

黄喉拟水龟巨噬细胞炎症蛋白-3 α 基因的 序列特征与组织表达

龙建杰^{1,2} 朱新平^{1,2} 史燕¹ 赵密² 刘阳^{1,2}

1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所/农业部热带亚热带水产种质资源利用与养殖重点实验室, 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要 利用已构建的黄喉拟水龟(*Ma*)SMART 全长 cDNA 文库, 筛选得到巨噬细胞炎症蛋白-3 α (MIP-3 α) 全长 cDNA 序列, 通过设计引物、克隆测序验证, 采用相关软件对基因的结构与功能进行预测, 并利用实时荧光定量 PCR 对 *MaCCL20* 组织表达特征进行分析。序列结构分析结果表明, *MaCCL20* cDNA 全长 2 318 bp, 开放阅读框为 261 bp, 共编码 86 个氨基酸, 其蛋白为疏水性, 不存在跨膜结构。同源性分析表明, 黄喉拟水龟 *CCL20* 与变色蜥(*Anolis carolinensis*) 亲缘关系最近, 与原鸡(*Gallus gallus*) 其次, 与哺乳动物的同源性很低; 荧光定量 PCR 结果表明, *MaCCL20* 在肝脏、肾脏、心脏、脾脏中均有表达, 其中脾脏中表达量最高。

关键词 黄喉拟水龟; 巨噬细胞炎症蛋白-3 α ; cDNA 文库; 序列分析; 组织表达

中图分类号 S 947 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)05-0112-07

黄喉拟水龟(*Mauremys mutica*), 俗称石龟、香乌龟, 隶属龟鳖目(Testudines)、地龟科(Geoemydidae)、拟水龟属(*Mauremys*), 国内主要分布于浙江、江苏、安徽、广西、广东、海南、香港、福建及台湾等地, 国外主要分布于日本和越南。黄喉拟水龟的药用、食用及观赏价值都比较高, 在广西和广东已被列为受保护水生动物。随着黄喉拟水龟人工繁殖及饲养取得成功^[1-2], 其逐渐显露出良好的经济前景。

巨噬细胞炎症蛋白(macrophage inflammatory protein, MIP) 是 1988 年 Wolpe 等^[3] 用内毒素刺激巨噬细胞系 RAW 264. 7, 在其上清液中发现的一类蛋白质。趋化因子(chemokine) 是一类可诱导的、相对分子质量在 8 000~10 000 之间的分泌蛋白^[4]; 根据 N 末端保守半胱氨酸的排列方式的不同, 趋化因子可分为 CC 亚族、C 亚族、CXC 亚族和 CX3C 亚族 4 类。巨噬细胞炎症蛋白-3 α (MIP-3 α) 又名 CCL20, 属 CC 亚族, 相对分子质量为 9 000^[5], 曾被称为肝脏活化调节趋化因子(liver and activation-regulated chemokine, LARC) 和 Exodus。趋化因子由多种细胞产生, 它通过与相应的受体结合后

产生跨膜信号来实现对多种白细胞如淋巴细胞、单核细胞、树突细胞、中性粒细胞(DC) 等的趋化作用。CCL20 是至今发现的 50 多种趋化因子中唯一一个具有配体与受体结合特异性的 CC 亚类趋化因子, 其唯一的受体 CCR6 属于 7 次跨膜孤儿受体, 分布于未成熟 DC、T、B 细胞及中性粒细胞上^[6-7]。CCL20 具有一定的限制性表达部位, 即粘膜和炎症上皮组织^[8], 对免疫细胞有很强的趋化作用^[9-11]。已有的研究显示 CCL20 在结核、胃肠道炎症、前列腺癌、鼻咽癌等疾病的免疫反应中扮演着重要角色^[12-15]。

现阶段, 对 CCL20 的研究主要集中在人体免疫疾病方面, 对其他物种的研究还比较少。赵密等^[16] 以黏质沙雷氏菌诱导黄喉拟水龟, 用 SMART 技术构建了黄喉拟水龟的全长 cDNA 文库, 其中巨噬细胞炎症蛋白-3 α 基因为 cDNA 文库中 9 个免疫相关基因之一。本研究根据黄喉拟水龟 cDNA 文库筛选克隆出巨噬细胞炎症蛋白-3 α 基因全长 cDNA 序列, 并对其基因序列特征及组织表达进行分析, 旨在为后续蛋白功能方面的研究提供基础数据。

收稿日期: 2012-06-27

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2011GB23260021)、中国水产科学研究院院级基本科研业务费专项(2012A0403) 和广州市珠江科技新星专项(2012089)

龙建杰, 硕士研究生。研究方向: 种质资源与遗传育种。E-mail: CD_Dragon@126.com

通讯作者: 朱新平, 研究员。研究方向: 种质资源与遗传育种。E-mail: zhuxinping_1964@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 试验用龟

本试验所用黄喉拟水龟于2011年9月取自珠江水产研究所乌龟繁育基地,体质量为140 g左右,健康无病,试验前暂养1周。

1.2 试剂及试剂盒

Taq DNA pol、10 \times *Taq* buffer、MgCl₂均购自Fermentas; DL2000 Marker、SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] (Tli RNaseH Plus)、PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time)、DH5 α 感受态、pMD18-T Vector Systems均购自宝生物工程(大连)有限公司;动物组织总RNA提取试剂盒、DNA纯化回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;引物合成及测序在英潍捷基(上海)贸易有限公司进行。

1.3 cDNA 全长克隆

以笔者所在实验室构建黄喉拟水龟 cDNA 文库所得 cDNA 为模板,根据文库中 cDNA 全长序列设计特异性引物(表1)。PCR 扩增体系为:10 \times *Taq* buffer 2 μ L, MgCl₂ 2 μ L, dNTP mix 0.5 μ L, *Taq* DNA pol 1 μ L, 模板 1 μ L, 引物上下游各加 0.5 μ L, 加水至 20 μ L。PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后将 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s 过程进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应中退火温度主要取决于引物的 T_M 值, 根据 PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳中的电泳结果来调整引物的退火温度。

表1 cDNA 克隆引物序列

Table 1 cDNA cloning primer sequence

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')	位置 Location	扩增长度/bp Length
F1R1	S:GGGAGGAGGTCAGGTAAG	6	300
	A:ACTGCTTTGCTCGTTAT	305	
F2R2	S:ATAACGAGGCAAAGCAGTCA	288	1 110
	A:TGCCCAATTTCCATACGAAC	1 397	
F3R3	S:ATCTGTCCCATTCACCAA	1 086	1 164
	A:TTCACCTTCCCTCAAGC	2 249	
F4R4	S:AGACCGCTGGGTGAAGAA	1 723	627
	A:AGTGGTATCAACGCAGAG	2 339	

用 DNA 纯化回收试剂盒回收 PCR 扩增出来的单一条带,将所得 DNA 片段按照 T 载体说明书连接到 pMD18-T 克隆载体上,连接体系如下:pMD18-T Vector 0.6 μ L, 纯化 PCR 产物 4.4 μ L, Ligation Solution I 5 μ L, 总体积 10 μ L。反应体系于 16 $^{\circ}$ C 水浴中连接过夜。

取 5 μ L 连接产物加入到 100 μ L DH5 α 菌株中,冰浴 30 min,再热激 90 s,加入 800 μ L LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C、180 r/min 于摇床上培养 1 h;将培养菌液均匀涂布于含氨苄的固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 倒置过夜;次日于平板上随机挑取 5 个饱满单一菌落进行扩大培养,通过菌液 PCR 鉴定后选取阳性克隆测序。

1.4 序列分析

利用 NCBI 中 blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 对 cDNA 序列的同源性进行分析,采用 MEGA5.0 软件,以邻位相连法(N-J)构建系统发育进化树;利用 ExPASy 中 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对蛋白质分子质量及等电点进行预测,ProtScale (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 对氨基酸序列疏水性进行分析;利用 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl) 对蛋白二级结构进行分析;利用 CBS Prediction Servers 中的 TM-HMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TM-HMM>) 对蛋白的跨膜结构进行预测;利用蛋白质功能位点数据库 Prosite (<http://www.expasy.org/prosite>) 对蛋白保守域与功能进行预测;利用 CPH-models (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPH-models/>) 对蛋白的三级结构进行预测。

1.5 总 RNA 的提取及反转录

取黄喉拟水龟新鲜肝脏、肾脏、心脏和脾脏组织,用动物组织总 RNA 提取试剂盒提取各组织总 RNA。所得 RNA 用普通琼脂糖凝胶电泳检测其完整性(电泳条件为:1.2%琼脂糖凝胶;0.5 \times TBE 缓冲液;150 V 电泳 15 min)。取 1 μ L RNA 提取物,用 RNase-free ddH₂O 稀释 50 倍,以 RNase-free ddH₂O 为空白对照组,用分光光度计测定 RNA 的浓度。

以总 RNA 为模板,通过 PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒来合成 cDNA 第一链,反应结束后,将所得 cDNA 储存于 -80 $^{\circ}$ C 中以备荧光定量 PCR 实验使用。

1.6 组织表达分析

根据黄喉拟水龟 *CCL20* 基因的全长 cDNA 序列设计 1 对定量 PCR 特异性引物 *CCL20-F* (TCCTGGCCTCTTTGATGG) 和 *CCL20-R* (AGCGGTCTTCTGGATTTG), 以 β actin-F (GATGTG-GATCAGCAAGCA) 和 β actin-R (GGGCAAAGTTTACAAGTAA) 为内参引物,以反转录所得

cDNA 为模板进行荧光定量 PCR。总反应体系为 20 μ L, 包含有 10 μ L 的 2 \times SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TaKaRa), 7.8 μ L 的双蒸水, 1 μ L 模板, 0.4 μ mol/L 引物以及 Rox Reference Dye II 0.4 μ L, 每个样品设置 3 个重复, 以蒸馏水代替模板作为阴性对照。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 总共 40 个循环。试验结果采用相对 CT 法 (2^{- $\Delta\Delta$ CT} method) 对 CCL20 在各组织中的表达特征进行分析。

2 结果与分析

2.1 黄喉拟水龟 CCL20 cDNA 全长序列分析

对 4 对特异性引物克隆所得预期大小片段进行测序, 拼接后得到黄喉拟水龟 CCL20 基因 cDNA 完整序列。黄喉拟水龟 CCL20 基因 cDNA 全长 2 318 bp, 其 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 长 1 525 bp, 3' 端的非编码区 (3' UTR) 长 532 bp。3' 端有一个 27 bp 的 polyA 尾巴。其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 261 bp, 该 ORF 含有起始密码子 ATG 及终止密码子 TAA, 编码框完整, 共编码 86 个氨基酸。

MaCCL20 基因 cDNA 全序列及预测氨基酸序列如图 1 所示。

通过 NCBI 中 blast 软件将黄喉拟水龟 CCL20 基因 cDNA 与其他物种 CCL20 核苷酸序列进行比对, 结果发现黄喉拟水龟与原鸡 (*Gallus gallus*)、变色蜥 (*Anolis carolinensis*)、斑胸草雀 (*Taeniopygia guttata*) 以及火鸡 (*Meleagris gallopavo*) 的同源性比较高, 相似性介于 75%~82%; 跟哺乳动物的同源性很低。用 MEGA5.0 软件, 以邻位相接法 (Neighbor-joining) 构建系统进化树 (图 2)。通过 CCL20 系统树可以看出, 黄喉拟水龟与同为爬行动物的变色蜥同源性最高, 其次是鸟类; 与哺乳类同源性较低。

2.2 黄喉拟水龟 MIP-3 α 结构分析

通过 ProtParam 对黄喉拟水龟 MIP-3 α 氨基酸序列进行分析可知, MIP-3 α 的分子质量为 9 740.4 u, 等电点为 9.18, 预测该蛋白不稳定, 不稳定指数为 46.12。利用 Protscale 对 MIP-3 α 的亲水性进行分析, 结果表明, 第 68 个氨基酸得分最低 (-2.344), 其亲水性最强, 第 49 个氨基酸得分最高 (2.278), 其疏水性最强。在整个多肽链中, 有 50 个氨基酸位点亲水性 < 0, 为疏水性氨基酸, 其个数明显高于亲水性氨基酸 (图 3), 据此推测 MaMIP-3 α 为疏水性蛋白。通过 SignalP 对 MaMIP-3 α 信号肽进行预测, 发现信号肽位于 1~14 氨基酸位点上, 分

```

0 001   ACGCGGGGAGGAGGTCAGGTCAAGTGAAGTGTCTGCAGCCAAATCAGCTTGTGCAGCAGGTTTTTCATCTTTAATTAGCATATAGGTCAGTTATCACAACCTGTGTATAATCAAGGGGAGG
0 114   TCATTAAATAGATGTTACAAGTGTATAGTAACTCCAAAGAGCCCTTTGTAGAGGTACATAGCTACACTGTCAAACAACTGATAGACACCACATAACTCTCCTCATCTCTCTCTC
0 229   CTAAGAAGCTAAAGTAAATGCAGAAAGCCCTCAGATCTGGATATTTTTGTCTTGGGATCTTATAACGAGGCAAGCAGTCAGTAAATATGCCCATGTTTTCAGAGGGACCTCAAAC
0 344   GCTCTCTAAAATCACAAGTTCAGGCTGTGCACCTATGTTTTGCAAGTGCAGTTTTTCATGGGACTAAATATGGAATTTGCTACAGAAAGTGCATTTGTGTGCAAAATAGAGT
0 459   AGTTACAGGCTACCTAAATTTGCTTATGTGAGCAACAATAATTGACATGAAAAATACAGCCACAATTCAGAAGTTGCTTTGGGAAGTTTGTATTTAAATATATAGTTTGTCTT
0 574   ACAGAGACTGGAGGATCAATGGTGTATTCTGTAGATCAGTTTTTACCAGTCTTACACAAAAGCAGCATGCATGTGTGAGAGTTAGATGATGAATTAGAATCAGAAATT
0 689   TGTGATGTTGGGTTTTCTTCCACATGTCATTTCTATAGTAAAACTGAATCCTTCCCATGATTAAGAGAGGAAAGTGGATCATATGGCAATAATGTCTGGGGATCAAGGAA
0 804   TATTTCCAGCAATTAGGGAGACAGGACGGGATTTGGAATTTGTTCTGGGCAAGAGTCTCAAACCTGCTCACCCTCCCAACTGCCCAACTCTCTCTGTGTGACCCCACTAATTA
0 919   TAAAGTGTGTTACCAACTGGAATGGGCTACTTTTTCTCTAATGCATTTTTCTCTCTTGTAGAGCTGGAAGTGGTATAGGACATTAGCACTTATGCTGTGCATGTATTGC
1 034   TATTCATTGACTCTGCATGGTGCAGAGGTATTGTTGCAGAGAGTCTGGGGATCTGTCCCAITCACCAACCCCTTATAGCCACTGGAACAAAAGAGAGAGGAAAGTTCAGAA
1 149   GACACTGGAGATTGCAACCTAATTAATCTGAAAGCAGACAAAAGGAGGAAAGGTTGGTTGGGGTGAGGAAATCCAGTTAAGCCCTGTGACGGACCCATGACGAAGGTTGGGAGA
1 264   TAAGAGAACTTTGGGTTTGGAGACTATTGAAATCCAGTTCTGGGCTTCCATGCACCACATAAGAGAGAGTGGGAAATTTGGCCAAAGGATGCTGGAGCAACACTACTGTACG
1 379   TTGCTATGGAAATTTGGCAGGCCCTTCCATACTAATAGTTAACTTAATGGAACCTCAAGATTTCTATCGAAAAGGATGAGTTGAATCAGCCCTACTAGGATATGAACCTGTGAT
1 494   TCCAGGCAAGAAGCTTGATCTGGCCTCTTGTATGGGGCTGCTGCTATTGTACTGTCTGGCACTTCTGAAGCACAACAAACAGAAATGCTGCCTCTCTTACTCCAAAAGTACG
                                     M G L L L L L Y L S G T S E A Q N N Q D C C L S Y S K V
1 609   GCTGCTCAGGAGTCATAAAGGGCTATACAGACAGCTATCCAGTGAAGTTGTGCATCAGTGCATCATTTTTCCACAAGAATGGAAATGAAAGCTGTGCAAAATCCAGAA
R L P R G V I K G Y T E Q L S S E V C D I S A I I F H T K N G M K A C A N P E
1 724   GACCGCTGGTGAAGAAGCATCTTTCTTGGCTGAGCCATAAACTCAAGAAGATGTCACCTGTAATGTGGTTTTGAAATGGAACAGAAACAGGAGGCTCAAAAACCTAAAATA
D R W V K K H L L W L S H K L K K M S L *
1 839   GGTGGAATCATCTTTGTACACAGATGTGCTTACTGACCATTATTCCTGGCTTCTTGGAAACATTGAACTACTGAAGATGATCATATTGCATCATTGTTGCTTGACTTAA
1 954   GCATTTTGTAAAGTGTCTTTTTCTTCTTAATATAACATAATTTGATTACTATATAAAGAAAGAAACTGTTTTAACTATTATACAAAATATGTGCCATTCGGGTTTAGAGCA
2 069   TTTGGATGTCATTTGTGCTAATTTGACAAAGTAAATAGATAATTTATTATTTAATTTGTTACATCATAGGCATTTTTTGGCCAAAAGCTGTGCCCTTTTAACTCTAAGTAATG
2 184   TAATCAAGAACAATGGATTAATGTTTTAGACTACTGTAAAAAGCTGCTTGGGAAAGTGGAAATTTGTGAAACTTTAAAAATGACATTTAAAAATCCAAAATGACAAAAAAA
2 299   AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

信号肽以单下划线标出, 终止密码子用 * 表示 The signal peptide is marked with a single underscore, stop codon with *.

图 1 黄喉拟水龟 CCL20 基因 cDNA 全序列及预测的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA sequence and predicted amino acid sequence of CCL20 gene *Mauremys mutica*

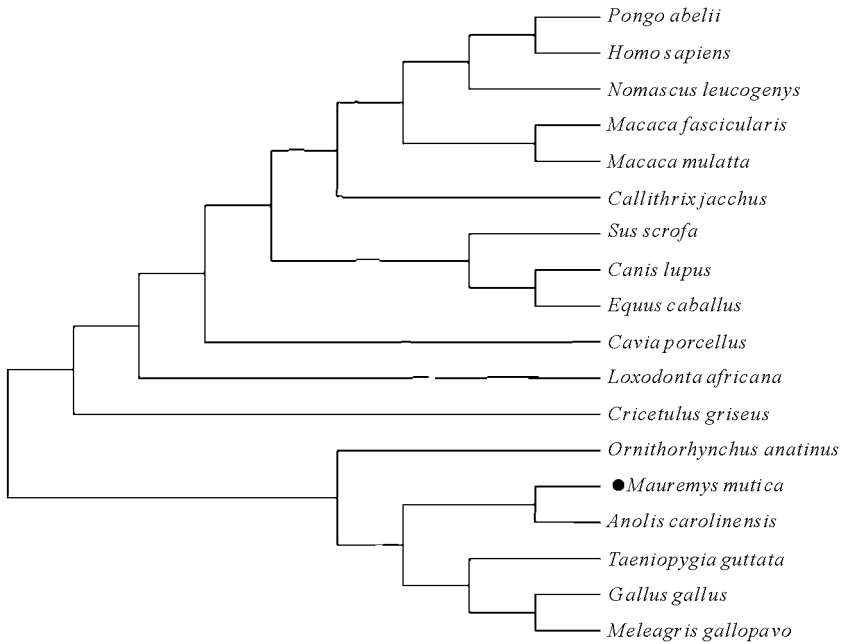


图 2 CCL20 基因系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of CCL20 gene

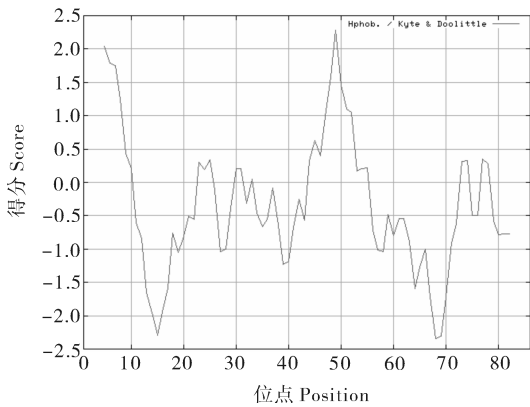


图 3 MaMIP-3 α 亲水性预测

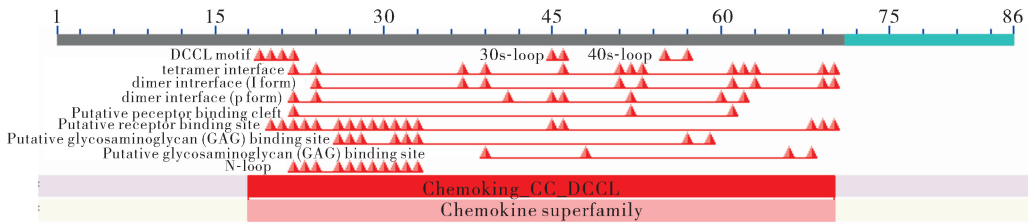
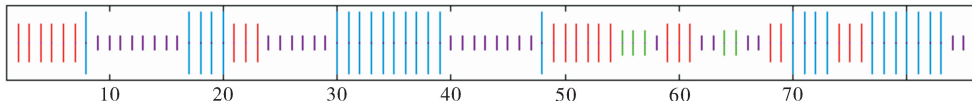
Fig. 3 Hydrophilic prediction of MaMIP-3 α

裂点位于 14~15 位氨基酸之间,并推测该蛋白为分泌性蛋白,合成于细胞质中,切除信号肽后会形成成熟蛋白质。经 TMHMM 跨膜结构预测分析发现, MaMIP-3 α 不存在跨膜结构。通过蛋白质功能位点数据库 Prosite 对 MIP-3 α 氨基酸序列的结构功能域进行分析,发现在其多肽链的 20~63 氨基酸位置存在着结构功能域:SMALL_CYTOKINES_CC,为 CC 亚族小型细胞因子区域,又名趋化因子。利用 NCBI 中 Conserved Domain Search 软件推测 MaCCL20 氨基酸所含的保守区域,结果如图 4 所示, MaMIP-3 α 保守区域同时具有趋化因子超家族

(chemokine superfamily) 和趋化因子 CC 亚族 DCCL 特殊结构域特征(18~71 aa)。其中,CC 亚族 DCCL 结构保守区域包含有 4 个 DCCL 主体域结合位点、2 个 30s 环结合位点、2 个 40s 环结合位点、13 个四聚体结合位点、9 个二聚体(I 型)结合位点、8 个二聚体(P 型)结合位点、3 个假定受体断开位点、18 个假定受体连接位点、12 个假定糖胺聚糖结合位点以及 11 个 N 环结合位点。通过 ExPASy 中 SOPMA 对 MaMIP-3 α 的二级结构进行分析,结果发现 MIP-3 α 的二级结构中含有较多的 α 螺旋、延伸链和无规卷曲,其中 α 螺旋数为 29 个,延伸链为 23 个,不规则卷曲有 29 个, β 转角数量较少,为 5 个(图 5)。利用 CPHmodels 预测得到 MaMIP-3 α 的三级结构如图 6 所示,可以看出: α 螺旋、不规则卷曲及延伸链为 MaMIP-3 α 最大结构元件。

2.3 黄喉拟水龟 CCL20 基因组织表达分析

通过 ABI StepOne 定量 PCR 仪匹配计算机应用程序对 PCR 结果进行分析,以 β actin 在心脏中的表达量为参照可得到 MaCCL20 基因在各个组织中相对表达量柱状图(图 7)。结果显示,CCL20 基因在黄喉拟水龟的肝脏、肾脏、心脏和脾脏这 4 个组织中均有表达,其中,脾脏中表达量最高,心脏表达最低,其相对表达量关系为脾脏(19.6 倍)>肝脏(9.1 倍)>肾脏(2.0 倍)>心脏(1.0 倍)。

图 4 MaMIP-3 α 保守区域预测Fig. 4 The conservative region prediction of MaMIP-3 α 

红色为延伸链, 蓝色为 α 螺旋, 绿色为 β 转角 Red for the extension of the chain, blue α -helices, green β -turn.

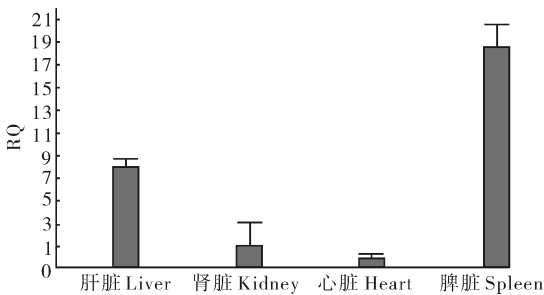
图 5 MaMIP-3 α 二级结构预测Fig. 5 The secondary structure prediction of MaMIP-3 α 图 6 MaMIP-3 α 三级结构预测Fig. 6 The tertiary structure prediction of MaMIP-3 α 

图 7 CCL20 在不同组织中表达柱状图

Fig. 7 The bar chart of expression of CCL20 in different organization

3 讨论

本研究首次在龟中克隆得到 CCL20 cDNA 全长序列。将 MaCCL20 cDNA 全长与 GenBank 中其他物种 CCL20 进行比对, 结果发现 MaCCL20 cDNA 前 1 428 bp 序列与其他物种相比没有任何同

源性。MaCCL20 cDNA 全长 2 318 bp, 比一般物种 CCL20 的 cDNA (如人类 0.85 kb, 原鸡 0.88 kb) 要长很多; 而其开放阅读框 ORF 为 261 bp, 编码着 86 个氨基酸, 这与其他很多物种 (如人类 ORF 为 288 bp, 原鸡 ORF 为 300 bp) 相近。本试验对黄喉拟水龟 cDNA 文库中 CCL20 cDNA 全长进行了克隆, 并通过测序比对验证其正确性。同源性分析结果显示, 黄喉拟水龟 CCL20 基因与爬行类同源性最高, 与鸟类同源性其次, 与哺乳类同源性最低, 这与高明英等^[17] 在黄喉拟水龟转铁蛋白 (TF) 基因同源性分析所显示的物种进化亲缘关系一致。

巨噬细胞炎症蛋白-3 α 是一种天然的抗菌蛋白, 其对球菌和 G-杆菌有较强的抗菌活性, 对真菌无明显作用^[18]。MaMIP-3 α 为疏水性蛋白, 其拓扑表面带有正电荷, 由大量阳离子残基组成, 此结构在其抗菌活动中起着重要作用, 为研究 MaMIP-3 α 的抗菌性提供了一些分子学依据。在 MaCCL20 多肽链上存在着结构功能域 SMALL_CYTOKINES_CC, 为 CC 亚族小型趋化因子区域, 其保守区域具有趋化因子超家族特征, 同时含有趋化因子 CC 亚族 DCCL 大量特殊结构域保守位点。Iciar 等^[19] 研究表明, 鸡的 CCL20 基因包含趋化因子 CC 亚族所特有的 4 个半胱氨酸残基结构, 其中 2 个残基处于相邻位置; 在鸡 CCL20 基因上也发现了在其他物种出现的 DCCL 假定受体断开位点。由此可以推断出 CCL20 基因在进化中具有较高的保守性,

MaCCL20 基因可能与其他物种 *CCL20* 基因的功能相似,对机体免疫细胞(如淋巴细胞、单核细胞、树突细胞和中性粒细胞等)有很强的趋化作用。

通过组织表达柱状图可以清楚地看到巨噬细胞炎症蛋白-3 α 在各个组织中的分布情况,*CCL20* 的组织表达特征在某些方面能显示它在机体中的功能特征。一方面,*CCL20* 是肝脏中的主要趋化蛋白,其在肝脏中的表达量相对于心脏和肾脏更高。另一方面,*CCL20* 主要表达于 CD19⁺ B 细胞和 T 淋巴细胞等表面,能调节肿瘤生长转移、靶细胞趋化性迁移及造血干细胞迁移,在机体免疫反应过程发挥了重要作用。由于脾脏是机体最大的淋巴器官,它的主要功能有造血、储血、滤血和免疫;脾脏中含有大量的淋巴细胞核巨噬细胞,是机体细胞免疫和体液免疫中心,结合 *CCL20* 与脾脏所显示出来的功能很容易理解 *CCL20* 在脾脏中表达量最高的原因。Iciar 等^[19] 研究报道,*CCL20* 在鸡的盲肠扁桃腺中表达量最高,在肌肉中没有表达;在肝脏、肾脏、心脏和脾脏 4 个组织中,脾脏表达量最高,肾脏表达最低,心脏表达量比肝脏高。其结果与本研究结果有些差异,可能是因为物种不同导致。

研究者们对 *CCL20* 的研究报道主要集中在人体免疫疾病方面,在其他物种中较少,其在机体各种组织中的表达研究更是极少。本研究为后续黄喉拟水龟 *CCL20* 基因功能探讨奠定了一定的基础。

参 考 文 献

- [1] 朱新平,陈永乐,魏成清,等.黄喉拟水龟的繁殖生物学研究[J].水生生物学报,2001,25(4):454-460.
- [2] 朱新平,陈永乐,魏成清,等.人工饲养对黄喉拟水龟繁殖力的影响[J].中国水产科学,2001,8(2):52-54.
- [3] WOLPE S D, DAVATELIS G, SHERRY B, et al. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties [J]. *Exp Med*, 1988, 167: 570-581.
- [4] 朱瑾,吴军,郑峻松. CCL 趋化因子与变应性鼻炎[J]. 免疫学杂志,2002,18(3):106-108.
- [5] MCCOLL S R. Chemokines and dendritic cell: a crucial alliance [J]. *Immunol Cell Biol*, 2002, 80(5): 489-496.
- [6] GIULIANI N, LISIGNOLI G, COLLA S, et al. CC-chemokine ligand 20/macrophage inflammatory protein-3 α and CC-chemokine receptor 6 are overexpressed in myeloma microenvironment related to osteolytic bone lesions [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(16): 6840-6850.
- [7] HIESHIMA K, LMAI T, OPDENAKKER G, et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver; chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2 [J]. *Biol Chem*, 1997, 272: 584-586.
- [8] WECKMANN M, COLLISON A, SIMPSON J L, et al. Critical link between TRAIL and CCL20 for the activation of TH2 cells and the expression of allergic airway disease [J]. *Nat Med*, 2007, 13(11): 1308-1315.
- [9] FURUMOTO K, SOARES L, ENGLEMAN E G, et al. Induction of potent antitumor immunity by *in situ* targeting of intratumoral DCs [J]. *Clin Invest*, 2004, 113: 774-783.
- [10] BAUNFORTH K R, BIRGERSDOTTER A, REYNOLDS G M, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells [J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(1): 195-204.
- [11] WOLTMANA A M, DEFIJTERA J W, KOOIJA S W, et al. MIP-3 α /CCL20 in renal transplantation and its possible involvement as dendritic cell chemoattractant in allograft rejection [J]. *American Journal of Transplantation*, 2005, 5: 2114-2125.
- [12] LEE J S, LEE J Y, SON J W, et al. Expression and regulation of the CC-chemokine ligand 20 during human tuberculosis [J]. *Scand J Immunol*, 2008, 67(1): 77-85.
- [13] YOSHIDA A, ISOMOTO H, HISATSUNE J, et al. Enhanced expression of CCL20 in human helicobacter pylori-associated gastritis [J]. *Clin Immunol*, 2009, 130(3): 290-297.
- [14] GHADJAR P, LODDENKEMPER C, COUPLAND S E, et al. Chemokine receptor CCR6 expression level and aggressiveness of prostate cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(11): 1181-1189.
- [15] CHANG K P, HAO S P, CHANG J H, et al. Macrophage inflammatory protein-3 α is a novel serum marker for nasopharyngeal carcinoma detection and prediction of treatment outcomes [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21): 6979-6987.
- [16] 赵密,朱新平,史燕,等.黏质沙雷氏菌诱导的黄喉拟水龟 SMART cDNA 文库构建及相关基因的鉴定[J].华中农业大学学报,2011,30(1):99-104.
- [17] 高明英,朱新平,赵密,等.黄喉拟水龟转铁蛋白基因的克隆以及表达特征分析[J].水生生物学报,2011,35(4):557-564.
- [18] 岳海岭,彭代智. CCL20 的结构域功能[J].免疫学杂志,2004,20(3):100-102.
- [19] ICIAR M, MAGALI B, CLAIRE B, et al. Cloning, expression and functional characterization of chicken CCR6 and its ligand CCL20 [J]. *Molecular Immunology*, 2009, 47: 551-559.

Analysis of gene sequence characteristics and tissue expression on macrophage inflammatory protein-3 α in *Mauremys mutica*

LONG Jian-jie^{1,2} ZHU Xin-ping^{1,2} SHI Yan¹ ZHAO Mi² LIU Yang^{1,2}

1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation of Ministry of Agriculture/Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Life Science and Fisheries, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract Macrophage inflammatory protein-3 α (MIP-3 α or CCL20), a member of the chemokine family, plays an important role in the immune response. In this study, the *Mauremys mutica* CCL20 (MaCCL20) cDNA sequence was initially obtained by screening the constructed full-length cDNA library and were verified by gene cloning method. Then the structure and function of the *MaCCL20* gene were predicted by using software and the gene expression in different tissues was analyzed by using real-time quantitative PCR. The results showed that the full-length cDNA of *MaCCL20* gene is 2 318 bp, containing a 261 bp open reading frame and encoding 86 amino acids. The *MaCCL20* protein is hydrophobic and has no trans-membrane structure. Homology analysis indicated that the *MaCCL20* shared high similarity with *Anolis carolinensis*, followed by *Gallus gallus* and shared the lowest similarity with mammalian. Real-time PCR results showed that the *MaCCL20* gene was highly expressed in the spleen and was also expressed in other tissues including liver, kidney and heart. The study laid a foundation for further research of the function of *MaCCL20*.

Key words *Mauremys mutica*; macrophage inflammatory protein-3 α ; cDNA gene library; sequence analysis; tissue expression

(责任编辑:边书京)