 编码 476 个氨基酸; 红笛鲷 CD4-2 基因 cDNA 序列全长为 1520bp, 包含 62bp 的 5' UTR、525bp 的 3' UTR 和 933bp 的 ORF, 编码 310 个氨基酸。CD4 分子由信号肽、4 个免疫球蛋白样结构域(D1—D4)构成的胞外区、跨膜区和胞浆区组成, CD4-2 分子由信号肽、2 个免疫球蛋白样结构域(D1—D2)构成的胞外区、跨膜区和胞浆区组成。荧光定量 PCR (Real Time Quantitative PCR, qPCR)分析显示红笛鲷 CD4 和 CD4-2 基因在健康鱼的胸腺中表达量最高, 其次是中肾、鳃、皮肤、脾、头肾和肠。红笛鲷头肾淋巴细胞体外经脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)和刀豆蛋白 A(Concanavalin A, ConA)刺激 12h 后, CD4 和 CD4-2 表达量显著上调($P < 0.05$)。哈维氏弧菌疫苗免疫 24h 后鳃、头肾、脾脏和肠的表达量显著上升($P < 0.05$)。研究结果为进一步研究鱼类 CD4 和 CD4-2 在抗菌免疫反应中的作用提供了基础资料。

关键词 红笛鲷; CD4; CD4-2; 基因克隆; 诱导表达

中图分类号 Q789 doi: 10.11693/hyhz20161200276

CD4 分子是 T 淋巴细胞重要的表面标志分子之一, 作为 T 细胞辅助受体参与抗原识别和信号转导, 同时还具有调节免疫应答的功能, 在介导机体的适应性免疫应答中起重要作用。哺乳类 CD4 分子为单链跨膜糖蛋白, 属于免疫球蛋白超家族成员, 主要表达于 Th 细胞、调节性 T 细胞、胸腺细胞及某些 B 细胞、EB 病毒转化的 B 细胞、单核/巨噬细胞表面、树突状细胞和脑细胞膜(Parnes, 1989)。哺乳类 CD4 由信号肽、胞外区、跨膜区和胞浆区组成, 胞外区包含 4 个 IgSF 结构域(D1—D4), 其中 D1 和 D3 结构域为 V 样结构域, D2 和 D4 为 C 样结构域。在抗原识别过程中, CD4 分子的 D1 和 D2 结构域可与 MHC II 类分

子非多肽区结合(Parnes, 1989), 有助于增强 TCR 与抗原肽-MHCII 复合物之间的相互作用并辅助 TCR 识别抗原。胞内区的 CXCP 基序是 Src 家族成员酪氨酸蛋白激酶 p56^{lck} 的结合部位, 参与 T 细胞活化、增殖和信号转导(Smith-Garvin *et al*, 2009)。CD4 分子也是人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)受体, 其 D1 结构域可与 HIV gp120 结合。此外, CD4 还是 T 细胞 IL-16 的受体, 可调节 CD4⁺T 细胞的增殖和趋化(Lynch *et al*, 2003)。

2004 年, Suetake 等(2004)首先报道了红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)的 CD4 分子, 继而多种鱼类的 CD4 分子先后得到克隆鉴定(Laing *et al*, 2006;

* 广东省海洋经济创新发展区域示范专项, GD2012-B01-004 号; 广东省自然科学基金项目, 2016A030313748 号; 大学生创新创业训练计划, CXXL2014020 号; 国家自然科学基金项目, 41240041 号。黄郁葱, 博士, E-mail: hyczjou@163.com

通讯作者: 简纪常, 教授, 博士生导师, E-mail: jianjc@gmail.com

收稿日期: 2016-12-14, 收修改稿日期: 2017-01-23

Buonocore *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2013)。研究发现此类鱼类 CD4 分子胞外区大多含有典型的 4 个 Ig 样结构域。此外, 在还发现另一种鱼类特有的 CD4 分子, 该 CD4 分子胞外区仅含两个或三个 Ig 样结构域, 命名为 CD4REL 或 CD4-2 (Dijkstra *et al.*, 2006; Laing *et al.*, 2006; Edholm *et al.*, 2007; Øvergård *et al.*, 2010)。CD4-2 分子与 CD4 分子在染色体上呈线性排列, 分布在 GAPDH、LPREL2 和 TAPBP-R 之间。CD4 分子和 CD4-2 分子在结构上有很多的相似之处, 如 CD4 和 CD4-2 分子胞内区虽然都含有与 p56^{lck} 结合基序, 但鱼类 CD4 和 CD4-2 分子在一些重要结构和组织表达模式存在差异, 因此两者的功能可能并不相同。此外, 有关 CD4 和 CD4-2 在抗菌免疫中的作用及其免疫调节功能仍有待进一步研究加以阐明。

红笛鲷(*Lutianus sanguineus*)是我国南方沿海网箱和池塘养殖重要海水养殖鱼类之一, 然而近年来细菌病和寄生虫病频繁暴发, 严重制约了其养殖业的健康可持续发展(Zhang *et al.*, 2011)。提高机体免疫力是鱼病防治的基础, 探求其免疫防御机制对于鱼病防治具有重要的指导意义。然而, 到目前为止尚未有红笛鲷 T 细胞表面标志基因的报道。本研究克隆了红笛鲷 CD4 和 CD4-2 的 cDNA 全长序列, 应用荧光定量 PCR (Real Time Quantitative PCR, qPCR)检测了 CD4 和 CD4-2 在健康鱼组织中的分布和哈维氏弧菌疫苗诱导后红笛鲷免疫相关组织中的表达变化, 为进一步研究红笛鲷 T 细胞免疫功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

健康红笛鲷购自湛江南三岛某海水养基地, 体质量约 100g/尾, 活力好, 摄食正常, 暂养于水温 25—28°C 的海水养殖试验水泥池中, 24h 连续充氧, 每天早晚投喂商品配合饲料各一次, 日换水量三分之一。暂养 1 周后用于实验。

1.2 哈维氏弧菌疫苗的免疫及样品采集

将哈维氏弧菌强毒株 ZJ0603 接种于 TSB (2% NaCl)培养基中, 28°C 振荡培养 12h, 用平板计数法计数菌液浓度, 剩余菌液缓慢加入 0.3%福尔马林, 28°C 灭活 24h, 灭活完全后将哈维氏弧菌疫苗菌液用 PBS (0.01mol/L, pH 7.4)调整浓度为 1×10^9 CFU/mL, 置 2—8°C 保存备用。将实验鱼分成 2 组, 免疫组每尾鱼腹腔注射哈维氏弧菌疫苗菌液 0.2mL, 对照组注射等

量无菌 PBS, 于免疫后的 4、8、12、24、48 和 72h 分别采集胸腺、头肾、脾脏、肝脏、鳃、皮肤、后肾和肠 8 个组织, 每个时间点采集 5 尾红笛鲷, 置于 RNAlater -80°C 保存备用, 收集的组织主要用于荧光定量分析。同时取 5 尾健康鱼的胸腺、鳃、头肾、肝、脾、中肾、心脏、肠、脑、胃、皮肤和肌肉组织立即置液氮中, 用于 cDNA 全长克隆和组织表达分析。

1.3 头肾淋巴细胞的制备及体外刺激试验

分别取 5 尾健康红笛鲷用 MS-222 麻醉后, 75%酒精短暂全身浸泡消毒, 无菌条件下取出头肾组织, 迅速置于 RPMI1640(含 100U 青霉素, 100μg/mL 链霉素和 0.5%胎牛血清), 用无菌的剪刀将其剪成小块后置于 100 目的无菌细胞筛网上, 用一次性无菌的注射器头轻轻研磨头肾组织, 用 RPMI1640 冲洗筛网, 去掉细胞碎片, 获取头肾细胞悬液备用。用无菌枪头吸取 2 mL 头肾细胞悬液沿管壁小心缓慢地加到等 34%和 51%不连续密度梯度 Percoll 细胞分离液界面上。于 4°C、500g 离心 30min, 小心吸取两层 Percoll 细胞分离液中间层白细胞, 用 RPMI1640 洗涤 2 次, 再用血球计数板进行计数, 调整所收集到的细胞悬液浓度为 5.0×10^5 , 以每孔接种 1mL 接种到 24 孔板中, 25°C 培养 4h, 收集细胞悬液后, 重新接种到新的 24 孔板中。分别在每孔中加入终浓度分别为 10μg/mL 的脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)和刀豆蛋白 A (Concanavalin A, ConA), 空白组加入 PBS, 每种处理组设 3 个平行, 分别于 4、8、12 和 24h 取样。将样品于 4°C、500g 条件下离心 10min 去除培养基, 加入 500μL TRIzol -80°C 保存备用。

1.4 总 RNA 提取和 cDNA 一链合成

参考 TRIzol(全式金)说明书分别提取红笛鲷各组织总 RNA, 紫外分光光度计测定其浓度, 使其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8—2.0。按照 M-MLV(TaKaRa)说明书合成 cDNA 一链。另取脾脏的总 RNA, 按 RACE 试剂盒(Clontech)说明书分别合成用于 RACE-PCR 的 cDNA 一链。

1.5 红笛鲷 CD4 和 CD4-2 cDNA 克隆

1.5.1 基因部分序列克隆 依据 GenBank 已提交的鱼类 CD4 基因 cDNA 序列的保守区域设计简并引物 CD4F 与 CD4R(表 1), 运用降落 PCR 从红笛鲷头肾 cDNA 第一链中扩增红笛鲷 CD4 基因的部分序列, 反应条件为: 95°C 预变性 3min, 94°C 30s, 62°C 30 s, 72°C 1min 5 个循环; 94°C 30s, 59°C 30s, 72°C 1min 5 个循环; 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 1min 25 个循环,

72°C 延伸 6min。PCR 产物经 1.2%琼脂糖电泳, 目的条带切胶后用 GeneJET Kit (Thermo Scientific)进行回

收, 与 pMD-19T 载体连接后转化 DH5 α 感受态, 阳性菌落送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 本研究所用的引物
Tab.1 Primers for cloning and expression

引物名称	引物序列(5'—3')	用途
<i>CD4F</i>	GGMGAGTGGACCTGTGKGTGAC	克隆中间序列
<i>CD4R</i>	TTCCGTTGTYTGCGTCGGTAGAG	
3' <i>CD4F1</i>	TCGGTACAGGAGATGGCGAAAGTGGAA	3'RACE-PCR
3' <i>CD4F2</i>	CCTCCTCCTCCTCGTCTTCATCTCT	
3' <i>CD4-2F1</i>	GAGTTGGCTGCCTGGTTGTGATTCT	5'RACE-PCR
3' <i>CD4-2F2</i>	CCTGCTGGTTGCTATTATTTGCTTG	
5' <i>CD4R1</i>	ACTTCCACTTCCGCCATCTCTCT	5'RACE-PCR
5' <i>CD4R2</i>	GTCAATAACCGTAACAGAGGCA	
5' <i>CD4-2R1</i>	ATCACAACCAGGCAGCCAACTCCAA	5'RACE
5' <i>CD4-2R2</i>	TCCAGCATCTTCTTCTTCACTCCA	
SMART II A Oligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	5'RACE
5'-RACE CDS Primer	(T)25VN	
3'-RACE CDS Primer A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN	3'RACE
UPM-Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'RACE、3'RACE
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	荧光定量 PCR
re <i>CD4F</i>	TCACTTCTCCTGGGAACAAATCA	
re <i>CD4R</i>	TGTAGTCTCCGCTGTCGTCTTCT	荧光定量 PCR
re <i>CD4-2F</i>	GCAGATGTCCCAAGTGTCCCAAAC	
re <i>CD4-2R</i>	ACAACCAGGCAGCCAACTCCAAC	荧光定量 PCR
β -actinF	GTCATGTGGATCAGCAAGCAGGA	
β -actinR	CGCCCCGAGTGTGTATGAGAAATG	

1.5.2 3' RACE和5' RACE 根据简并引物扩增获得的 *CD4* 基因部分序列和红笛鲷头肾转录组高通量测序获得 *CD4-2* 基因部分序列设计特异性巢式 3'RACE 和 5'RACE 引物(表 1)。将 3'*CD4F1*、3'*CD4-2F1* 和 5'*CD4R1*、5'*CD4-2R1* 分别与 UPM Mix 引物进行 3' RACE 与 5' RACE 第一轮降落 PCR 扩增。反应条件为: 95°C 预变性 3min, 94°C 30s, 68°C 2min 5 个循环; 94°C 30s, 65°C 30s, 72°C 2min 5 个循环; 94°C 30s, 62°C 30s, 72°C 2min 25 个循环, 72°C 延伸 6min。将第一轮 PCR 产物稀释 10 倍为模板, 将 3'*CD4F2*、3'*CD4-2F2* 和 5'*CD4R2*、5'*CD4-2R2* 分别与 NUP 进行第二轮 PCR 扩增, 反应条件为: 95°C 预变性 3min, 94°C 30s, 65°C 30s, 72°C 2min 30 个循环, 72°C 延伸 6min。PCR 产物回收和测序同 1.5.1。

1.6 生物学信息分析

Blast 程序进行序列同源性分析; protparam 软件预测分子量(Mw)和理论等电点(pI)等; SignalP 4.0

Server 软件预测蛋白质分子信号肽; TMHMM Server 2.0 软件预测蛋白质分子跨膜区; NetGlyc1.0 软件预测蛋白质分子 N-糖基化位点; SMART 软件分析蛋白质功能结构域; Clustalw 2 及 MEGA 5.0 软件以邻位相连法(Neighbor-Joining) 构建系统发育树。物种 *CD4* 分子序列号见表 2。

1.7 荧光定量 PCR 和数据统计与分析

将合成的 cDNA 第一链以 1 : 5—10 稀释后作为 qPCR 的模板, 根据红笛鲷 *CD4* 和 *CD4-2* 基因 ORF 设计 qPCR 引物 re*CD4F*、re*CD4R* 和 re*CD4-2F*、re*CD4-2R*(表 1), β -actin 作为内参基因, 反应和分析在 Bio-Rad iQ5 实时荧光定量 PCR 仪进行。每个样本设 3 个平行。qPCR 反应条件为: 95°C 20s, 62°C 20s, 72°C 20s, 40 个循环。通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算红笛鲷 *CD4* 和 *CD4-2* 基因的相对表达量, 应用 SPSS 11.0 for windows 软件对获得的实验数据进行 ANOVA 单因素方差分析和 Tukey HSD 多重比较。*表示与同期

表 2 不同物种 CD4 分子 GenBank 登录号
Tab.2 GenBank accession numbers of CD4 in different species

种名	缩写	GenBank 登录号	
		CD4	CD4-2
红笛鲷 <i>Lutjanus sanguineus</i>	<i>L. sanguineus</i>	KF285565	KY020127
舌齿鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>D. labrax</i>	CAO98732	
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	<i>L. crocea</i>		XP_010733308
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>P. olivaceus</i>	BAM65615	BAM65615
大西洋庸鲽 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	<i>H. hippoglossus</i>	ACM50925	ACM50925
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	<i>T. rubripes</i>	BAD37152	
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>O. mykiss</i>	AAY42068	AAY42068
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	<i>D. rerio</i>	NP_001128568	
白鲸 <i>Delphinapterus leucas</i>	<i>D. leucas</i>	AAD23738	
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	<i>G. gallus</i>	NP_989980	
智人 <i>Homo sapiens</i>	<i>H. sapiens</i>	NP_000607	
小鼠 <i>Mus musculus</i>	<i>M. musculus</i>	NP_038516	
绿河豚 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>T. nigroviridis</i>		BAD37152

对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 CD4 和 CD4-2 基因的 cDNA 克隆与序列分析

红笛鲷 CD4 基因 cDNA 全长 2216bp (GenBank 登录号: KF285565), 包含 180bp 5' UTR、1431bp ORF 和 605bp 3' UTR, 推导编码 476 个氨基酸, 预测分子量和等电点分别为 53.02kDa 和 9.44。红笛鲷 CD4 分子含有 4 个 N-糖基化位点。红笛鲷 CD4-2 基因 cDNA 全长为 1520bp (GenBank 登录号: KY020127), 包含 62bp 5' UTR、933bp ORF 和 525bp 3' UTR, 推导编码 310 个氨基酸, 预测其蛋白分子量和等电点分别为 33.80kDa 和 9.69。红笛鲷 CD4-2 分子不含有 N-糖基化位点。

红笛鲷 CD4 和 CD4-2 均属于 I 型跨膜蛋白分子, 包含信号肽、胞外区、跨膜区和胞浆区四个结构域。CD4 分子胞外区为 4 个 Ig 样区(D1-C1-D2-C2)。红笛鲷的胞外区含有 7 个在鱼类或与哺乳动物之间保守的 Cys 残基(Cys¹⁰¹, Cys¹⁴¹, Cys¹⁸⁵, Cys²²⁵, Cys³¹⁰, Cys³⁴⁹ 和 Cys³⁹⁹)。CD-2 分子蛋白胞外区包含 2 个 Ig 样区(D1-D2)和连接肽区。红笛鲷的胞外区含有 6 个在鱼类保守的 Cys 残基(Cys³⁴, Cys⁹⁴, Cys¹²⁷, Cys¹⁶⁸, Cys²¹³ 和 Cys²¹⁶)。鱼类中保守的色氨酸残基和 CXXC 基序分别存在于 CD4-2 分子的 Ig 样区(D1—D2)和连接肽区。在红笛鲷 CD4 和 CD4-2 胞浆区均存在高度保守的 p56^{lck} 的结合位点 CXC 基序(图 1, 图 2)。

2.2 CD4 和 CD4-2 氨基酸序列同源性比较及系统发育分析

利用 BLAST 程序将红笛鲷 CD4 和 CD4-2 的氨基酸序列与 NCBI 数据库已登录的其他物种的 CD4 和 CD4-2 分别进行同源性比较, 结果显示红笛鲷与其他物种的 CD4 具有不同程度的同源性, 与斜带石斑鱼的 CD4 同源率最高达 58.5%, 与智人(*Homo sapiens*)的同源性最低为 21.7%(图 1)。其中红笛鲷 CD4-2 和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的 CD4-2 同源率最高达 56.2%, 与其他鱼类的 CD4-2 同源率达 39.2%—48.6%(图 2)。利用 MEGA 6.0 的 Neighbor-joining 法构建系统进化树, 结果如图 3 显示, 鸟类和哺乳动物聚成簇, 与鱼类形成独立的进化分支。红笛鲷 CD4 和 CD4-2 与硬骨鱼鲈形目的斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)及大黄鱼聚为一支, 表明它们亲缘关系最近, 与鸟类和哺乳类遗传距离较远, 七鳃鳗(*Petromyzon marinus*)CD4 与其他鱼类的 CD4-2 聚在一起, 表明该分子可能是已知 CD4 分子的原基。

2.3 CD4 和 CD4-2 在健康红笛鲷组织中的分布

应用 qPCR 技术检测 CD4 和 CD4-2 在健康红笛鲷不同组织中的表达水平, 结果显示, CD4 和 CD4-2 在鳃、头肾、肝、脾、肾、心脏、肠、脑、胃、皮肤和肌肉等组织中均有表达, 在胸腺的表达量最高, 其次为中肾、鳃、皮肤、脾、头肾和肠, 其他组织表达量较低(图 4)。

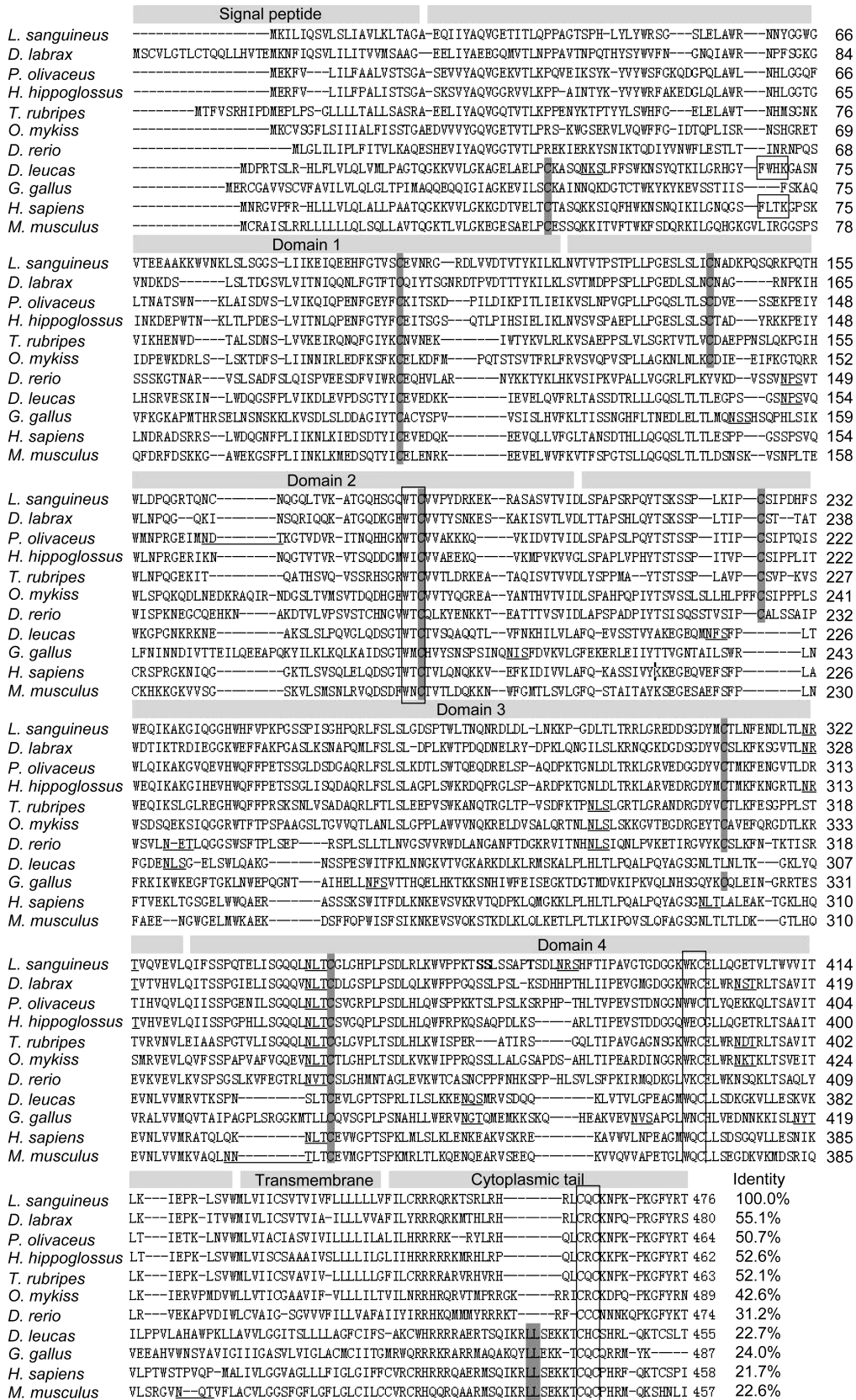


图 1 红笛鲷 CD4 与其他物种 CD4 氨基酸序列比较

Fig.1 Multiple alignments of snapper CD4 and other species CD4 sequences

注: 保守氨基酸以灰色背景突出显示, 功能基序加方框显示, 预测的 N-糖基化位点以下划线进行标示

	Signal peptide	Domain 1	
<i>L. sanguineus</i>	MKTV--VLFQVLSALSAA--GIVIVTKPGESVTLDCGVSSPQSLEEHYKNG---EQSKGVKVDIAQRSLR--QTSL		78
<i>L. crocea</i>	MKML--VWFGLVGLSAA--GNVFTKPEQTVTLDCGVNFRGSLERRGDQ---RIFSVDCGKT QFKK CTIDIVSRSYDR--TNTL		79
<i>P. olivaceus</i>	MNVI--VLFQVLSALSAA--ATVILTKPRQSVTLDCGVRTYKNSLGVYHKDA---LIYEIEG--NFVPRKG--VMKDRSSVRHNSL		77
<i>H. hippoglossus</i>	MNVI--VCLGFVGLSAA--ATVPHTKPRQVTLDCGVDSYSRVAVSHRDE---LIQIDKKS QFPRK DPAAIKERTKLRKDKNL		80
<i>T. nigroviridis</i>	MKKIGRLFAFLLAVLSAPPADGDVIVGKPCGRVAFROGLPRGGFLGVYHQEN---VVYREDARTGIPQRKGDICLRATR--QMTL		85
<i>O. mykiss-2a*01</i>	MKTLs--WVVFALCILHVV--GEVIYKRIGLPMIDCGVKTSNKDMESHKAVGGSSKSVLIVDFYFKNGKERRKGNAPMVERAKVR--RDRL		85

	Domain 2	
<i>L. sanguineus</i>	TINGVKEEDACKFTCVVDGRSQDVTLVVSVSASPSTELQVSGATLQ QV SGLNFDLTVQWKGPGGQVE---KGSPVQ--LKSVARSDAG	164
<i>L. crocea</i>	EVRRVKLEDAKCKFTCVADGNTKEHTLLVSVSTNPSGLDHLGSEVALT QV SGLDTAPAVHWKGFQDKLN---SGS---LKSVARSDAG	162
<i>P. olivaceus</i>	VISAVRNEDSGMFTCKADGVSHKHTLLVSVSASPSEELQVSG SL TLQ QV EVKGLDLHPVQWKGPDGRKH---TGSPNV--LKTVTLSDAG	163
<i>H. hippoglossus</i>	EISDVRRDACAFTCEADGRSHAHTLLVSVSASPSEELQVSGVTLQ QV EVAGLNFDSTVQVMRFDGSAH---EGSDTVHLNPAASDSC	167
<i>T. nigroviridis</i>	EIRDLEKTDAGTFTCKKNLQSEHQQLIVITVSA SPSASLQ LG CTATLQ QV RVKGNLEFEVWRKKFDGSLY---SGSKDADLTEVARSDBC	172
<i>O. mykiss-2a*01</i>	EISALNDGDAGLYICKVDGKMDHRLDIVTVKVPNSLNEGNNAILE QV TGVDFLPSVEVWSPGGKVEGAPRGPGRNVSFSSVALSDTC	177

	Connecting peptide	Transmembrane	
<i>L. sanguineus</i>	T TE CTFSHP EG THSVRL E INVQ EP PTTRAPADVPSVPNQNSKDDQKKN Q STONKT--PKAG---ELLGLSWM W VVIGVGC L VVILLVA I		251
<i>L. crocea</i>	T TK CEFSHG Q TYSE S IDI K VIDP TF PPPPPPCP S Q S FP S HK T Q EP NC T AN--PPSGA--SDLLGL K W W V W AV I GVGC L V M ILL M V F V I		250
<i>P. olivaceus</i>	T TK Q MS IG CV MY S ED L K I K VE EP--AV TF PP PD ----Q S K V NT ET S CP NC T CTG--TTGC---CG Q LD W W W AV A GV AG CV V V L L M V L V I		242
<i>H. hippoglossus</i>	T TE CAF SH GG ET Y R E K L D VR V K D P V SP T SP AV ---RT SE F NG TC FP SC AD --PL GW ---W CL GW W V AA AG AG CL V V L L M V L V I		247
<i>T. nigroviridis</i>	T TE NC IF D Y Q R Q Y CE T L D I H V I AP---FP AP ---V T SR CP CP NP PK Q DC AN GR VP CP SP S PL CL SW W W V I GV CL V L V L V F V I		255
<i>O. mykiss-2a*01</i>	E IT Q IT Q DE K TH KE T Q T IN V RS LL PN D G Y D Q GH S GP N SD V HT VT Q HH CT K GS--Q Q F VE W W PM L GL SL W W V AV GA GC L V GL L L V IT V		268

	Cytoplasmic tail	Identity
<i>L. sanguineus</i>	CLYKRIK RR K RR LQ--K M K N S R L P L T T N L Y Q Q C NR PT AA AK P Q Q RR RR EP S AP FL Q --L L M E	310 100.0%
<i>L. crocea</i>	CLCKKIK TK R RR LQ--K M R N S R Q--F P K Y Q Q NR PT A W G K P Q Q RR RE K PS AP L Q PL L E	308 56.2%
<i>P. olivaceus</i>	ILCRRIR RR K R K L Q--K K NG R Q S Q G P K N Y Q Q C NR PA AA KA Q R G R Q K RP ST L AL K PL L KE	302 48.6%
<i>H. hippoglossus</i>	VLCRRIR RR K R K W Q N K M K NG Q RS A RS K TY Q Q C NR PA AE K P Q GR Q K AR P ST L AQ P LL R E	308 43.8%
<i>T. nigroviridis</i>	CLYKRIQ RR K R K L R--R M EN S R Q L M N K Q Y Q Q DR PA AA K P Q Q --AC E R AL G PP R H ---	309 46.2%
<i>O. mykiss-2a*01</i>	LLHRRNK I M K R R DR--K M K N IR V P L K S N D Y Q Q C NR--T LE GP PR RT Q RE K PS AG PR Q Q R ---	323 39.2%

图 2 红笛鲷 CD4-2 与其他物种 CD4-2 氨基酸序列比较

Fig.2 Multiple alignments of snapper CD4-2 and other species CD4-2 sequences
注: 保守氨基酸以灰色背景突出显示, 功能基序加方框标示, 预测的 N-糖基化位点以下划线标示

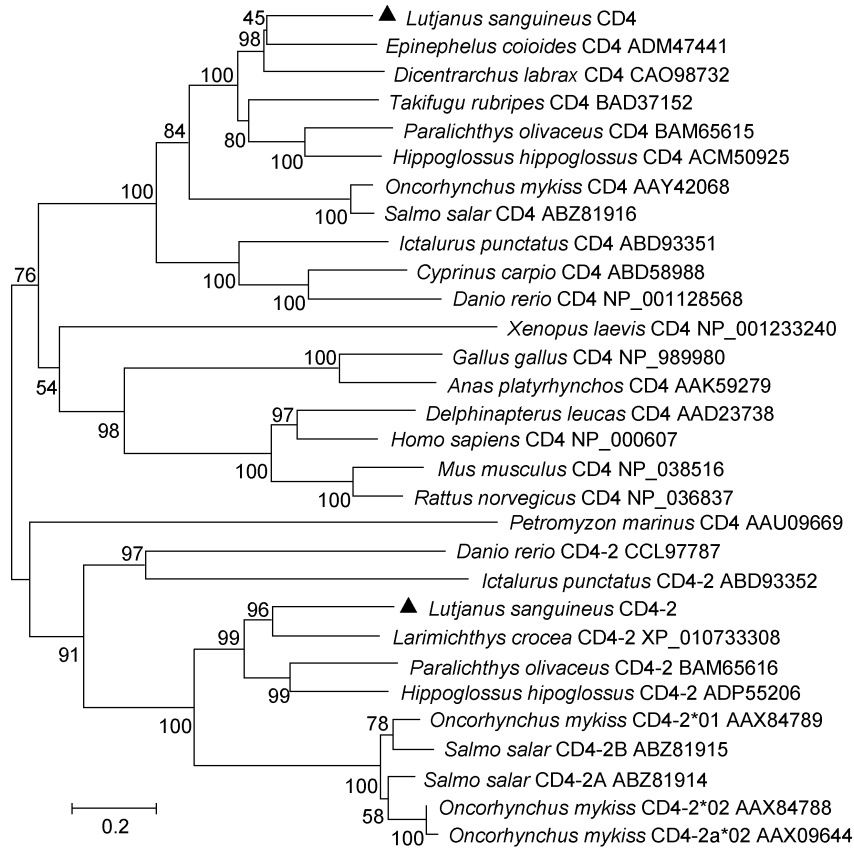


图 3 邻接法构建的红笛鲷与其他物种 CD4 和 CD4-2 分子系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of CD4 and CD4-2 snapper and other vertebrate constructed in neighbor-joining algorithm

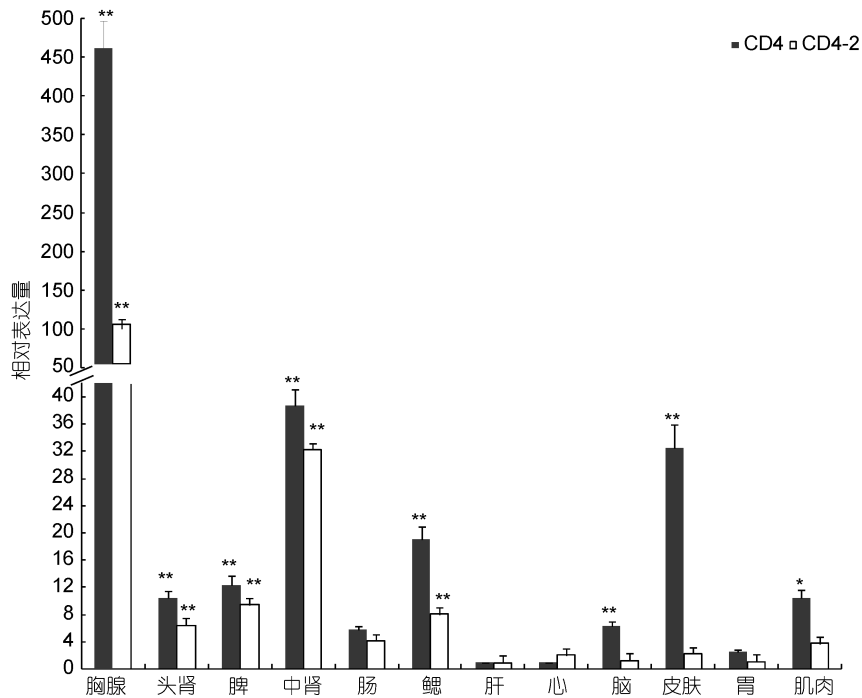
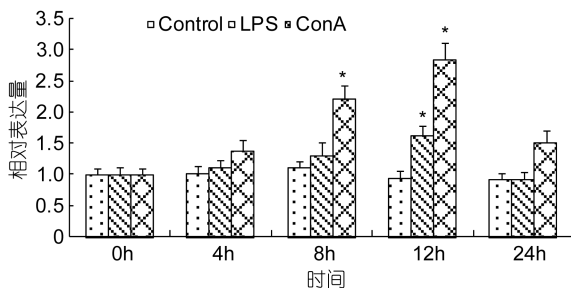
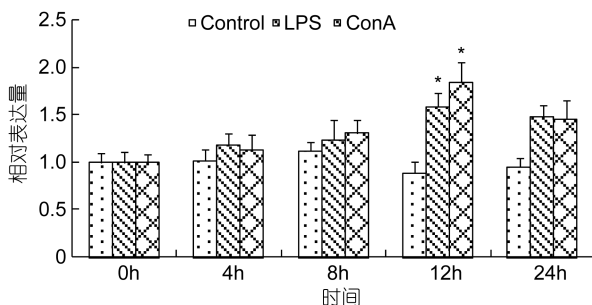


图4 红笛鲷 CD4 和 CD4-2 的组织分布

Fig.4 Tissue distribution of snapper CD4 and CD4-2

图5 红笛鲷头肾淋巴细胞在两种免疫刺激剂体外刺激后 *CD4* 基因的表达变化Fig.5 Snapper *CD4* expression analysis of cultured head kidney leukocytes after *in vitro* stimulation with LPS and ConA图6 红笛鲷头肾淋巴细胞在两种免疫刺激剂体外刺激后 *CD4-2* 基因的表达变化Fig.6 Snapper *CD4-2* expression analysis of cultured head kidney leukocytes after *in vitro* stimulation with LPS and ConA

2.4 淋巴细胞体外刺激后 *CD4* 和 *CD4-2* 的表达变化

红笛鲷头肾淋巴细胞在体外经 LPS 和 ConA 刺激

后, *CD4* 和 *CD4-2* 表达量在试验期间内均有明显的升高(图 5, 图 6)。在刺激后 4h, *CD4* 的表达量开始升高, LPS 处理组在 12h 达到最高, 与对照组有显著差异 ($P < 0.05$), ConA 处理组的 *CD4* 的表达量在 8h 和 12h 时较高, 与对照组有显著差异 ($P < 0.05$), 然后逐渐下降至正常表达水平。与 *CD4* 的表达相类似, LPS 处理组和 ConA 处理组的 *CD4-2* 在刺激后开始轻微上调表达, 并在 12h 达到最高表达水平, 与对照组有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.5 灭活哈维氏弧菌免疫红笛鲷后 *CD4* 和 *CD4-2* 基因的表达分析

应用荧光定量 PCR 检测了哈维氏弧菌疫苗免疫后 4、8、12、24、48 和 72h 后 *CD4* 和 *CD4-2* 在红笛鲷鳃、头肾、脾脏和肠的表达变化。结果显示, 哈维氏弧菌疫苗免疫后的 8h, *CD4* 基因在鳃和肠中显著上调表达 ($P < 0.05$), 并在 12h 达到最高, 在头肾和脾脏中的表达量均于 24h 达到最高 ($P < 0.05$) (图 7, 图 8)。*CD4-2* 基因表达量在鳃和肠于免疫后的 12h 达到峰值 ($P < 0.05$), 在头肾和脾脏则于 24h 达到峰值 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究通过 RACE-PCR 技术获得了红笛鲷 *CD4* 和 *CD4-2* 的 cDNA 全长序列, 分别编码 462 和 223 个氨基酸, 与已发现的其他鱼类和哺乳动物的 *CD4*

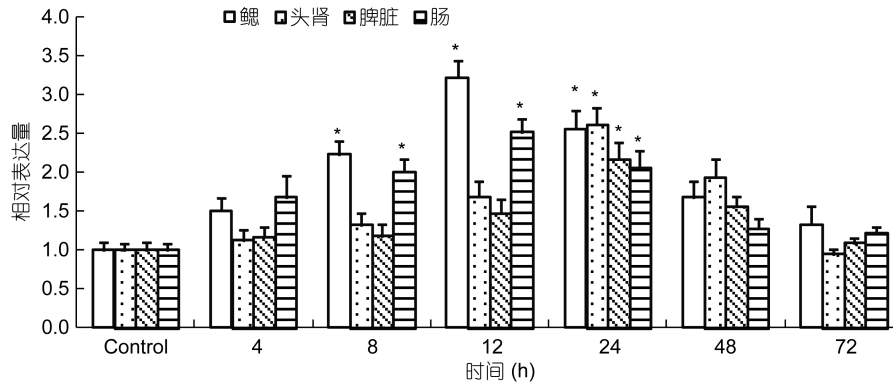


图7 哈维氏弧菌感染后鳃、头肾、脾和肠中 CD4 的表达

Fig.7 The relative expression level of CD4 in gills, head kidney, spleen and intestine after *V. harveyi* immunization

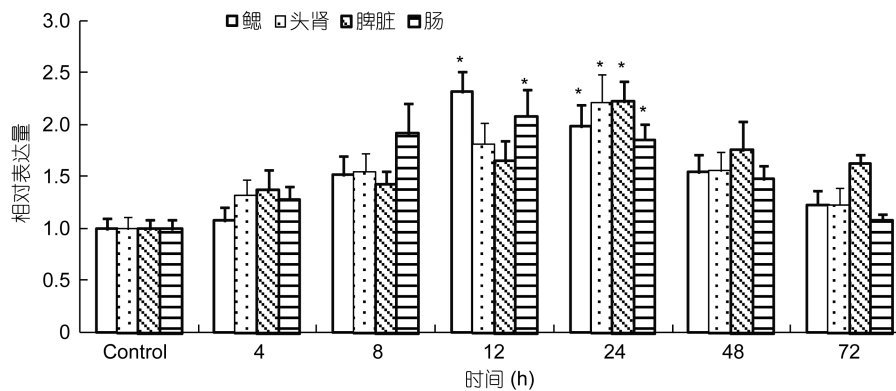


图8 哈维氏弧菌感染后鳃、头肾、脾和肠中 CD4-2 的表达

Fig.8 The relative expression level of CD4-2 in gills, head kidney, spleen and intestine after *V. harveyi* immunization

结构相类似,红笛鲷 CD4 和 CD4-2 分子均含有信号肽、胞外区、跨膜区和胞浆区,具有一些高度保守的氨基酸残基、N-糖基化位点和功能基序,对于 T 细胞分化、成熟和信号转导起关键作用(Parnes, 1989)。

红笛鲷 CD4 胞外区主要是由 4 个 Ig 样结构域 (D1-D4) 构成。除 D1 区外,其他 3 个区都含有两个保守的半胱氨酸残基,用以形成具有稳定 Ig 折叠作用的结构域内二硫键。与哺乳动物和鸟类不同的是,鱼类的 D1 区只含有一个半胱氨酸残基,该区域不能形成二硫键连接。在 D2 和 D4 区,鱼类和哺乳动物的半胱氨酸残基相对比较保守,但斑马鱼、白鲸和鸟类 D2 区却缺少一个半胱氨酸残基,导致鱼类 CD4 分子在空间构象上可能不同于高等脊椎动物 CD4 分子 (Romano *et al*, 1999)。由于 D1 与 D2 是 CD4 分子在抗原识别过程中与 MHC II 分子主要结合部位 (Clayton *et al*, 1989; Huang *et al*, 1997), 因此不同物种 CD4 分子构象不同可能影响 Th 细胞的功能 (Sun *et al*, 2007)。此外,红笛鲷 D3 区也存在硬骨鱼类所特有的一对半胱氨酸残基,形成了一个额外的二硫键,而

鸟类和哺乳类在该区域均缺失了两个半胱氨酸残基,因此对该二硫键的功能有待进一步研究。

人 CD4 分子 D1 区的 FXXK 基序是 MHC II 分子的结合位点,其中结合能主要由 F 提供,但鸟类、小鼠和一些鱼类缺乏该位点,相反红笛鲷、大黄鱼和大西洋庸鲽的 CD4-2 分子的 D1 区均含有该基序,因此鱼类 CD4 与 MHC II 分子可能存在一种不同于人的结合方式。此外所有物种的 CD4 和 CD4-2 分子 D2 区均存在一个特有的 WXC 基序,并且该基序在脊椎动物的淋巴细胞活化基因-3 (lymphocyte activation gene 3, LAG-3) 的 D4 区也同样保守,据此推测 CD4 和 LAG-3 可能来源于同一个祖先,并通过含有两个 Ig 样结构域的 CD4-2 分子通过基因内复制产生 (Triebel *et al*, 1990; Laing *et al*, 2006)。红笛鲷 CD4-2 连接肽区含有一个 CXXC 基序,该基序在目前已知硬骨鱼类如大黄鱼、大西洋庸鲽、红鳍东方鲀和虹鲟中高度保守,用以形成连接二聚体的二硫键,目前已证明 CD4 二聚化在 CD4 介导的 T 细胞激活中必不可少,而且可以促进与 MHC II 链接 (Moldovan *et al*,

2006)。同时鱼类 *CD4-2* 连接肽区富含脯氨酸, 使肽链伸更易于伸展弯曲接触 MHC II(Buonocore *et al.*, 2008)。与所有的鸟类、哺乳动物和鱼类 *CD4* 相类似, 红笛鲷 *CD4* 和 *CD4-2* 胞内区均含有一个高度保守的 $p56^{lck}$ 结合基序 CXC, 该基序通过锌指拉链结构与 $p56^{lck}$ 的 CXXC 基序连接相连接启动 T 细胞激活的第一信号(Kim *et al.*, 2003), 进而导致 *CD3* 分子胞内域的 ITAM 部分的磷酸化和 *fyn* 以及活化 ZAP-70 等下游信号分子, 最终 T 细胞的信号转导和激活得以完成(Leo *et al.*, 2001)。高等脊椎动物的 *CD4* 分子胞内区的 CXC 基序上游含有两个保守的丝氨酸残基和 LL 基序, 这 4 个保守氨基酸参与抗原诱导 *CD4* 分子的内化(Shin *et al.*, 1990), 但是在鱼类 *CD4* 和 *CD4-2* 分子中均不存在, 因此有关鱼类控制 T 淋巴细胞的过度活化以保持免疫系统平衡的机制尚需要进一步研究。

蛋白糖基化影响蛋白质的折叠、成熟、包装、投送、定位和抗原性以及细胞与细胞之间的连接(章晓联, 2004)。糖基化对 T 细胞的结构和功能同样也起到非常重要的作用, *CD4* 分子的糖基化位点糖基化完全后才能正确折叠和表达于细胞膜上(Rudd *et al.*, 2001)。鱼类 *CD4* 分子含多个 N-糖基化位点, 位于 D3 和 D4 结构域的糖基化位点的在所有物种中均相对保守, 预示鱼类 *CD4* 分子与高等脊椎动物 *CD4* 分子具有相似的部分功能。

荧光定量 PCR 检测结果显示红笛鲷 *CD4* 和 *CD4-2* 在胸腺中表达量最高, 在中肾、鳃、皮肤、肠和头肾等组织中也有中等程度的表达, 这种组织表达模式与舌齿鲈、大西洋庸鲽和虹鳟相似(Laing *et al.*, 2006; Buonocore *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2009;), 但是与红鳍东方鲀和斑点叉尾鲷不同(Suetake *et al.*, 2004; Edholm *et al.*, 2007), 可能与种属、生活环境及生理状态有关。胸腺是硬骨鱼的中枢免疫器官(谢海侠等, 2003)。*CD4* 的高表达证实是鱼类 T 细胞的发生、增殖、分化和成熟的主要场所。鱼类皮肤、鳃和肠是鱼类主要的黏膜淋巴组织, 也是最早接触水体病原的部位, 目前研究发现其中含有大量 T 淋巴细胞、抗原呈递细胞(Antigen-Presenting Cells, APC)和 B 淋巴细胞组织(Fournier-Betz *et al.*, 2000; Rombout *et al.*, 2014), 具有引发免疫应答的细胞基础, *CD4* 分子这些组织中的表达表明红笛鲷黏膜组织中同样含有 $CD4^+T$ 细胞, 病原入侵时其可引起局部黏膜免疫应答, 在抵御病原入侵和免疫反应中起重要作用。头肾淋巴细胞在体外经 LPS 和 ConA 刺激后, *CD4 mRNA*

显著上调表达, 与小鼠和舌齿鲈上的研究结果相一致(McAleer *et al.*, 2007), 表明鱼类的 $CD4^+T$ 细胞与哺乳类 $CD4^+T$ 具有相似的特性(Toda *et al.*, 2011), 膜上含有丝分裂原受体, 与 LPS 和 ConA 结合后可刺激其增殖。

$CD4^+T$ 细胞在外周器官识别抗原肽与 MHC II 类分子形成的复合物后被激活, 成为辅助 T 细胞(Th), 参与细胞免疫和体液免疫, 在抗菌感染中发挥重要作用。耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)灭活疫苗浸泡免疫 8h 后虹鳟 *CD4* 显著上调表达(Raida *et al.*, 2008), Kato 等(2013)等用胞内病原海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和病毒性出血性败血症病毒(Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, VHSV)感染牙鲆, 结果发现经上述病原感染后 5d 中肾 *CD4 mRNA* 呈现中等程度的持续上调表达, 而 *CD4-2 mRNA* 表达水平显著上升, 其相对表达量高于 *CD4*, 表明主要触发 Th1 介导的免疫应答, $CD4-2^+T$ 细胞在感染早期大量增殖, 并认为 *CD4* 和 *CD4-2* 存在于不同亚型的 T 细胞, 分别表达于初始 Th 细胞和记忆 Th 细胞。本研究中红笛鲷经哈维氏弧菌疫苗免疫 24h 后鳃、头肾、脾脏和肠 *CD4* 和 *CD4-2* 表达量均显著上调, 表明哈维氏弧菌疫苗免疫后引起 Th 大量增殖, 与耶尔森氏菌灭活疫苗浸泡免疫虹鳟的结果相似, 与 Kato 等(2013)的研究结果不太相同, 可能与病原的种类、感染方式及宿主等有关, 有关 *CD4-1* 和 *CD4-2* 分子分别表达或共表达以及免疫反应过程中的作用和调节机制仍有待进一步研究。综上所述, *CD4* 和 *CD4-2* 在鱼类的免疫应答中发挥重要作用。

4 结论

本研究克隆获得了红笛鲷 *CD4* 和 *CD4-2* 基因, 均由信号肽、免疫球蛋白样结构域构成的胞外区、跨膜区和胞浆区组成, 健康红笛鲷 *CD4* 和 *CD4-2* 基因在健康鱼的胸腺中表达量最高, 其次是中肾、鳃、皮肤、脾、头肾和肠。红笛鲷头肾淋巴细胞体外经 LPS 和 ConA 刺激 12h 后, *CD4* 和 *CD4-2* 表达量显著上调 ($P < 0.05$)。哈维氏弧菌疫苗免疫 24h 后鳃、头肾、脾脏和肠的表达量显著上升 ($P < 0.05$)。研究结果为进一步制备单克隆抗体、分选不同的 T 细胞亚群以及不同亚群的功能鉴定提供了基础。

参 考 文 献

章晓联, 2004. 蛋白糖基化与免疫. 中国免疫学杂志, 20(4):

- 290—293
- 谢海侠, 聂品, 2003. 鱼类胸腺研究进展. 水产学报, 27(1): 90—96
- Buonocore F, Randelli E, Casani D *et al*, 2008. A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterization and structural analysis. *Mol Immunol*, 45(11): 3168—3177
- Clayton L K, Sieh M, Pious D A *et al*, 1989. Identification of human CD4 residues affecting class II MHC versus HIV-1 gp120 binding. *Nature*, 339(6225): 548—551
- Dijkstra J M, Somamoto T, Moore L *et al*, 2006. Identification and characterization of a second CD4-like gene in teleost fish. *Mol Immunol*, 43(5): 410—419
- Edholm E S, Stafford J L, Quiniou S M *et al*, 2007. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, CD4-like molecules. *Dev Comp Immunol*, 31(2): 172—187
- Fournier-Betz V, Quentel C, Lamour F *et al*, 2000. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol*, 10(2): 187—202
- Huang B, Yachou A, Fleury S *et al*, 1997. Analysis of the contact sites on the CD4 molecule with class II MHC molecule: co-ligand versus co-receptor function. *J Immunol*, 158(1): 216—225
- Kato G, Goto K, Akune I *et al*, 2013. CD4 and CD8 homologues in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*: differences in the expressions and localizations of CD4-1, CD4-2, CD8 α and CD8 β . *Dev Comp Immunol*, 39(3): 293—301
- Kim P W, Sun Z Y, Blacklow S C *et al*, 2003. A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science*, 301(5640): 1725—1728
- Laing K J, Zou J J, Purcell M K *et al*, 2006. Evolution of the CD4 family: teleost fish possess two divergent forms of CD4 in addition to lymphocyte activation gene-3. *J Immunol*, 177(6): 3939—3951
- Leo A, Schraven B, 2001. Adapters in lymphocyte signalling. *Curr Opin Immunol*, 13(3): 307—316
- Lynch E A, Heijens C A W, Horst N F *et al*, 2003. Cutting edge: IL-16/CD4 preferentially induces Th1 cell migration: requirement of CCR5. *J Immunol*, 171(10): 4965—4968
- McAleer J P, Zammit D J, Lefrançois L *et al*, 2007. The lipopolysaccharide adjuvant effect on T cells relies on nonoverlapping contributions from the MyD88 pathway and CD11c⁺ cells. *J Immunol*, 179(10): 6524—6535
- Moldovan M C, Sabbagh L, Breton G *et al*, 2006. Triggering of T cell activation via CD4 dimers. *J Immunol*, 176(9): 5438—5445
- Øvergård A C, Nerland A H, Patel S, 2010. Cloning, characterization, and expression pattern of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) CD4-2, Lck, and ZAP-70. *Fish Shellfish Immunol*, 29(6): 987—997
- Parnes J R, 1989. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol*, 44: 265—311
- Patel S, Øvergård A C, Nerland A H, 2009. A CD4 homologue in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): molecular cloning and characterisation. *Fish Shellfish Immunol*, 26(3): 377—384
- Raida M K, Buchmann K, 2008. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine*, 26(8): 1050—1062
- Romano T A, Ridgway S H, Felten D L *et al*, 1999. Molecular cloning and characterization of CD4 in an aquatic mammal, the white whale *Delphinapterus leucas*. *Immunogenetics*, 49(5): 376—383
- Rombout J H W M, Yang G W, Kiron V, 2014. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol*, 40(2): 634—643
- Rudd P M, Elliott T, Cresswell P *et al*, 2001. Glycosylation and the immune system. *Science*, 291(5512): 2370—2376
- Shin J, Doyle C, Yang Z *et al*, 1990. Structural features of the cytoplasmic region of CD4 required for internalization. *EMBO J*, 9(2): 425—434
- Smith-Garvin J E, Koretzky G A, Jordan M S, 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 27(1): 591—619
- Suetake H, Araki K, Suzuki Y, 2004. Cloning, expression, and characterization of fugu CD4, the first ectothermic animal CD4. *Immunogenetics*, 56(5): 368—374
- Sun X F, Shang N, Hu W *et al*, 2007. Molecular cloning and characterization of carp (*Cyprinus carpio* L.) CD8 β and CD4-like genes. *Fish Shellfish Immunol*, 23(6): 1242—1255
- Toda H, Saito Y, Koike T *et al*, 2011. Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish. *Dev Comp Immunol*, 35(6): 650—660
- Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E *et al*, 1990. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*, 171(5): 1393—1405
- Zhang X Z, Dai L P, Wu Z H *et al*, 2011. Molecular cloning, mRNA expression, and characterization of heat shock protein 10 gene from humphead snapper *Lutjanus sanguineus*. *Mar Genomics*, 4(3): 143—150

MOLECULAR CLONING AND INDUCED EXPRESSION OF *CD4* AND *CD4-2* GENES FROM HUMPHHEAD SNAPPER *LUTJANUS SANGUINEUS*

HUANG Yu-Cong^{1,2}, DING Yu^{1,2}, LIANG Xiu-Quan^{1,4}, CAI Shuang-Hu^{1,2},
WU Zao-He^{2,3}, JIAN Ji-Chang^{1,2}

(1. Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, China; 3. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 4. Agricultural Technology Promotion Center of Xiashan District, Zhanjiang 524000, China)

Abstract The full-length cDNA sequences of *CD4* and *CD4-2* gene were obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE) from humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*. The tissue distribution in healthy fish and expression profiles after induction with immunostimulants were analyzed by real time quantitative PCR (qPCR). The total cDNA sequence of *CD4* was 2216bp, including 5' untranslated regions (UTR) of 180bp, 3' UTR of 605bp, an open reading frame (ORF) of 1431bp encoding 476 amino acids. The total cDNA sequence of *CD4-2* was 1520bp, including 5' UTR of 62bp, 3' UTR of 525bp, an ORF of 933bp encoding 310 amino acids. The *CD4* contained a signal peptide, four Ig-like extracellular domains, a transmembrane domain, and a cytoplasmic tail in structure. The *CD4-2* molecule had a signal peptide, two Ig-like extracellular domains, a transmembrane domain, and a cytoplasmic tail in structure. The qPCR analysis showed that the highest levels of *CD4* and *CD4-2* mRNA expression were found in thymus, followed by kidney, skin, gill, spleen, and head kidney. Furthermore, the transcriptions of *CD4* and *CD4-2* in head kidney leucocytes were up-regulated in 12h after lipopolysaccharide (LPS) and concanavalin A (ConA) stimulation. The expression levels in gill and intestine in 12h were significantly increased after immunized with formalin-inactivated *Vibrio harveyi*, and expression levels in anterior kidney and spleen at 24h were up-regulated after the immunization with formalin-inactivated *V. harveyi*. The results provide a theoretical basis for further studying the role of *CD4* and *CD4-2* in immune response of the fish.

Key words *Lutjanus sanguineus*; *CD4*; *CD4-2*; gene cloning; induced expression