

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)成体造血器官头肾和体肾转录组比较研究*

钟爱华 代小新

(浙江海洋大学水产学院 舟山 316022)

摘要 硬骨鱼类具有独特的免疫系统,其头肾和体肾是重要的造血和免疫器官。为探索黄颡鱼头肾和体肾造血和免疫功能异同,采用 Illumina HiSeq NovaSeq 6000 测序平台对黄颡鱼头肾和体肾进行了转录组高通量测序;测序序列经质控、组装后,共获得 59 979 个转录本(transcript),N50 为 3 919 bp;获得的转录本在 NR、GO、KEGG、Swiss-Prot 和 Pfam 数据库中比对和注释,共有 24 487 个 Unigenes 获注释。差异表达基因分析显示,1 112 个基因在头肾中上调,包括 KIT 配体、早期 B 细胞因子 1、Toll 样受体 1 和 2 等免疫相关基因;2 737 个基因在体肾中上调,如 C-C 趋化因子 19 和 25、补体 5 和 9、白细胞介素 17 受体 C、RIG-I 和白细胞介素 27 等免疫相关基因,部分抗体重链可变区编码基因和抗体轻链 κ 链可变区编码基因仅在体肾中表达。结果表明,黄颡鱼头肾和体肾中免疫相关基因表达具有差异性,两者造血和免疫功能具有组织特异性。研究结果有助于黄颡鱼头肾和体肾造血和免疫功能研究,可为黄颡鱼病害防治提供基础资料。

关键词 黄颡鱼;头肾;体肾;转录组测序

中图分类号 S917.4 **doi:** 10.11693/hyhz20210500110

硬骨鱼类免疫系统与哺乳动物不同,硬骨鱼类骨髓没有造血功能,取而代之的是头肾和体肾,成体时头肾一般不具有肾小管,因而没有排泄功能;而体肾既有排泄功能又有造血功能。作为重要的中枢免疫器官,头肾和体肾不仅能支持造血细胞分化、发育、成熟,维持血细胞相对稳态,还参与机体免疫防御反应,以阻止和清除入侵病原体及其毒素(Zwollo *et al.*, 2005)。

早在 1951 年, Catton 就已证实硬骨鱼头肾和体肾具有造血功能(Catton, 1951), 后继许多研究也证实头肾和体肾中血细胞发育谱系相似,但是两者造血及免疫功能是否完全相同还不十分清楚。形态学研究发现头肾和体肾中血细胞数量不一样,军曹鱼(*Rachycentron canadum*)体肾中有更多红细胞、原粒细胞、未成熟红细胞和未成熟粒细胞(陈刚等, 2005), 卵形鲳鲅(*Trachinotus ovatus*)体肾中有更多原淋巴细胞(张健东等, 2007), 斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)体肾中

有更多原红细胞(Fijan, 2002a, b), 长鳍裸颊鲷(*Lethrinus erythropterus*)头肾中有更多原粒细胞、早幼粒细胞、幼稚红细胞和淋巴细胞(曹伏君等, 2014), 日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)头肾中有更多原始粒细胞、原淋巴细胞、原单核细胞和大淋巴细胞(苑淑宾等, 2011), 由此可见, 鱼类头肾和体肾造血细胞系组成比例存在差异。一些免疫相关基因在头肾和体肾中的表达没有显著统计学差异,如加氧酶在草鱼体肾和头肾中均高表达(Lu *et al.*, 2021), 黑色素瘤分化相关基因 5 (*MDA5*) 在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)头肾和体肾中均高表达(Ohtani *et al.*, 2011), 稀有鮎鲫(*Gobiocypris rarus*)头肾和体肾中 B 类 1 型清道夫受体表达量相近(Ou *et al.*, 2019), 大黄鱼白细胞介素 11 在头肾和体肾中的表达没有明显差异(Zhu *et al.*, 2020); 另一些免疫相关基因的表达则存在组织差异, 斑纹鳢(*Channa striatus*)趋化因子 *CCL19* 在体肾中高

* 浙江省“水产”一流学科开放课题, 11034060216 号; 浙江省教育厅项目, Y202044632 号。钟爱华, E-mail: zhongpe@zjou.edu.cn

收稿日期: 2021-05-01, 收修改稿日期: 2021-06-03

表达(Arockiaraj *et al*, 2015), 点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)趋化因子 *CXCL2* 和 *CXCL8* 则在头肾中高表达(Wang *et al*, 2019), Toll 样受体 3 在日本白姑鱼(*Argyrosomus japonicus*)体肾中高表达, Toll 样受体 9 在日本白姑鱼头肾中高表达(Han *et al*, 2021)。这些研究结果表明鱼类体肾和头肾造血和免疫功能存在差异。

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)隶属于辐鳍鱼纲、鲶形目、鲶科、黄颡鱼属, 俗名嘎牙子、黄姑子、黄腊丁、黄骨鱼等, 广泛分布于我国广大江河流域。黄颡鱼是一种耐低氧、广温性淡水鱼类, 溶氧大于 2 mg/L、水温 1—38 °C 之间均能正常生存, 诸多优点使其成为重要的淡水养殖鱼类。中国渔业统计年鉴统计数据显示, 2017 年全国黄颡鱼产量为 480 032 t, 2018 年产量为 509 610 t, 2019 年产量为 536 964 t, 连续两年产量不断增加。随着养殖规模扩大, 高密度养殖环境中, 黄颡鱼常常感染细菌、寄生虫以及病毒, 如爱德华氏菌、嗜水气单胞菌等, 轻则影响黄颡鱼生长, 重则导致其大规模死亡(Li *et al*, 2018)。目前有关黄颡鱼研究主要集中在养殖技术、人工繁殖、病害防控等方面(胡伟华等, 2019; 王国霞等, 2020; 郭勋等, 2020; 蔺凌云等, 2020), 笔者在进行黄颡鱼血细胞发生研究时发现头肾中有更多的原红细胞, 为了探索头肾和体肾造血以及免疫功能异同, 笔者进行了转录组高通量测序, 以期望探明两者造血和免疫功能的分子机制, 为黄颡鱼病害防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样本准备

实验用黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) [体质量(200±25) g]来自浙江省宁波市养殖农场, 选择健康无伤、体表无寄生虫、反应敏捷的健康黄颡鱼, 带回实验室暂养, 暂养水体为 100 L, 温度(20±2) °C、溶解氧大于 5 mg/L。暂养 5 d 后, 随机挑选 9 尾大小相近的黄颡鱼, 丁香酚麻醉后取其头肾和体肾, 冻存于液氮中用于抽提 RNA, 因头肾较小, 为保证测序质量, 每 3 个个体组成一个样本。

1.2 RNA 抽提

先采用 Trizol (Invitrogen)试剂盒提取头肾和体肾中总 RNA, 然后使用 DNase I (TaKaRa)去除基因组 DNA, 获得的 RNA 样品用 2100 Bioanalyser (Agilent)、ND-2000 (NanoDrop Technologies)检测质量, 以保证合格样品($OD_{260/280}=1.8—2.2$, $OD_{260/230} \geq 2.0$, $RIN \geq 9.0$, $28S:18S \geq 1.0$, 总量>2 μg)用于转录组测序。

1.3 文库建立和测序

文库建立采用 TruSeq™ RNA sample preparation Kit (Illumina, San Diego, CA)试剂盒进行。首先用带有 Oligo(dT)的磁珠从 1 μg 总 RNA 中富集含有 poly-A 尾巴的 mRNA, 再加入片段化缓冲液, 将 mRNA 随机断裂成 200 bp 左右的小片段; 接着采用 SuperScript double-stranded cDNA synthesis kit (Invitrogen, CA)试剂盒, 加入六碱基随机引物(Illumina), 以 mRNA 为模板反转录合成一链 cDNA, 然后合成第二链, 形成稳定的双链结构。双链的 cDNA 结构为粘性末端, 加入 End Repair Mix 将其补成平末端, 随后在 3'末端加上 A 碱基, 用于连接 Y 字形的接头。获得的 cDNA 经过 15 个 PCR 扩增, 扩增试剂盒采用 sample preparation Kit (Illumina, San Diego, CA), 采用琼脂糖电泳筛选 200—300 bp 的条带, 经 TBS380 (Picogreen)定量后, 用于用 Illumina HiSeq NovaSeq 6000 测序平台进行高通量测序, 测序读长为 PE150。

1.4 有参考基因转录组组装

测序获得的原始数据(Raw Date)使用 SeqPrep v1.3.2 去除 reads 中接头, 过滤掉不合格的序列后所获得的序列即为有效数据。具体为先去除 reads 中的接头序列, 去除因接头自连等原因导致没有插入片段的 reads; 然后将序列末端(3'端)低质量(质量值小于 20)的碱基修剪掉, 若剩余序列中仍然有质量值小于 10 的碱基, 则将整条序列剔除, 否则保留; 去除含 N(模块碱基)的 reads, 舍弃去接头和质量修剪后长度小于 30 bp 的序列, 余下的序列为有效数据。使用 HISAT2 软件将过滤后的高质量数据(Clean reads)比对到黄颡鱼基因组上, 基因组来自 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/term=txid1234273>), 然后采用 StringTie2 软件进行组装, 具体为先将重合的 reads 对组装成 super-reads, 然后将 super-reads 比对到参考基因组, 并构建剪接(splice)位点的结构图(graph), 最后将 read 覆盖高的路径进行组装从而形成转录本(transcript)序列和 Unigenes 序列。

1.5 基因注释和功能分析

采用软件 DIAMOND (Buchfink *et al*, 2015), 将组装获得的 Unigenes 序列在 NCBI-NR (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)、GO (<http://www.geneontology.org/>)、KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)和 Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>)数据库中进行比对(期望值 E value<1e-5), 从而全面获得 Unigenes 注释信息。

1.6 差异表达基因分析

先采用 RSEM v1.3.3 将 Clean reads 比对到组装的 Unigene 序列上, 获得每个转录本序列 read 数目, 然后计算 TPM (Transcripts Per Kilobase Million)值, 以获得 Unigene 的表达量。采用 R 软件包中的 Deseq 筛选两组织中表达量显著差异的基因, 筛选标准为 $|\log_2\text{Fold Change}| > 1.5$ 且错误发现率(FDR)<0.05。

获得的差异表达基因, 以注释的所有基因作为参考, 采用 Goatools 和 KOBAS3.0 分析差异表达基因所在的 GO 类别和 KEGG 信号通路, 显著富集的判断标准为 Bonferroni 方法对 P 值进行校正, 校正的 P 值 (FDR)<0.05 时, 此 GO 类别和 KEGG 信号通路存在显著富集情况。

1.7 qRT-PCR (实时荧光定量 PCR)验证

从头肾和体肾中随机挑选出 4 个差异表达免疫基因, 分别为 2 个在头肾中上调基因以及 2 个在体肾中上调基因, 进行 qRT-PCR 分析。先从 3 个生物学样本中提取 RNA, 然后采用 HiScript Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (诺唯赞)试剂盒反转录为 cDNA, 以反转录 cDNA 为模板, 采用 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (2×) (诺唯赞)试剂盒进行 PCR 扩增。扩增引物由 Primer premier 5 软件设计(表 1), 内参基因为 β -肌动蛋白(β -actin), 基因相对表达量按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算(Livak *et al*, 2001), 结果使用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析, 统计学差异水平为 $P<0.05$ 。

表 1 qRT-PCR 扩增用引物
Tab.1 Primers for qRT-PCR

基因名	NCBI 序列号	正向引物序列(5'—3')	反向引物序列(5'—3')
β -actin	XM_027148463.1	ATTGCCGCACTGGTTGTT	CAGGGTCAGGATACCTCTTT
TLR1	XM_027171867.1	AGGCTGCTTGAGATCACCTG	CTTTGCACGGGTCCATTCC
TLR2	XM_027142860.1	ATGCCACAGGTTTGCGATTG	GGGAAGATGGAGGTGGAACG
CCL 19	XP_027018641.1	GGCTCGATCTGCCTTTCT	CAGGCGATTATGCGTTTT
C9	XM_027165452.1	TGGCAGAGTACAGTGTGTGC	CGTCTCCGGATGCCTTCATT

2 结果

2.1 测序数据质控、比对及组装

测序后黄颡鱼体肾和头肾中获得超过 8 Gb 的原始碱基(raw bases), 原始数据经过修剪、过滤不合格序列后, 体肾中获得超过 56 440 624 条有效数据(clean reads), 头肾中获得超过 63 788 540 条有效序列, 头肾和体肾有效序列的质量得分 Q20 均大于 98%, Q30 均大于 94%。获得的有效 reads 与参考基因组进行比对, 体肾中 93%以上的有效 reads 能定位到基因组上, 头肾中 92%的有效 reads 能定位到基因组上(见表 2)。

有效序列经组装后, 共获得 59 979 个转录本, 最长转录本长度为 95 343 bp, 转录本 N50 值为 3 919 bp, 大部分转录本的长度超过 1 800 bp, 有 40 134 个转录本, 占比 66.91% (图 1)。

2.2 功能注释

组装获得的转录本在五个数据库 (NR、Swiss-Prot、Pfam、GO 和 KEGG)中进行比对, 以全面获得转录本功能信息, 五个数据库中中共注释 24 487 个 Unigenes, 注释率为 40.82%, 12 791 个 Unigenes 在 5 个数据库中均获得注释(图 2)。五个数据库中, NR 数据库注释的 Unigenes 最多。

表 2 测序数据统计
Tab.2 Statistics of sequencing data

样本名	原始碱基	质控碱基	有效数据	质量得分 Q20(%)	质量得分 Q30(%)	GC 含量(%)	比对到基因组的有效数据(%)
头肾 1	10 847 107 784	9 377 152 765	63 788 540	98.33	95.03	53.52	92.04
头肾 2	10 832 563 464	9 484 601 411	63 814 548	98.25	94.86	54.16	92.36
头肾 3	10 180 754 666	9 662 856 003	65 894 180	98.21	94.81	55.96	92.35
体肾 1	8 622 294 186	8 361 116 089	56 440 624	98.28	94.94	54.01	93.03
体肾 2	8 896 853 862	8 567 126 549	58 197 718	98.26	94.77	53.35	93.17
体肾 3	8 840 763 402	8 598 302 583	57 899 632	98.23	94.78	52.53	93.61

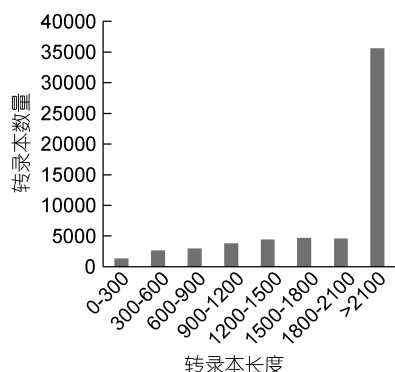


图1 转录本长度分布

Fig.1 Length distribution of transcript sequence

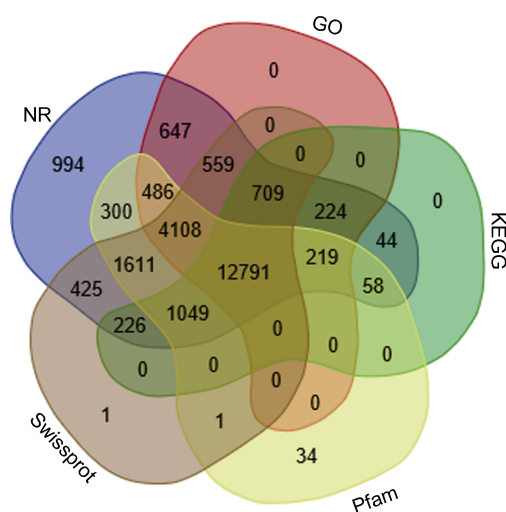


图2 基因注释信息韦恩图

Fig.2 The Venn diagram of Unigenes annotation in five databases

GO (Gene Ontology)数据库是一个对基因和蛋白

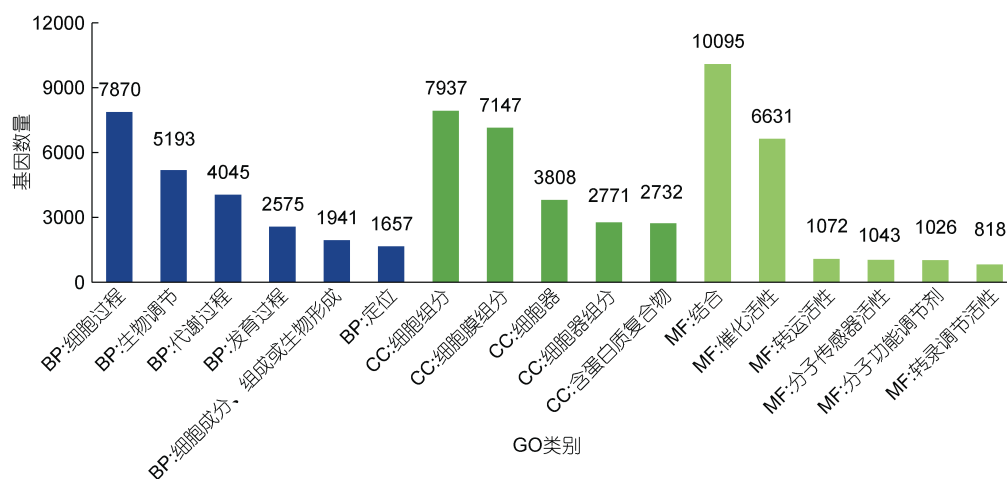


图3 基因功能 GO 类别统计

Fig.3 GO (Gene Ontology) function annotation of Unigenes
注: BP 为生物过程, CC 为细胞成分, MF 为分子功能

功能进行统一限定和描述的数据库,在 GO 数据库中,共注释到 17 838 个基因,这些基因分属于三个 GO 类别:细胞成分(cellular component, CC)、生物过程(biological process, BP)和分子功能(molecular function, MF),细胞成分类别中以“细胞部分”和“细胞膜部分”为主,生物过程类别中以“细胞过程”和“生物调节”为主,分子功能中以“结合”和“催化活性”为主(图 3)。

KEGG 数据库是一个整合了基因组、化学和系统功能信息的数据库,在 KEGG 数据库中注释到 15 319 个基因,这些基因涉及 KEGG 代谢通路的 5 个分支:环境信息处理(environmental information processing)、遗传信息处理(genetic information processing)、细胞过程(cellular processes)、代谢(metabolism)、机体系统(organismal systems),5 个分支中基因数量最多的类别为:信号转导(signal transduction)、免疫系统(immune system)、内分泌系统(endocrine system)、信号分子与相互作用(signaling molecules and interaction)以及转运和分解代谢(transport and catabolism)(图 4)。

根据 5 个数据库注释的基因信息,258 个基因在头肾中特异性表达,1 974 个基因在体肾中特异性表达。根据 KEGG 数据库注释信息,大部分免疫通路组成元件均在头肾和体肾中表达,如 Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路等组成元件;但部分免疫相关基因仅在体肾中表达(图 5),包括 C-X-C 趋化因子 9、补体 C8 γ 链、抗体重链可变区编码基因(如可变区 V3-6、V5A、V914 等)、抗体轻链 κ 链可变区编码基因(如 V-V 区 MOPC 149)。

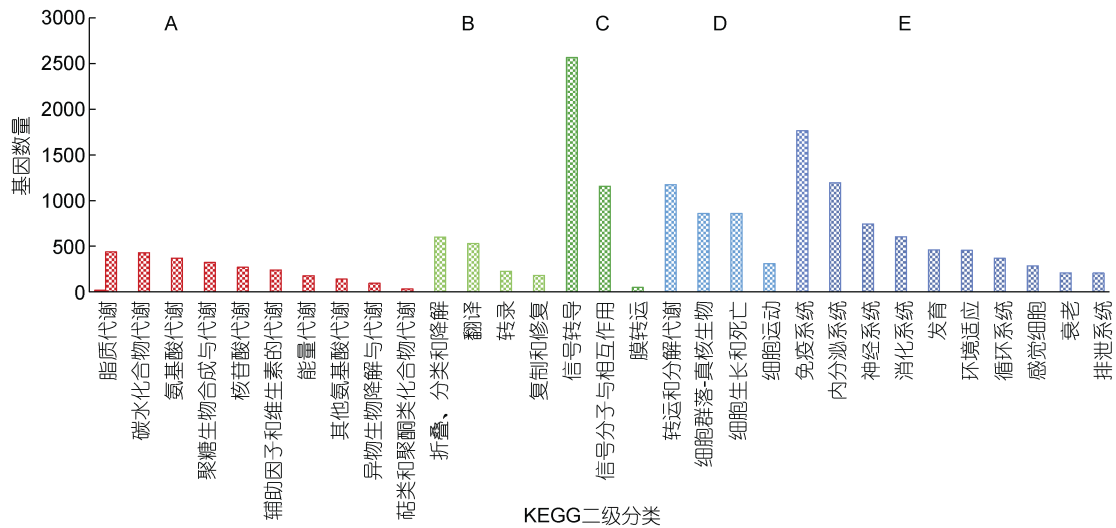


图4 基因功能 KEGG 类别统计

Fig.4 KEGG classification of Unigenes

注: A 为代谢, B 为遗传信息处理, C 为环境信息处理, D 为细胞过程, E 为机体系统

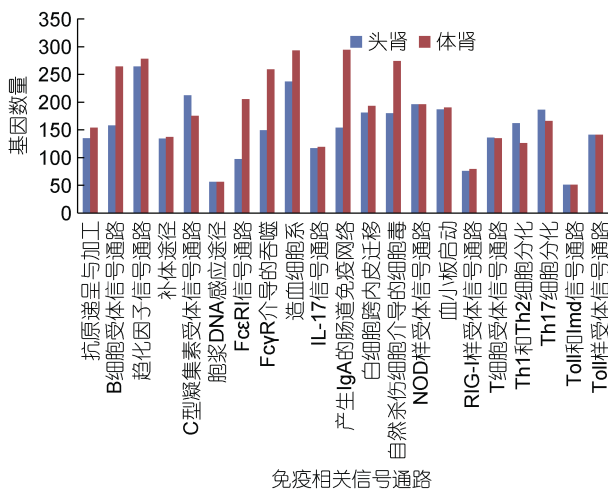


图5 头肾和体肾中免疫相关信号通路基因注释分析

Fig.5 KEGG classification of Unigenes in immune system between head kidney and trunk kidney

2.3 差异表达基因及其 GO 功能分析

黄颡鱼头肾和体肾 Unigenes 表达差异分析表明, 1 112 个基因在头肾中上调(图 6), 根据 GO 注释, 头肾中上调差异基因注释到结合 GO 类别的最多, 有 566 个; 其次是注释到细胞过程和细胞部分 GO 类别, 分别有 437 和 384 个基因。2 737 个基因在体肾中上调(图 6), 注释到催化活性 GO 类别的差异基因数目最多, 有 978 个; 其次是注释到膜部分 GO 类别, 有 890 个基因; 再次是注释到细胞过程 GO 类别, 有 819 个基因。

2.4 差异表达基因 KEGG 代谢通路富集分析

头肾中上调的差异基因富集到 263 条 KEGG 代谢通路中, 显著富集的 KEGG 通路有皮质醇的合成

和分泌、甲状旁腺激素的合成与分泌、B 细胞受体信号通路、MAPK 信号通路和 ErbB 信号通路等(图 7a)。另外, 与免疫功能相关的显著富集通路有 B 细胞受体信号通路、趋化因子信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化、Th17 细胞分化、C-型凝集素受体信号通路、Toll 受体信号通路以及 T 细胞受体信号通路。

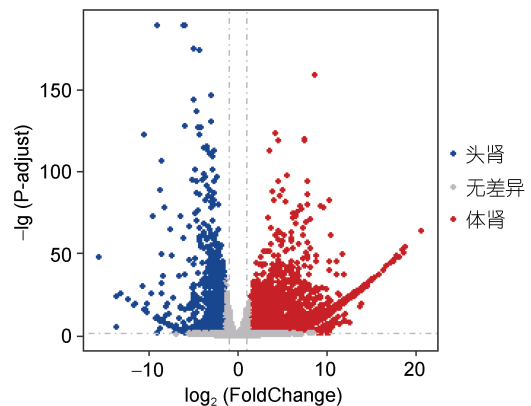


图6 差异表达基因分布火山图

Fig.6 The volcano plot of differential expressed genes
注: 蓝色点为头肾中上调基因; 红色点为体肾中上调基因

体肾中上调的差异基因富集到 324 条 KEGG 代谢通路中, 显著富集的通路有谷胱甘肽代谢、氧化磷酸化、产生 IgA 的肠道免疫网络、造血细胞系以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等(图 7b)。与免疫系统相关的显著富集通路有产生 IgA 的肠道免疫网络、造血细胞系、FcεRI 信号通路、FcγR 介导的吞噬作用和自然杀伤细胞介导的细胞毒性。

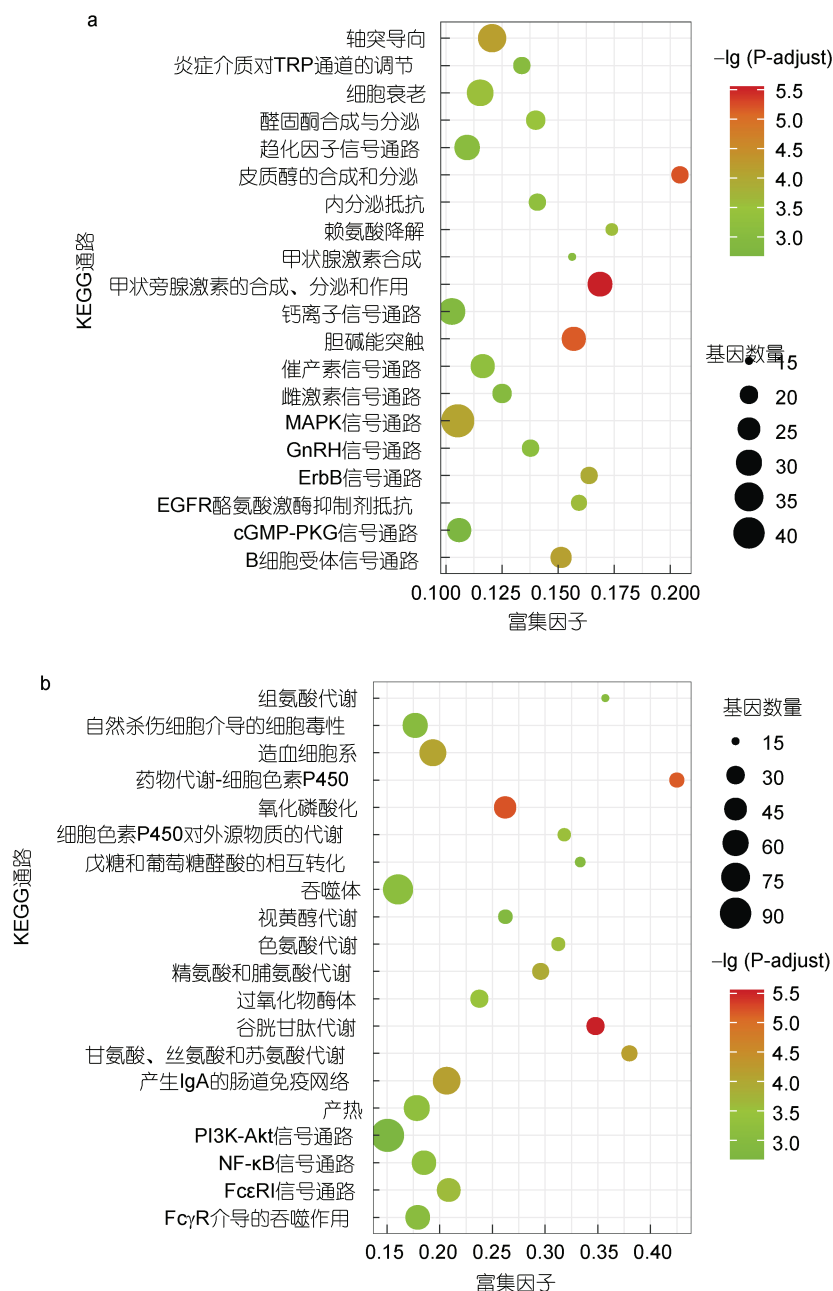


图 7 差异表达基因富集的 KEGG 通路

Fig.7 The top 20 KEGG enriched pathway of differential expressed genes
 注: a. 头肾中上调基因富集的前 20 条通路; b. 体肾中上调基因富集的前 20 条通路

2.5 差异表达关键造血和免疫基因分析

根据差异表达基因 KEGG 代谢通路富集分析, 头肾中筛选到差异表达关键免疫基因有: CD97A、CD97B、CD124、C-C 趋化因子受体 3 (C-C chemokine receptor type 3)、C-C 趋化因子受体 7 (C-C chemokine receptor type 7)、C-X-C 趋化因子受体 1 (C-X-C chemokine receptor type 1)、C-X-C 趋化因子受体 3 (C-X-C chemokine receptor type 3)、Notch 蛋白 2 和 3、

白细胞素 4 受体(interleukin 4 receptor)、TGFβ 受体 1 (TGF-beta receptor type-1)、Toll 样受体 1 和 2 (Toll-like receptor1、2)、KIT 配体(KIT ligand)、血红蛋白亚基 α 和 β、凝血因子Ⅷ (coagulation factor VIII)、早期 B 细胞因子 1 (EBF transcription factor 1)。

体肾中筛选到差异表达关键免疫基因有: 部分抗体重链可变区编码基因、部分抗体轻链 κ 链可变区编码基因、C-C 趋化因子 19 和 25 (C-C motif

chemokine19、25)、CD9、CD10、CD13、凝血因子 II 和 V (coagulation factor II, V)、羧肽酶 B2 (carboxypeptidase B2)、补体因子 D (complement factor D)、补体 5 和 9 (complement5、9)、白细胞介素 17 受体 C (interleukin 17 receptor C)、RIG-I、白细胞介素 27 (interleukin 27)、C-X-C 趋化因子 14 (motif chemokine ligand 14)、非典型趋化因子受体 4 (atypical chemokine receptor 4)、P2Y 嘌呤受体 12 (P2Y purinoceptor 12)、肿瘤坏死因子受体超家族成员 16 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 16)。

2.6 差异表达关键信号转导通路基因分析

信号转导通路组成基因在头肾和体肾中呈现不同的表达模式, 这些通路包括 PI3K-AKT 信号通路、MAPK 信号通路、Jak-STAT 信号通路、钙离子信号通路、Wnt 信号通路、ECM 信号通路、cAMP 信号通路以及 AMPK 信号通路等。

体肾中筛选到差异表达关键信号转导通路基因有: 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)、整合素 $\beta 6$ 和 8 (integrin beta 6、8)、Wnt9 蛋白、钙调蛋白 4 (calmodulin 4)。

头肾中筛选到差异表达基因有: TAK1、TAK1 结合蛋白 1 (TAK1-binding protein 1)、核因子 NF- κ B p105 亚单位(nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit)、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚单位 α/δ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha/delta)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RAC serine/threonine-protein kinase)、肌醇 1,4,5-三磷酸受体 2 型和 3 型(inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 2、3)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, or MAP3K1)、磷脂酰肌醇磷脂酶 C $\gamma 1$ (phosphatidylinositol phospholipase C, gamma-1)、转化生长因子 β 受体 1 型(TGF-beta receptor type-1)、转录共激活因子 YAP1 (transcriptional coactivator YAP1)、STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6)、叉头框蛋白 O4 (forkhead box protein O4)。

2.7 qRT-PCR 验证

为验证转录组测序结果可靠性, 采用 qRT-PCR 分析了 4 个差异表达免疫基因在头肾和体肾中的表达(表 3)。qRT-PCR 获得的结果与高通量测序结果比较表明, Toll 样受体在头肾中上调, 补体 C9 和 C-C 趋化因子 19 在体肾中上调, 与转录组测序获得的结果基本一致, 转录组测序获得的基因表达谱具有可靠性。

表 3 差异免疫基因转录组与 qRT-PCR 结果分析
Tab.3 Validation of differential expressed genes by qRT-PCR

基因 ID	基因名	log ₂ (头肾/体肾)	
		RNA-seq	qRT-PCR
<i>gene-LOC113659204</i>	<i>TLR1</i>	1.94	2.17
<i>gene-tlr2</i>	<i>TLR2</i>	1.52	1.64
<i>gene-LOC113653321</i>	<i>CCL19</i>	-2.21	-2.16
<i>gene-c9</i>	<i>C9</i>	-6.69	-5.44

3 讨论

3.1 转录组测序分析

mRNA 即信使核糖核酸, 是由一条 DNA 链为模板转录而来、携带遗传信息并能指导蛋白质生物合成的 RNA 分子。对一个物种某一组织或器官中 mRNA 进行全貌分析, 不仅能明了特定组织或器官中表达的基因及其功能, 还能揭示特定生物学过程中的分子机理。高通量转录组测序技术(mRNA-Seq)的出现, 使得对特定组织、器官以及个体 mRNA 进行全貌分析成为可能。本研究通过转录组测序, 体肾中获得 58 197 718 条有效序列, 头肾中获得 78 436 252 条有效序列, 与湖栖鳍虾虎鱼(*Gobiopterus lacustris*)性腺、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)肝脏等转录组研究中获得的有效序列相当(江红霞等, 2021; 董忠典等, 2021), 表明本研究获得的测序数据能反映两组织器官中 mRNA 表达谱。获得的测序序列经过组装获得转录本或 Unigene 后, 才能与已有的数据库进行比对, 对基因功能进行注释, 因此组装后的转录本或 Unigene 长度越长, 注释结果越准确。本研究中 60% 组装序列长度超过 2 000 bp 以上, N50 大于 3 900 bp, 获得的基因注释信息能反映两器官所表达的基因及其功能。

3.2 头肾和体肾造血功能

鱼类血细胞发生一直是研究热点, 早在 1951 年, Catton 就对几种硬骨鱼类血细胞发生过程中形态变化规律以及血细胞发生部位进行了研究, 证实硬骨鱼头肾和体肾具有造血功能(Catton, 1951)。研究进一步发现, 头肾是鱼类胚胎时期的泌尿器官, 随着个体发育失去泌尿机能, 成体时成为造血器官, 成体头肾一般不具有肾单位; 体肾中的造血组织又称为肾小管间造血组织(renal intertubular hematopoietic tissue), 其造血位置位于肾小管间(Milano *et al*, 1997)。黄颡鱼头肾和体肾转录组结果显示造血细胞系通路相关的重要基因均在头肾和体肾中表达, 如 *KIT* 配体、*CD34*、受体型酪氨酸蛋白激酶 *FLT3* (*CD135*)和 DNA

核苷酸转移酶(*TdT*)等,表明头肾和体肾是重要的造血器官,与其他研究相一致(曹伏君等, 2014; 钟爱华等, 2018)。

形态学研究发现,多种鱼类头肾和体肾中各种原始细胞和幼稚细胞比例并不完全一致。斑点叉尾鮰头肾和体肾中粒细胞系(原粒细胞、早幼粒细胞、中幼粒细胞)和红细胞系(原红细胞、早幼红细胞、中幼红细胞、晚幼红细胞)细胞比例相近、原淋巴细胞比例也接近,但头肾中有更多幼淋巴细胞(Fijan, 2002a, b); 达氏鲟红细胞系细胞在头肾中比例更高,体肾中没有原粒细胞(Liu *et al.*, 2017); 军曹鱼体肾中有更多原红细胞和原粒细胞(陈刚等, 2005)。本研究通过转录组测序也发现黄颡鱼头肾和体肾中血细胞谱系比例存在差异。KIT 配体又称干细胞因子,是造血干细胞和造血祖细胞生存、增殖和分化的一种重要生长因子(Broudy, 1997), KIT 配体在黄颡鱼头肾和体肾中均表达,表明各类原始造血祖细胞均存在于两器官中。人类和小鼠的 KIT 配体对红细胞的正常发育至关重要, KIT 配体能促使红系爆式祖细胞 BFU-E 向红系祖细胞 CFU-E 细胞转变(Broudy, 1997; Antonchuk *et al.*, 2004); 斑马鱼 KIT 配体功能研究发现其在红细胞系分化发育中发挥重要作用,斑马鱼 KIT 配体 a 是红系祖细胞 erythroid progenitors 体外扩增的必须因子(Oltova *et al.*, 2020); 这些研究表明 KIT 配体在脊椎动物中具有功能保守性。黄颡鱼头肾中 KIT 配体表达量显著高于其在体肾中的表达量,且血红蛋白亚基 α 和 β 在头肾中的表达量显著高于体肾中的表达量,表明更多红系祖细胞在头肾中分化形成幼稚红细胞,与达氏鲟形态学研究结构相一致(Liu *et al.*, 2017)。KIT 配体也是诱导髓样干细胞、粒细胞巨噬细胞系集落生成单位 CFU-GEMM 和淋巴干细胞增殖和分化的重要因子, KIT 配体与受体结合后,会触发各种信号传导级联反应,包括磷脂酰肌醇 3 激酶、MAPK、SRC 和 Jak-STAT 信号转导途径,丝裂原活化蛋白激酶 1、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚单位 α/δ 和 STAT6 基因均在黄颡鱼头肾中上调,这意味着更多的淋巴细胞、粒系祖细胞、单核系祖细胞在头肾中增殖和分化。早期 B 细胞因子 1 在 B 细胞早期分化过程中起重要作用(Lin *et al.*, 1995), 其功能在动物中高度保守,斑马鱼、鳐和小鼠 *EBF1* 中 DNA 结合域几乎 100% 同源(Zwollo, 2011); 在哺乳动物中,早期 B 细胞因子 1 主要存在淋巴干细胞 CLPs、pro-B 细胞以及部分 pre-B 细胞中(Hystad *et al.*, 2007); 早期 B 细胞因子 1

在黄颡鱼头肾中显著上调,头肾中表达量是体肾中表达量的 10 倍以上($\log_2\text{FoldChange}=3.69$),表明更多的淋巴干细胞和 pro-B 细胞存在于黄颡鱼头肾中。

3.3 头肾和体肾免疫功能

鱼类头肾和体肾除具有造血功能外,还是重要的免疫器官,鱼类肾造血组织存在黑色素巨噬细胞中心,其中有大量含色素的巨噬细胞,这些黑色素巨噬细胞能吞噬降解体内各种外源性和内源性物质以及在免疫应答中递呈抗原(Agius *et al.*, 2003; Zwollo *et al.*, 2005; Abdel-Aziz *et al.*, 2010)。本研究发现,黄颡鱼头肾和体肾中免疫信号通路相关基因的表达存在差异。头肾中多个差异表达基因富集到 Toll 信号通路,而 Toll 信号通路能激活 NF- κ B 核转录因子,从而导致促炎症因子、抗炎细胞因子和趋化因子表达(任美玉, 2006)。Toll 样受体如同天然免疫的眼睛,能识别各种不同的病原相关分子模式(PAMP), Toll 样受体 1 和 2 能识别多种细菌和真菌 PAMP,如脂蛋白、脂壁酸和酵母多糖。Toll 样受体 1 和 2 在黄颡鱼头肾中上调,表明黄颡鱼头肾是识别和抵抗细菌和真菌感染的重要器官。

补体是存在于脊椎动物血清蛋白质中的一组蛋白,攻膜复合体 C5b6789n 能在细胞膜上形成亲水性孔道,是补体发挥免疫功能的重要途径。趋化因子是一类介导免疫细胞迁移的细胞因子。C-C 趋化因子 19 和 25、C-X-C 趋化因子 14、补体因子 D、C5 和 C9 均在体肾中显著上调,尤其是补体 C9,其在体肾中的表达量显著高于头肾(表 3),表明体肾是重要的免疫分泌器官。

4 结论

本研究对黄颡鱼成体造血组织头肾和体肾进行了 RNA-Seq 转录组测序,并对获得的测序有效序列进行组装、基因信息注释和表达量分析,头肾中共注释 20 956 个基因、体肾共注释 24 487 个基因,1 112 个基因在头肾中上调,包括 *KITL*、*EBF1*、*CD124*、*CCL3* 等; 2 737 个基因在体肾中上调,包括 *CCL25*、*C5*、*C9*、*RIG-I*、*IL-17RC* 等,部分抗体编码基因仅在体肾中表达; 结果表明黄颡鱼头肾和体肾在造血和免疫功能上具有差异性,头肾中有更多的原始造血细胞,体肾在免疫防御中发挥重要作用。

参 考 文 献

王国鑫, 陈 冰, 孙育平等, 2020. 脱脂亮斑扁角水虻幼虫粉替代鱼粉对黄颡鱼幼鱼生长性能、营养素沉积率、血清生

- 化指标和消化酶活性的影响. 水产学报, 44(6): 987—998
- 江红霞, 刘慧芬, 马 晓等, 2021. 转录组测序筛选克氏原螯虾卵巢发育、免疫和生长相关基因. 水产学报, 45(3): 396—414
- 任美玉, 2006. Toll 样受体的研究进展. 现代免疫学, 26(4): 340—342
- 陈 刚, 周 晖, 张健东等, 2005. 军曹鱼血液指标及血细胞发生的观察. 水生生物学报, 29(5): 564—570
- 张健东, 周 晖, 陈 刚等, 2007. 卵形鲳鲹血细胞发生的观察. 水生生物学报, 31(6): 780—787
- 苑淑宾, 朱爱意, 江丽华等, 2011. 日本黄姑鱼血细胞发生的观察. 水产学报, 35(9): 1374—1383
- 郭 勋, 程 珂, 马春松等, 2020. 饲料中维生素 D₃ 的添加水平对黄颡鱼幼鱼生长和 Toll 样受体 TLR18、TLR19 和 TLR21 的影响. 水生生物学报, 44(3): 461—469
- 胡伟华, 丹 成, 郭稳杰等, 2019. 黄颡鱼和杂交黄颡鱼“黄优 1 号”形态及性腺发育的比较. 水生生物学报, 43(6): 1231—1238
- 钟爱华, 储张杰, 牟 毅等, 2018. 斜带髯鲷(*Haplochromis nitens*)血细胞发生及外周血细胞化学染色观察. 海洋与湖沼, 49(6): 1341—1349
- 曹伏君, 叶 宁, 罗 杰等, 2014. 长鳍裸颊鲷(*Lethrinus erythropterus*)血细胞的发生. 海洋与湖沼, 45(2): 387—394
- 董忠典, 黎学友, 黄承勤等, 2021. 湖栖鳊鱼虎鱼性腺转录组比较分析. 水产学报, 45(3): 365—380
- 蔺凌云, 冯东岳, 潘晓艺等, 2020. 黄颡鱼拟态弧菌的鉴定、毒力相关因子及药敏特性. 水生生物学报, 44(4): 799—810
- Abdel-Aziz E S H, Abdu S B S, Ali T E S *et al*, 2010. Haemopoiesis in the head kidney of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae): a morphological (optical and ultrastructural) study. Fish Physiology and Biochemistry, 36(3): 323—336
- Agius C, Roberts R J, 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. Journal of Fish Diseases, 26(9): 499—509
- Antonchuk J, Hyland C D, Hilton D J *et al*, 2004. Synergistic effects on erythropoiesis, thrombopoiesis, and stem cell competitiveness in mice deficient in thrombopoietin and steel factor receptors. Blood, 104(5): 1306—1313
- Arockiaraj J, Bhatt P, Harikrishnan R *et al*, 2015. Molecular and functional roles of 6C CC chemokine 19 in defense system of striped murrelet *Channa striatus*. Fish & Shellfish Immunology, 45(2): 817—827
- Broudy V C, 1997. Stem cell factor and hematopoiesis. Blood, 90(4): 1345—1364
- Buchfink B, Xie C, Huson D, 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. Nature Methods, 12(1): 59—60
- Catton W T, 1951. Blood cell formation in certain teleost fishes. Blood, 6(1): 39—60
- Fijan N, 2002a. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. Journal of Fish Biology, 60(4): 999—1014
- Fijan N, 2002b. Composition of main haematopoietic compartments in normal and bled channel catfish. Journal of Fish Biology, 60(5): 1142—1154
- Han F, Zhang Y, Qin G *et al*, 2021. Genome-wide characterization of Toll-like receptors in Japanese meagre *Argyrosomus japonicus* and their response to poly (I:C) injection. Aquaculture, 542: 736907
- Hystad M E, Myklebust J H, Bø T H *et al*, 2007. Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. Journal of Immunology, 179(6): 3662—3671
- Li D P, Xie C X, He X G *et al*, 2018. The Success of Yellow Catfish Aquaculture in China: from rare wild fish to popular farmed fish. In: Gui J F, Tang Q S, Li Z J eds. Aquaculture in China: Success Stories and Modern Trends. Hoboken: John Wiley & Sons Ltd, 270—282
- Lin H, Grosschedl R, 1995. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. Nature, 376(6537): 263—267
- Liu Y, Xiao Q, Yang S *et al*, 2017. Characterization of hematopoiesis in Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*). Aquaculture and Fisheries, 2(6): 262—268
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. Methods, 25(4): 402—408
- Lu Z J, Zhan F B, Yang M X *et al*, 2021. The immune function of heme oxygenase-1 from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in response to bacterial infection. Fish & Shellfish Immunology, 112: 168—178
- Milano E G, Basari F, Chimenti C, 1997. Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology, and immunohistochemistry. General and Comparative Endocrinology, 108(3): 483—496
- Ohtani M, Hikima J I, Kondo H *et al*, 2011. Characterization and antiviral function of a cytosolic sensor gene, MDA5, in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Developmental & Comparative Immunology, 35(5): 554—562
- Oltova J, Svoboda O, Machonova O *et al*, 2020. Zebrafish Kit ligands cooperate with erythropoietin to promote erythroid cell expansion. Blood Advances, 4(23): 5915—5924
- Ou M, Huang R, Luo Q, *et al*, 2019. Characterisation of scavenger receptor class B type 1 in rare minnow (*Gobiocypris rarus*). Fish & Shellfish Immunology, 89: 614—622
- Wang Q, Wang S W, Zhang Y *et al*, 2019. The CXC chemokines and CXC chemokine receptors in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) and their expression after Singapore grouper iridovirus infection. Developmental & Comparative Immunology, 90: 10—20
- Zhu Q, Fan Z J, Cai S X *et al*, 2020. Molecular and immunological characterizations of interleukin-11 in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Fish & Shellfish Immunology, 100: 9—17
- Zwollo P, 2011. Dissecting teleost B cell differentiation using transcription factors. Developmental & Comparative Immunology, 35(9): 898—905
- Zwollo P, Cole S, Bromage E *et al*, 2005. B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. Journal of Immunology, 174(11): 6608—6616

COMPARATIVE TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF THE HEAD KIDNEY AND TRUNK KIDNEY IN ADULT YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

ZHONG Ai-Hua, DAI Xiao-Xin

(College of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract The immune system of teleost is unique because the head kidney and trunk kidney are the sites for hematopoiesis and immune response. To explore the differences of hematopoiesis and immune function between head kidney and trunk kidney, the transcriptomes of head kidney and trunk kidney of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* were sequenced through high-throughput sequencing technology. After trimming and filtering, clean reads were assembled into 59 979 transcripts with N50 value of 3 919 bp. A total of 24 487 Unigenes were annotated in five databases (GO, KEGG, NR, Pfam and Swissprot). Gene expression profile in the head kidney and trunk kidney were analyzed, and 3 949 differentially expressed genes (DEGs) were found. Among the DEGs, 1 112 genes were highly expressed in head kidney, including KIT ligand, Early B cell factor 1, Toll-like receptor 1, Toll-like receptor 2 etc. In total, 3 527 genes were highly expressed in trunk kidney, including C-C motif chemokine19, C-C motif chemokine 25, complement C5, C9, interleukin 17 receptor C, RIG-I, interleukin 27, etc. Some immune-related genes were expressed in trunk kidney only, such as encoded gene of immunoglobulin heavy chain and light chain. The results show that hematopoiesis and immune function between head and trunk kidney are different from each other. This study will help explore the immune defense mechanism of yellow catfish and other teleosts.

Key words yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*; head kidney; trunk kidney; RNA sequencing