

PaCLR 介导 PaLECT2 激活脂多糖刺激的香鱼 (*Plecoglossus altivelis*)单核巨噬细胞功能*

史雨红 马海玲 梁亚芳 陈航 陈炯

(宁波大学海洋学院 生物化学与分子生物学实验室 宁波 315211)

摘要 香鱼(*Plecoglossus altivelis*)白细胞衍生趋化因子 2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2, PaLECT2)可以激活香鱼头肾来源的单核巨噬细胞(monocytes/macrophages, MO/MΦ), 提高细菌感染后香鱼存活率。进一步研究显示, PaLECT2 与香鱼 C 型凝集素受体(C-type lectin receptor, PaCLR)相互作用可激活静息状态下香鱼 MO/MΦ, 增强其免疫活性。在前期基础上, 本研究通过抗体封闭实验检测 PaCLR 是否介导 PaLECT2 激活 LPS 刺激的 MO/MΦ 功能。结果显示, 重组 PaLECT2 成熟肽(rPaLECT2m)显著提高了 LPS 刺激的香鱼 MO/MΦ 细胞因子的表达, 并增强了其吞噬能力和杀菌活性。封闭 PaCLR 显著抑制了 rPaLECT2m 激活 LPS 刺激的香鱼 MO/MΦ 细胞因子表达、吞噬和杀菌功能。因此, PaCLR 介导 PaLECT2 可以激活病理状态香鱼 MO/MΦ。这一认识进一步揭示了 LECT2 在病理状态的鱼类巨噬细胞调控和炎症反应中的作用及机制。

关键词 LECT2; C 型凝集素受体; 单核巨噬细胞功能; 脂多糖刺激

中图分类号 Q789; S917

doi: 10.11693/hyhz20161200274

LECT2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2)为白细胞源趋化因子, 分子量为 16kDa, 含三个分子内二硫键, 以持续性方式在肝中特异表达, 随后分泌到血液中(Yamagoe *et al.*, 1996)。哺乳动物研究表明, LECT2 是一种多功能的细胞因子, 它与肿瘤发生、肝损伤、脓毒血症、肾淀粉样病变及造血干细胞动员等生理病理过程紧密相关(Saito *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2013a; Lan *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016)。据报道, LECT2 在鱼类中广泛存在, 多种水产经济鱼类如鲤鱼(Fujiki *et al.*, 2000)、虹鳟(Kokkinos *et al.*, 2005)、大黄鱼(Li *et al.*, 2008)和香鱼(Chen *et al.*, 2010)等中均有鉴定报道。鱼类 LECT2 基因表达与病原菌感染紧密相关(Lin *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; 施晓峰等, 2010; Chen *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2011), 揭示 LECT2 可能在鱼类抗菌免疫反应中具有重要的作用。我们的研究表明, 重

组香鱼 LECT2 成熟肽(rPaLECT2m)能体外趋化香鱼头肾来源的单核巨噬细胞(monocytes/macrophages, MO/MΦ), 诱导白介素 1β (interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α, TNFα)、白介素 10 (interleukin-10, IL-10)和粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)等细胞因子及模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)等基因表达, 增强 MO/MΦ 吞噬和杀菌能力(Zhang *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2013b)。随后, 我们对鳃弧菌感染的香鱼进行腹腔注射 rPaLECT2m 处理, 发现感染香鱼的存活率提高、组织载菌量减少、组织病理损伤减轻, 去除 MO/MΦ 后, 这种促病情改善的作用被抑制, 揭示鱼类中 LECT2 增强机体免疫能力的作用是通过 MO/MΦ 介导的(Chen *et al.*, 2014b)。

MO/MΦ 能表达多种 PRRs, 如 Toll 样受体(toll

* 国家自然科学基金项目, 31372555 号; 浙江省自然科学基金项目, LZ13C190001 号, LY14C190007 号; 宁波市自然科学基金项目, 2015A610263 号; “水产”浙江省重中之重开放基金, xkzsc1417 号; 浙江省新苗人才计划项目, 2015R405011 号。史雨红, 副教授, 硕士生导师, E-mail: shiyuhong0517@163.com

通讯作者: 陈炯, 博士生导师, 研究员, E-mail: jchen1975@163.com

收稿日期: 2016-12-09, 收修改稿日期: 2017-01-06

like receptor, TLR)及多类 C 型凝集素受体(C-type lectin receptor, CLR), 这些 PRRs 介导 MO/M Φ 识别微生物表面保守但不存在于宿主中的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 通过下游的信号途径, 调节各种免疫反应基因的表达从而清除病原体(Kerrigan *et al*, 2009)。CLR 家族成员拥有一个或多个糖基识别结构域(carbohydrate-recognition domains, CRDs), 介导对病原的黏附、摄取和杀灭, 调控免疫反应(Kerrigan *et al*, 2009)。近年来, 鱼类 CLRs 基因的研究日益受到重视, 一些同源基因已被克隆和研究(Soanes *et al*, 2004; Lin *et al*, 2009; Ao *et al*, 2015; Yang *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2015; Chen *et al*, 2016)。我们采用酵母双杂交和免疫共沉淀方法, 鉴定 PaLECT2 能与一种香鱼 CLR (PaCLR)相互作用(Chen *et al*, 2010); 进一步研究揭示, PaLECT2 可通过 PaCLR 受体介导激活静息状态下的香鱼 MO/M Φ (Ma *et al*, 2016)。然而, 病理状态下 PaLECT2/PaCLR 途径是否发挥作用尚不得而知。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要组成部分, 可作为单核巨噬细胞的一种有效的激活剂(Swain *et al*, 2008), 本研究拟采用 LPS 刺激静息态香鱼 MO/M Φ 模拟病理状态, 阐明 PaCLR 是否介导 PaLECT2 激活病理状态下的 MO/M Φ , 揭示 LECT2 在鱼类炎症反应中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

健康香鱼(*Plecoglossus altivelis*) (40—50g)购自浙江省宁波市宁海县鳃溪香鱼养殖基地, 大小均匀, 体表无伤。实验进行之前在实验室条件下(水温 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 保证溶氧量适宜及水质清洁无菌)暂养 2 周。引物由上海英俊生物有限公司合成; 总 RNA 抽提试剂 RNAiso 和 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG)购自碧云天生物技术研究; Ficoll 购自 GE 公司; LPS (*Escherichia coli* 055: B5)和荧光素 FITC 购自美国 Sigma。细胞培养基 RPMI 1640 购自上海英俊生物有限公司。胎牛血清(FBS)、硫酸链霉素和青霉素均购自美国 Gibco 公司。

1.2 rPaLECT2m 蛋白和 PaCLR 抗体制备

rPaLECT2m 的制备及纯化方法参照文献(Zhang *et al*, 2011)。PaCLR 抗体(anti-PaCLR)制备方法参照文献(Ma *et al*, 2016)。

1.3 香鱼头肾 MO/M Φ 的分离与培养

香鱼头肾 MO/M Φ 的分离和培养参照文献(Chen *et al*, 2014b)。简述如下: 香鱼麻醉后尾静脉取血后取头肾。用细胞洗脱培养基 I 将香鱼头肾用 $100\mu\text{m}$ 孔径筛网研磨过滤。滤液(1:2)铺在 Ficoll 表面, 2000r/min 水平离心 25min。吸取中间白膜层, 用细胞洗脱培养基 I 重悬, 2000r/min 水平离心 8min。沉淀用上述的培养基 II 洗一次, 1000r/min 离心 5min。显微镜下血球计数板计数, 最后细胞稀释至 $2 \times 10^7/\text{mL}$, 平铺于 35mm 细胞培养皿。 24°C 过夜培养后将培养液换成完全培养基, 用于后续实验。

1.4 实时定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)检测香鱼 MO/M Φ 细胞因子表达

采用 qPCR 检测香鱼 MO/M Φ 中 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-10 和粒细胞集落刺激因子 G-CSF 的表达变化, 以 18S rRNA 为内参(Ma *et al*, 2016)。以 $10\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 处理香鱼 MO/M Φ 30min 之后用 PBS 洗涤去除, 然后用 $200\mu\text{g/mL}$ anti-PaCLR 封闭 40min, isoIgG 作为对照; 随后加入 rPaLECT2m ($2.5\mu\text{g/mL}$)孵育 3.5h, PBS 组为对照, 收集细胞并提取总 RNA 合成 cDNA。 $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-10 和 G-CSF 的扩增引物见文献(Chen *et al*, 2014b; Ma *et al*, 2016)。qPCR 程序为: 94°C 180s(预变性); 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s(扩增段, 40 个循环); 94°C 30s, 72°C 60s, 95°C 30s(熔解段)。每个样品重复四次, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算在不同样品基因的相对表达水平。

1.5 流式细胞术检测香鱼 MO/M Φ 吞噬作用

香鱼 MO/M Φ 吞噬实验参考文献(Ma *et al*, 2016)。简述如下: 香鱼 MO/M Φ LPS 处理、anti-PaCLR 封闭和 PaLECT2m 孵育如 1.4。收集对数生长期大肠杆菌 DH5 α 并用异硫氰酸荧光素(FITC)对其进行标记(记作 *E. coli*-FITC)。之后(MOI=10)加入 *E. coli*-FITC 处理 30min。PBS 洗涤 3 次, 用 0.4% 台盼蓝使粘附到细胞表面的荧光猝灭。流式细胞仪(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)对吞噬作用进行检测, 图像分析采用 FlowJo 软件。相对平均荧光强度(MFI)=处理组 MFI/无细菌组 MFI, 以 PBS 组相对 MFI 为 100%。

1.6 平板计数法评估香鱼 MO/M Φ 杀菌能力

采用平板计数法评估香鱼 MO/M Φ 对细菌的吞噬活性。LPS 处理香鱼 MO/M Φ 、anti-PaCLR 封闭和 PaLECT2m 孵育如 1.3。将大肠杆菌(MOI=10)添加至香鱼 MO/M Φ , 24°C 培养 30min。非内化的大肠杆菌

用无菌 PBS 洗涤除去。吞噬组用 1% Triton X-100 溶液裂解后涂布于 LB 琼脂培养基。杀菌组继续培养 1.5h, 然后再裂解涂布于 LB 琼脂培养基, 平皿置于 37°C 培养 18h 后, 进行菌落计数。细菌存活率=杀菌组/吞噬组 $\times$ 100%表示, 实验重复 3 次。

1.7 数据分析

数据以平均值 $\pm$ SD 表示, 数据显著性分析采用 SPSS 13.0 软件 one-way ANOVA 方法进行分析, $P < 0.05$ 为显著差异。

2 结果

2.1 抗体封闭 PaCLR 对 rPaLECT2m 激活 LPS 刺激的香鱼 MO/M Φ 细胞因子表达的影响

与 PBS 处理组相比, 香鱼 MO/M Φ 经 LPS 刺激后, IL-1 β 、TNF α 、IL-10 和 G-CSF 基因 mRNA 表达上调倍数分别为 12、15、1.9 和 5.8, 而 LPS+rPaLECT2m 处理后 IL-1 β 、TNF α 、IL-10 和 G-CSF 基因 mRNA 表达水平分别上调约为 PBS 处理组的 350、160、12 和 38; 用 anti-PaCLR 封闭细胞上的 PaCLR 后, LPS+rPaLECT2m 再处理香鱼 MO/M Φ , 其 IL-1 β 、TNF α 、IL-10 和 G-CSF 基因 mRNA 表达上调约为 PBS 处理组的 75、31、3.1 和 9.2(图 1)。

2.2 抗体封闭 PaCLR 对 rPaLECT2m 激活 LPS 刺激的香鱼 MO/M Φ 吞噬能力的影响

与 PBS 处理组相比, LPS 处理和 LPS+anti-PaCLR 处理对香鱼 MO/M Φ 吞噬能力均无显著影响(图 2A)。与 PBS 处理组相比, LPS+rPaLECT2m 处理显著增强香鱼 MO/M Φ 吞噬 *E.coli*-FITC 的能力, 其相对 MFI 约为 PBS 处理组增加了 88.9%(图 2B); 用抗体封闭 PaCLR 后, LPS+rPaLECT2m 再处理香鱼 MO/M Φ , 吞噬 *E.coli*-FITC 的能力相对于 PaCLR 未封闭组下降了约 35.6%(图 2C, 图 2D)。

2.3 抗体封闭 PaCLR 对 rPaLECT2m 激活 LPS 刺激的香鱼 MO/M Φ 杀菌能力的影响

实验分为 5 组, 其中 PBS 处理组、LPS 处理组, LPS+anti-PaCLR 处理组, LPS+rPaLECT2m 处理组和 LPS+anti-PaCLR+rPaLECT2m 处理组细菌存活率分别为 $34.0\% \pm 2.9\%$, $32.9\% \pm 1.5\%$, $36.5\% \pm 3.6\%$, $16.5\% \pm 2.6\%$ 和 $27.9\% \pm 2.9\%$ (图 3)。与 LPS 处理组相比, 抗体封闭 PaCLR 对 LPS 刺激的香鱼 MO/M Φ 杀菌能力无显著性影响; 与 LPS 处理组相比, LPS+rPaLECT2m 处理显著增强了香鱼 MO/M Φ 的杀菌能力, 然而抗体封闭 PaCLR 后, rPaLECT2m 对 LPS 刺激的香鱼 MO/M Φ 杀菌能力的增强效应被显著抑制。

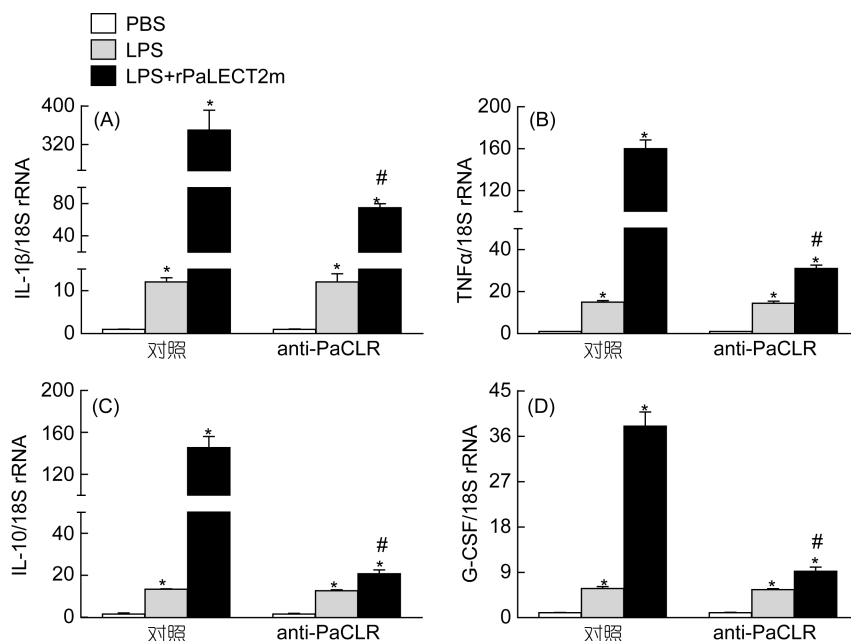


图 1 抗体封闭 PaCLR 对 rPaLECT2m 激活 LPS 刺激的香鱼 MO/M Φ 中 IL-1 β (A), TNF α (B), IL-10 (C) and G-CSF (D) 基因 mRNA 表达的影响

Fig.1 Effect of PaCLR blockage on rPaLECT2m activation of mRNA expression of IL-1 β (A), TNF α (B), IL-10 (C) and G-CSF (D) from LPS-stimulated ayu MO/M Φ

注: 细胞因子的 mRNA 表达水平以 β -actin 基因 mRNA 为标准。n=4; *: $P < 0.05$, 相对于 PBS 组。#: $P < 0.05$, LPS+rPaLECT2m 组封闭 PaCLR 前后比较

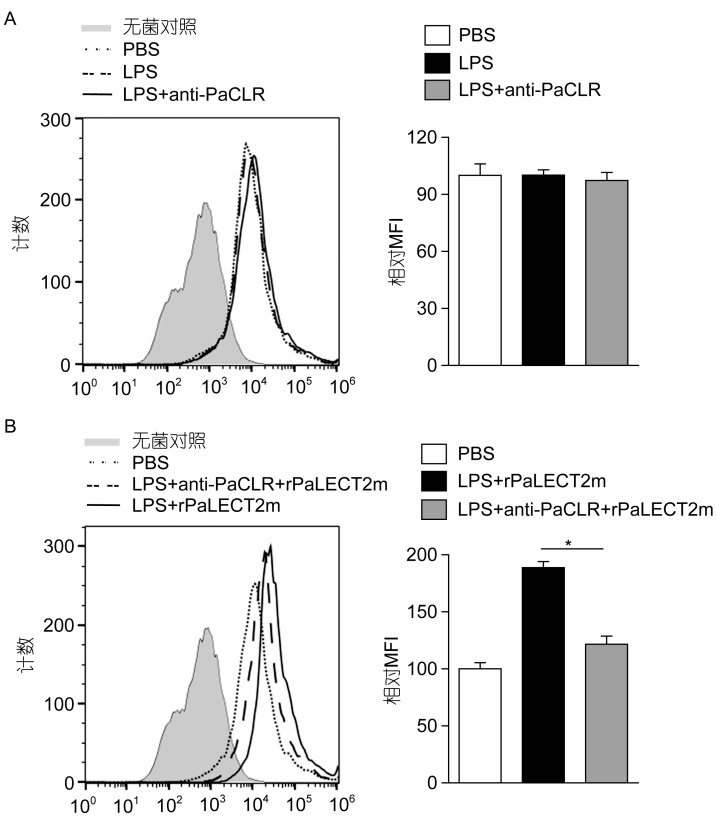


图 2 封闭 PaCLR 对 rPaLECT2m 激活 LPS 的香鱼 MO/MΦ 吞噬功能的影响

Fig.2 Effect of PaCLR blockage on rPaLECT2m activation of phagocytosis of LPS-stimulated ayu MO/MΦ

注: A. LPS 或 LPS+anti-PaCLR 处理对香鱼 MO/MΦ 吞噬能力的影响。B. 抗体封闭 PaCLR 对 LPS+rPaLECT2m 处理香鱼 MO/MΦ 吞噬能力的影响。PBS 组的相对 MFI 设为 100%。n=4, *: P<0.05

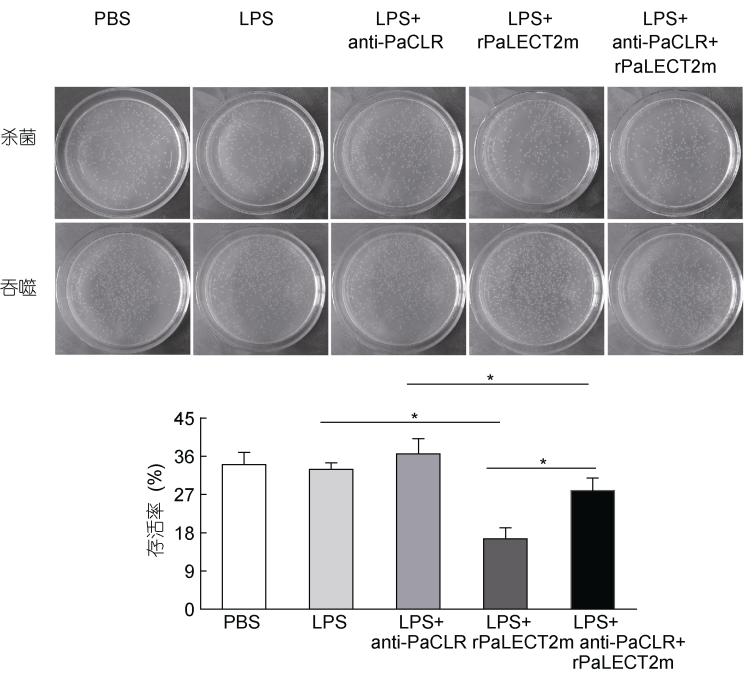


图 3 抗体封闭 PaCLR 对 rPaLECT2m 激活 LPS 刺激的香鱼 MO/MΦ 杀菌能力的影响

Fig.3 Effect of PaCLR blockage on rPaLECT2m activation of bacterial killing of LPS-stimulated ayu MO/MΦ

注: 数据表示为 mean ± SD, n=4; *: P<0.05

3 讨论

LECT2 是一个新近鉴定的多功能细胞因子, 它可作用于鱼类 MO/M Φ , 趋化静息态的 MO/M Φ , 增强其细胞因子表达、吞噬和杀菌能力(Zhang *et al*, 2011; Lu *et al*, 2013b; Ma *et al*, 2016)。PaCLR 是 PaLECT2 在香鱼 MO/M Φ 上的受体, 并介导 PaLECT2 激活静息态 MO/M Φ (Chen *et al*, 2010; Ma *et al*, 2016)。然而, 由于病理条件下 MO/M Φ 的状态往往与静息态时不同, 因此有必要针对病理状态开展研究。LPS 是革兰阴性菌的胞壁主要组成成分, 在革兰氏阴性菌感染的发病机理中起着十分重要的作用(Swain *et al*, 2008), 前人研究表明, LPS 刺激能导致免疫细胞发生形态、功能和胞内基因表达等的变化, 合成并释放一系列炎症介质, 参与机体的炎症级联反应, 从而引起感染性休克、器官损伤和系统性炎症反应综合征等(Morris *et al*, 2015)。本文采用 LPS 刺激来模拟病理状况, 研究 PaCLR 是否介导 rPaLECT2 激活 LPS 刺激的香鱼 MO/M Φ 。

小鼠中的研究表明, LECT2 处理静息态小鼠 M Φ 后, C3、G-CSF、IFN γ 、IL-10、CXCL-10、IL-1 β 和 TNF α 等基因 mRNA 表达均上调; 与之相比, LECT2 处理 LPS 刺激的小鼠 M Φ 后, 上述基因 mRNA 表达水平进一步增加 2—40 倍不等(Lu *et al*, 2013a), 揭示小鼠 LECT2 在病理条件下能激活 M Φ 中多种重要免疫相关基因的表达。鱼类中研究发现, rPaLECT2m 处理上调静息态香鱼 MO/M Φ 细胞因子 IL-1 β 、TNF α 、IL-10 和 G-CSF 基因 mRNA 的表达, 增强 MO/M Φ 吞噬和杀菌能力(Zhang *et al*, 2011; Lu *et al*, 2013b; Ma *et al*, 2016)。本研究中, 我们发现 rPaLECT2m 处理 LPS 刺激的香鱼 MO/M Φ 后, IL-1 β 、TNF α 、IL-10 和 G-CSF 等基因 mRNA 表达分别为 rPaLECT2m 处理的静息态 MO/M Φ 中的 1.60、1.77、1.58 和 1.38 倍, 和小鼠中报道的变化趋势一致, 揭示, rPaLECT2 处理可能也不抑制香鱼极早期的炎症反应。

新近研究表明, 哺乳动物中 LECT2 的受体有两个, 分别为 CD209a 和 c-Met, 其中 CD209a 介导 LECT2 激活在小鼠 M Φ , 增强保护性免疫(Lu *et al*, 2013a; Chen *et al*, 2014a)。鱼类中, PaCLR 被鉴定为 PaLECT2 在香鱼 MO/M Φ 上的一个受体, 它的结构和小鼠 CD209a 有一定相似性(Chen *et al*, 2010), 它能介导 LECT2 激活静息态香鱼 MO/M Φ 功能(Ma *et al*, 2016)。本研究表明, 抗体封闭 PaCLR 后, rPaLECT2m

对 LPS 处理的香鱼 MO/M Φ 细胞因子表达、吞噬和杀菌能力增强效应显著受到抑制, 揭示 PaCLR 介导 PaLECT2 对病理条件下的香鱼 MO/M Φ 功能。

4 结论

综上所述, rPaLECT2m 激活 LPS 刺激香鱼 MO/M Φ 细胞因子表达、吞噬和杀菌功能。抗体封闭 PaCLR 后显著抑制上述作用, 因此, 无论在静息状态还是 LPS 刺激作用下 PaCLR 都介导了 PaLECT2 激活香鱼 MO/M Φ 功能。

参 考 文 献

- 施晓峰, 曲 滕, 王航俊等, 2010. 赤点石斑鱼 LECT2 基因的克隆与组织表达分析. 厦门大学学报(自然科学版), 49(5): 694—700
- Ao J Q, Ding Y, Chen Y Y *et al*, 2015. Molecular characterization and biological effects of a C-type lectin-like receptor in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). International Journal of Molecular Sciences, 16(12): 29631—29642
- Chen C K, Yang C Y, Hua K T *et al*, 2014a. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 antagonizes MET receptor activation to suppress hepatocellular carcinoma vascular invasion by protein tyrosine phosphatase 1B recruitment. Hepatology, 59(3): 974—985
- Chen J, Chen Q, Lu X J *et al*, 2014b. LECT2 improves the outcomes in ayu with *Vibrio anguillarum* infection via monocytes/macrophages. Fish & Shellfish Immunology, 41(2): 586—592
- Chen J, Lu X J, Yang H Y *et al*, 2010. An interaction between a C-type lectin receptor and leukocyte cell-derived chemotaxin 2 of ayu, *Plecoglossus altivelis*. Fish & Shellfish Immunology, 28(1): 245—248
- Chen S X, Ma H L, Shi Y H *et al*, 2016. Molecular and functional characterization of a novel CD302 gene from ayu (*Plecoglossus altivelis*). Fish & Shellfish Immunology, 55: 140—148
- Fujiki K, Shin D H, Nakao M *et al*, 2000. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) leukocyte cell-derived chemotaxin 2, glia maturation factor β , CD45 and lysozyme C by use of suppression subtractive hybridisation. Fish & Shellfish Immunology, 10(7): 643—650
- Kerrigan A M, Brown G D, 2009. C-type lectins and phagocytosis. Immunobiology, 214(7): 562—575
- Kokkinos P A, Kazantzi A, Sfyroera G *et al*, 2005. Molecular cloning of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in rainbow trout. Fish & Shellfish Immunology, 18(5): 371—380
- Lan F, Misu H, Chikamoto K *et al*, 2014. LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance. Diabetes, 63(5): 1649—1664
- Li M Y, Chen J, Shi Y H, 2008. Molecular cloning of leukocyte cell-derived chemotaxin-2 gene in croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*). Fish & Shellfish Immunology,

- 24(2): 252—256
- Lin A F, Xiang L X, Wang Q L *et al*, 2009. The dc-sign of zebrafish: insights into the existence of a CD209 homologue in a lower vertebrate and its involvement in adaptive immunity. *Journal of Immunology*, 183(11): 7398—7410
- Lin B, Chen S W, Cao Z *et al*, 2007. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with mammals. *Molecular Immunology*, 44(4): 295—301
- Lu X J, Chen J, Yu C H *et al*, 2013a. LECT2 protects mice against bacterial sepsis by activating macrophages via the CD209a receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(1): 5—13
- Lu X J, Chen Q, Rong Y J *et al*, 2016. LECT2 drives haematopoietic stem cell expansion and mobilization via regulating the macrophages and osteolineage cells. *Nature Communications*, 7: 12719
- Lu X J, Hang X Y, Yin L *et al*, 2013b. Sequencing of the first ayu (*Plecoglossus altivelis*) macrophage transcriptome and microarray development for investigation the effect of LECT2 on macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(2): 497—504
- Ma H L, Shi Y H, Zhang X H *et al*, 2016. A transmembrane C-type lectin receptor mediates LECT2 effects on head kidney-derived monocytes/macrophages in a teleost, *Plecoglossus altivelis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 51: 70—76
- Morris MC, Gilliam EA, Li L, 2015. Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequences. *Frontiers in Immunology*, 5: 680
- Saito T, Okumura A, Watanabe H *et al*, 2004. Increase in hepatic NKT cells in leukocyte cell-derived chemotaxin 2-deficient mice contributes to severe concanavalin a-induced hepatitis. *Journal of Immunology*, 173(1): 579—585
- Soanes K H, Figueredo K, Richards R C *et al*, 2004. Sequence and expression of C-type lectin receptors in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics*, 56(8): 572—584
- Swain P, Nayak S K, Nanda P K *et al*, 2008. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(3): 191—201
- Wei J G, Guo M L, Cui H C *et al*, 2011. A new leukocyte cell-derived chemotaxin-2 from marine fish grouper, *Epinephelus coioides*: molecular cloning and expression analysis. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(4): 600—605
- Yamagoe S, Yamakawa Y, Matsuo Y *et al*, 1996. Purification and primary amino acid sequence of a novel neutrophil chemotactic factor LECT2. *Immunology Letters*, 52(1): 9—13
- Yang G J, Lu X J, Chen Q *et al*, 2015. Molecular characterization and functional analysis of a novel C-type lectin receptor-like gene from a teleost fish, *Plecoglossus altivelis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 44(2): 603—610
- Zhang R C, Chen J, Li C H *et al*, 2011. Prokaryotic expression, purification, and refolding of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 and its effect on gene expression of head kidney-derived macrophages of a teleost fish, ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 31(6): 911—918
- Zhang X H, Shi Y H, Chen J, 2015. Molecular characterization of a transmembrane C-type lectin receptor gene from ayu (*Plecoglossus altivelis*) and its effect on the recognition of different bacteria by monocytes/macrophages. *Molecular Immunology*, 66(2): 439—450

PACLR MEDIATES THE EFFECT OF PALECT2 ON LPS-STIMULATED MONOCYTES/MACROPHAGES FROM AYU *PLECOGLOSSUS ALTIVELIS*

SHI Yu-Hong, MA Hai-Ling, LIANG Ya-Fang, CHEN Hang, CHEN Jiong

(Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 of ayu *Plecoglossus altivelis* (PaLECT2) is shown to activate ayu head kidney-derived monocytes/macrophages (MO/MΦ) *in vitro* to improve the cure of bacterial-infected fish. Our earlier research reveals that PaLECT2 could activate the resting MO/MΦ and enhance its immuno-activity by interacting with a C-type lectin receptor of ayu (PaCLR), based on which we examined the effect of PaCLR on PaLECT2 activation of LPS-stimulated ayu MO/MΦ using antibody neutralization method. Results show that the recombinant PaLECT2 mature peptide (rPaLECT2m) increased the cytokine expression, and enhanced phagocytosis and bactericidal activity of LPS-stimulated ayu MO/MΦ. By blocking the ectodomain of PaCLR by anti-PaCLR, these effects were inhibited significantly. Therefore, PaCLR could mediate the activation effect of PaLECT2 on LPS stimulated MO/MΦ. This finding revealed the mechanism of LECT2 involvement in the regulation and inflammatory response of the fish monocyte/macrophage.

Key words LECT2; C-type lectin receptor; monocyte/macrophage functions; LPS stimulation