

二龄草鱼脾脏、肝脏组织高表达甘露糖结合凝集素 mRNA

吴超 陆承平*

南京农业大学动物医学院, 南京 210095

The mannose-binding lectin mRNA is expressed at high level in spleen and liver in adult grass carp

WU Chao, LU Cheng-Ping*

College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China

Abstract Innate immunity is expected to be very important in fish. Mannose-binding lectin (MBL) participates in the innate immune system as an activator of the complement system and as an opsonin after binding to certain carbohydrate structures on microorganisms. In this experiment, total mRNA was isolated from spleen, liver, gills, thymus, head kidney and kidney of adult and immature grass carp *Ctenopharygodon idllus*. The cDNA of MBL was obtained by RT-PCR using total mRNA from the spleen of carp as template. Such cDNA was labeled with ³²P and used as probe for Northern analysis, and autoradiographic signals were quantified by densitometry analysis. The results showed that MBL was high expressed in the spleen and liver and low in gills, thymus, head kidney and kidney of adult grass carp, and MBL was much lower expressed in spleen and liver of immature grass carp than those of adult grass carp. The results might partially explain why immature grass carp are vulnerable to grass carp hemorrhage virus (GCHV) whereas adult grass carp are not. This suggested that MBL may be an important anti-GCHV factor [*Acta Zoologica Sinica* 50 (1): 137-140, 2004].

Key words Grass carp, *Ctenopharygodon idllus*, Mannose-binding lectin, Northern blot, Densitometry analysis

关键词 草鱼 甘露糖结合凝集素 Northern 杂交 密度测定分析

甘露糖结合凝集素 (Mannose-binding lectin, MBL) 是一种由人和动物肝脏合成并分泌的 C 型血清凝集素 (Sastry and Ezekowitz, 1993; Thiel et al., 1992)。无需抗体和补体分子 C1q 参与, 它即可激活补体的经典途径, 溶解细菌或病毒, 并能够产生补体活性片段, 发挥间接调理功能; MBL 亦能通过其胶原区与吞噬细胞的胶原凝集素受体结合而起直接调理作用; MBL 对病毒颗粒与细胞表面受体的结合可能起空间位阻作用, 从而直接中和病毒 (Super et al., 1989; Lipscombe et al., 1992)。此外, 还发现 MBL 在抗感染的起始阶段起了主导作用, 它可能是宿主体内最重要的非特异性的第一线抗感染免疫分子 (Marthas et al., 1995)。近年来发现 MBL 也参与鱼类的先天性免疫反应, 如鲑鱼的 MBL 通过凝集菌体使其更易被巨噬细胞杀灭 (Ottinger et al., 1999); 嗜水气单胞菌经 MBL 处

理后易被补体杀灭, 但具体机制尚不清楚 (Fock et al., 2001)。

草鱼 (*Ctenopharygodon idllus*) 出血病是草鱼养殖业中最严重的传染病, 发病率与死亡率极高, 对水产养殖业造成了巨大的损失。其病原为草鱼出血病病毒 (GCHV), 主要感染幼年草鱼, 而成年草鱼不易感, 但其原因尚未明了 (Jiang and Li, 1991)。本实验室前期研究工作发现鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 血清存在一种抗 GCHV 甘露糖凝集素样蛋白 (待发表资料)。而目前对草鱼 MBL 尚无相关研究。本文对 MBL mRNA 在草鱼发育阶段和组织表达模式做了初步分析, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

健康二龄草鱼约 1.5 kg/尾, 鲤鱼约 1.3 kg/

2003-05-31 收稿, 2003-09-03 修回

* 通讯作者 (Corresponding author). lucp@mail.njau.edu.cn

尾, 购自南京卫岗农贸市场; 4-5 月龄草鱼 0.06-0.07 kg/尾, 由南京胜利圩渔场提供。每种鱼取 3 尾, 取胸腺、脾脏、肝、中肾、头肾和鳃, 置液氮速冻后于 -80 保存。

1.2 组织 RNA 的提取

以 Trizol (Invitrogen 公司) 法提取鲤鱼、二龄草鱼和 4-5 月龄草鱼各组织的总 RNA, 紫外分光光度计测定浓度, 琼脂糖电泳检测 RNA 质量并于 -80 保存。

1.3 RT-PCR

从 GenBank 中检索鲤鱼 MBL 与管家基因 β -Actin 的 mRNA 序列 (登录号分别为: AF227737, M24113), 草鱼 β -Actin 的 mRNA 序列 (登录号: M25013) 利用 Omiga 软件进行引物设计, 得到上下游引物之间的 MBL 基因片段长度为 626 bp, β -Actin 为 727 bp, β -Actin 的上下游引物在鲤鱼、草鱼和小鼠完全同源。引物由上海申能博彩公司合成。

MBL 基因上游引物:

5 - ACTGCA GCTGTTGGATGGA G

下游引物:

5 - GTCCCTTATA GTCA TCA GGC

β -Actin 基因上游引物:

5 - A GCAA GA GA GGTA TCCTGACC

下游引物:

5 - CCACCA GACAA TACA GTGTTGG

利用反转录试剂盒 (Promaga 公司) 合成第一链 cDNA 后进行 PCR 扩增 (MJ PCR 仪), 扩增条件为: 94 变性 3 min; 94 变性 30 s, 58 退火 30 s, 72 延伸 50 s, 扩增 30 循环; 72 延伸 5 min。1% 琼脂糖 (Promega) 凝胶电泳检测 PCR 产物, DNA Marker (200 bp, 华美公司) 检测产物大小, 凝胶紫外扫描分析仪 (BIO-RAD) 成像。PCR 产物测序 (申能博彩)。

1.4 Northern 杂交

将二龄草鱼与 4-5 月龄草鱼总 RNA 样品和 RNA Marker 上样于 1% 变性琼脂糖凝胶中, 电泳 3 h。将胶中的 RNA 真空转运至 Hybond⁺ 尼龙膜 (Pharmacia), 紫外交联。采用 Prime-argene 试剂盒 (Promega 公司) 以 RT-PCR 扩增出的基因片段作为模板, [³²P] dCTP 标记探针。探针纯化后, 与膜在 65 杂交过夜。尼龙膜洗涤后, 以 X 光片 (日本富士) 在 -80 曝光 3 天。杂交信号进行扫描和灰度分析。

1.5 数据分析

标准化处理: 各泳道的目的信号灰度值与该泳道管家基因的信号灰度比较, 得到校正上样量后, 各泳道间目的信号的差异即为不同组织样品中目的基因的相对表达丰度。实验以不同的样本重复 3 次, 以 *t* 检验进行分析, $P < 0.01$, 差异极显著。

2 结 果

2.1 鲤鱼脾脏 MBL 与 β -Actin 基因 PCR 结果

鲤鱼脾脏 MBL 与 β -Actin 基因均扩增出一条特异性条带, 经测序 MBL 序列与 GenBank 中相应序列完全相同; 用鲤鱼 MBL 引物未能从草鱼脾脏中扩增出特异性条带 (图 1)。

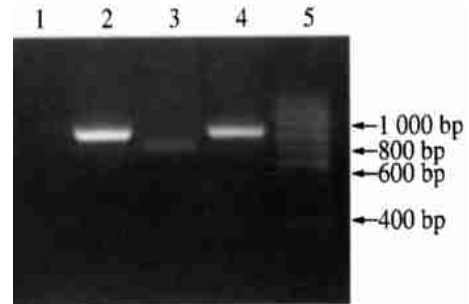


图 1 成年鲤鱼与草鱼脾脏甘露糖结合凝集素 (MBL) 与 β -肌动蛋白基因 PCR 结果

1: 100 bp DNA 标准。2: 鲤鱼 β -肌动蛋白。3: 鲤鱼甘露糖结合凝集素。4: 草鱼 β -Actin。5: 草鱼 MBL。

Fig. 1 Mannose-binding lectin (MBL) and β -Actin expression in the spleen of adult carp and grass carp

1: 100 bp DNA marker. 2: Carp β -Actin. 3: Carp MBL. 4: Grass carp β -Actin. 5: Grass carp MBL

2.2 二龄草鱼与 4-5 月龄草鱼各器官 MBL 与 β -Actin 基因 Northern 杂交结果

利用鲤鱼 MBL 基因片段作为探针与二龄草鱼脾脏和肝脏泳道杂交出较深的条带, 其余泳道条带较浅; 利用鲤鱼 β -Actin 基因片段, 与各泳道均杂交出比较一致的条带 (图 2)。

2.3 灰度分析

测定不同泳道灰度值, 经统计分析计算出灰度比值的平均值与标准差, 绘制二龄草鱼与 4-5 月龄草鱼各器官 MBL 表达丰度图 (图 3)。结果显示 MBL 在二龄草鱼脾脏和肝脏中表达丰度较高, 在鳃、胸腺、头肾、和中肾中表达丰度很低; 而小草鱼脾脏、肝脏中 MBL 表达丰度低于二龄草鱼, 差异极显著。

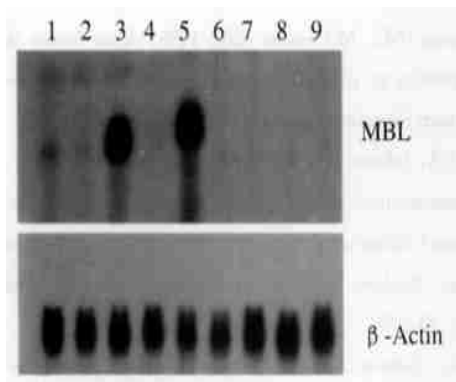


图2 二龄草鱼与4-5月龄草鱼各器官甘露糖结合凝集素 (MBL) 与 β -肌动蛋白 Northern 杂交结果

1: 4-5月龄草鱼脾脏。2: 4-5月龄草鱼肝脏。3: 二龄草鱼肝脏。4: 二龄草鱼胸腺。5: 二龄草鱼脾脏。6: 二龄草鱼头肾。7: 二龄草鱼中肾。8: 二龄草鱼鳃。9: 4-5月龄草鱼中肾。

Fig.2 Northern blots of Mannose-binding lectin (MBL) and β -Actin in several organs of adult and immature grass carp

1: Spleen of immature grass carp aged from four to five months.
2: Liver of immature grass carp aged from four to five months.
3: Liver of two-year-old grass carp. 4: Thymus of two-year-old grass carp. 5: Spleen of two-year-old grass carp. 6: Head kidney of two-year-old grass carp. 7: Kidney of two-year-old grass carp. 8: Gills of two-year-old grass carp. 9: Kidney of immature grass carp aged from four to five months.

3 讨 论

本实验室前期工作发现：以 GCHV 病毒结构蛋白亲和层析鲤鱼血清得到一种蛋白，其理化与生物学特性与凝集素类似，其活性可被甘露糖、半乳糖抑制，提示该凝集素样蛋白可能含有与甘露糖和半乳糖结合的位点（待发表资料）。国外研究发现鲤鱼、鲫鱼、斑马鱼脾脏中扩增出的 MBL 片段与鸟类和哺乳类略有不同，鸟类和哺乳类的 C 端糖识别区域（C-terminal carbohydrate recognition domain, CRD）中，与甘露糖特异性结合的氨基酸组合为谷氨酸-脯氨酸-天冬酰胺，在鱼类 CRD 中改变为谷氨酰胺-脯氨酸-天冬氨酸。而谷氨酰胺、天冬氨酸存在于所有结合半乳糖的 CRD，提示鱼类 MBL 可与甘露糖及半乳糖结合（Vitved et al., 2000）。因此推测上述抗 GCHV 凝集素样蛋白可能为一类 MBL 样蛋白。

国外研究发现 MBL 核苷酸和氨基酸序列在不同种属的鲤科鱼间存在不同程度的同源性，如鲤鱼与鲫鱼 MBL 氨基酸序列同源性高达 90%；而鲤鱼

与鲫鱼和斑马鱼相比，同源性仅为 68% 和 65%（Vitved et al., 2000）。作者利用鲤鱼、鲫鱼、斑马鱼 MBL 的保守序列合成 3 对引物，均未能从草鱼组织中扩增出特异性条带，表明草鱼与这些鲤科鱼的 MBL 序列并非完全一致。而采用鲤鱼 MBL 的保守片段作为探针，与草鱼不同组织 mRNA 杂交，在一些组织得到杂交信号，提示 MBL 序列在这两种鲤科鱼中具有较高的同源性。

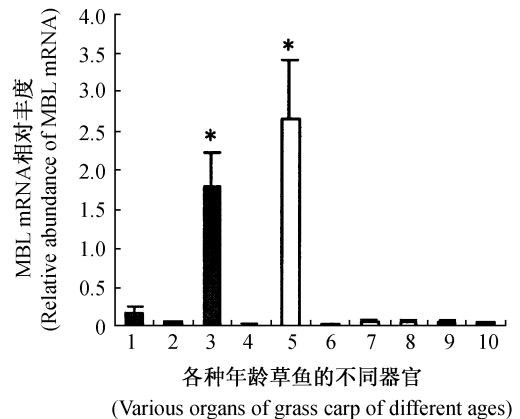


图3 二龄草鱼与4-5月龄草鱼各器官甘露糖结合凝集素 (MBL) mRNA 表达相对丰度

1: 4-5月龄草鱼脾脏。2: 4-5月龄草鱼肝脏。3: 二龄草鱼肝脏。4: 二龄草鱼胸腺。5: 二龄草鱼脾脏。6: 二龄草鱼头肾。7: 二龄草鱼中肾。8: 二龄草鱼鳃。9: 4-5月龄草鱼中肾。10: 4-5月龄草鱼头肾。* 表示 $P < 0.01$, 差异极显著

Fig.3 The relative abundance of mannose-binding lectin (MBL) mRNA in several organs of adult and immature grass carp

1: Spleen of immature grass carp. 2: Liver of immature grass carp. 3: Liver of adult grass carp. 4: Thymus of adult grass carp. 5: Spleen of adult grass carp. 6: Head kidney of adult grass carp. 7: Kidney of adult grass carp. 8: Gills of adult grass carp. 9: Kidney of immature grass carp. 10: Head kidney of immature grass carp.
* represents $P < 0.01$, significant difference.

本实验研究了 MBL 的 mRNA 在幼年和成年草鱼一些重要免疫相关组织中的表达丰度，发现它在成年草鱼的脾脏和肝脏中高度表达，而 Vitved 等人发现 MBL 仅在成年鲤鱼的脾脏表达，提示草鱼和鲤鱼 MBL 组织表达具有一定的种属特异性。脾脏、肾脏（头肾和中肾）是硬骨鱼的重要免疫器官，有丰富色素巨噬细胞和淋巴细胞，胸腺则是鱼类幼年阶段最重要的免疫器官。此外，肝脏也有色素巨噬细胞聚集（Wang and Li, 2002）。本实验表明成年草鱼脾脏和肝脏高表达 MBL，而该分子是由聚集在这些器官中的免疫细胞表达的，还是由非

免疫细胞表达的, 值得进一步研究。

关于 MBL 在鱼类不同发育阶段是否有差异表达尚未见报道。本实验结果表明, 成年 (二龄) 草鱼脾脏、肝脏中 MBL 的 mRNA 高表达, 而 4 - 5 月龄草鱼 MBL 的表达丰度很低, 说明 MBL 基因随着草鱼的个体发育而逐渐被诱导表达, 这可能从基因表达水平上解释了 GCHV 主要感染幼年草鱼, 而成年草鱼不易感, 提示 MBL 可能是一种重要的抗草鱼出血病的因子, 参与对 GCHV 感染的天然免疫反应。MBL 在草鱼体内抵抗 GCHV 感染的可能途径是直接结合该病毒, 还是综合了包括调理作用在内的其它功能, 值得进一步研究。同时, 探索出诱导 MBL 在幼年草鱼体内高表达的方法将可能有助于增强它们抗 GCHV 的能力。

参考文献 (References)

- Fock WL, Chen CL, Lam TJ, Sin YM, 2001. Roles of an endogenous serum lectin in immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas) against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunology* 11: 101 - 113.
- Jiang YL, Li ZQ, 1991. Study on the Interferon-like factor induced from virus-infected grass carp cell. *Chinese Journal of Virology* 7: 30 - 35 (In Chinese).
- Lipscombe RJ, Lan YL, Levinsky RJ, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW, 1992. Identical point mutation leading to low levels of mannose binding protein and poor C3b mediated opsonisation in Chinese and Caucasian populations. *Immunol. Lett.* 32: 253 - 257.
- Marthas ML, van Rompay KK, Otsyula M, Miller CJ, Canfield DR, Pedersen NC, McChesney MB, 1995. Viral factors determine progression to AIDS in simian immunodeficiency virus-infected newborn rhesus macaques. *Journal of Virology* 69: 4 198 - 4 205.
- Ottinger CA, Johnson SC, Ewart KV, Brown LL, Ross NW, 1999. Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by a mannose binding lectin. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123: 53 - 59.
- Sastry K, Ezekowitz RA, 1993. Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 59 - 66.
- Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW, 1989. Association of low level of mannar-binding protein with a common defect of opsonization. *Lancet* 2: 1 236 - 1 239.
- Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC, 1992. The concentration of the C-type lectin, mannar-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin. Exp. Immunol.* 90: 31 - 35.
- Vitved L, Holmskov U, Koch C, Teisner B, Hansen S, Skjodt K, 2000. The homologue of mannose-binding lectin in the carp family Cyprinidae is expressed at high level in spleen, and deduced primary structure predicts affinity for galactose. *Immunogenetics* 51: 955 - 964.
- Wang WB, Li AH, 2002. A research summary on the environmental threat to fish immune system. *Journal of fisheries of China* 26: 368 - 374 (In Chinese).
- 江育林, 李正秋, 1991. 病毒感染的草鱼细胞产生类干扰素物质的研究. *病毒学报* 7: 30 - 35.
- 王文博, 李爱华, 2002. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况. *水产学报* 26: 368 - 374.