

doi: 10.7541/2019.004

虹鳟Fc受体Fc γ R的 α 和 γ 亚基基因的克隆及表达分析

王鹏^{1,2} 张弩³ 张旭杰⁴ 张永安^{1,4}

(1. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 西北工业大学生命学院, 西安 710072; 4. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要: Fc受体(FcR)是一种表达在免疫细胞表面的受体分子, 由多亚基构成, 通过与免疫球蛋白(Ig)的Fc段结合引起包括炎症因子释放和吞噬作用等体液和细胞免疫反应。研究采用RACE技术首次克隆得到了虹鳟Fc γ R的 α 亚基基因(Fc γ R α)和 γ 亚基基因(Fc γ R γ)的cDNA序列, 采用生物信息学软件对Fc γ R α 和Fc γ R γ 的序列进行了特征分析, 实时荧光定量PCR检测了其在不同组织和细胞亚群中以及在Poly (I:C)和LPS刺激后头肾中的表达。结果显示: Fc γ R α 的cDNA全长1677 bp, 开放阅读框为954 bp, 编码317个氨基酸; Fc γ R α 由信号肽和2个Ig样结构域构成, 但没有跨膜区和胞内区。Fc γ R γ 亚基存在2种形式, 分别命名为FcR γ 1和FcR γ 2(包含FcR γ 2a和FcR γ 2b两个剪接异构体), 它们均由信号肽、跨膜区和胞内的免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)构成。氨基酸序列相似性分析表明虹鳟Fc γ R α 与斑点叉尾鲷FcRI相同率最高(30%), 虹鳟FcR γ 1和FcR γ 2a/2b与哺乳动物Fc γ R相同率最高可达40%。组织表达显示Fc γ R α 、FcR γ 1和FcR γ 2a/2b在头肾、脾脏和血液中表达较高; 细胞亚群表达显示Fc γ R α 、FcR γ 1和FcR γ 2a/2b在髓样细胞群中表达最高; LPS和Poly (I:C)刺激后, Fc γ R α 、FcR γ 1和FcR γ 2a/2b在头肾中的表达显著上调, 这表明Fc γ R在机体抗细菌和抗病毒免疫中可能发挥重要作用。

关键词: Fc受体; Fc γ R α ; FcR γ ; 虹鳟; 分子克隆; 基因表达

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2019)01-0027-10

Fc受体(Fc receptor, FcR)是一种表达在免疫细胞膜表面的免疫球蛋白超家族(Immunoglobulins superfamily, IgSF)成员, 它在免疫系统中起着联系体液免疫和细胞免疫的作用^[1], 其中包括传统的FcR、多聚免疫球蛋白受体(Polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)和Fc受体样分子(Fc receptor like, FcRL)等^[2]。总体来说, FcR通过识别免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)的单体或者复合物来激活或者抑制免疫反应^[3]。目前在人(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)中已经鉴定出能识别免疫球蛋白IgG的FcR (Fc γ R)、IgA的FcR (Fc α R)、IgE的FcR (Fc ϵ R)、IgM的FcR (Fc μ R)和IgD的FcR (Fc δ R)^[4-7]。

哺乳动物Fc γ R大多是以多亚基的复合体形式来发挥作用, 一般是由 α (Fc γ R α)和 γ (Fc γ R γ)亚基组成二聚体结构^[3]。Fc γ R表达在多种细胞类型中, 包括单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和血小板^[8-11],

在炎症反应中起到中枢调节器的作用。当这些细胞上Fc γ R的Fc γ R α 亚基与IgG的Fc段结合时, 信号传递给FcR γ 亚基, 并通过其胞内免疫受体酪氨酸活化基序(Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)上的酪氨酸磷酸化以激活下游信号传导级联反应从而发挥免疫功能, 实现对体液免疫和细胞免疫的平衡调控^[12-14]。此外, Fc γ R还参与包括调理吞噬、介导抗体依赖的细胞毒作用、清除免疫复合物、细胞激活、释放炎症因子和活性氧等在内的各种细胞免疫反应, 以及参与免疫球蛋白的转运和抗体中和^[15-19]。总之, Fc γ R参与调节多种先天性和适应性免疫反应。在人和小鼠中, 根据与IgG亲和力的不同, Fc γ R可以分为高亲和力的Fc γ RI (RIA、RIB、RIC)以及低亲和力的Fc γ RII (RIIA、RIIB、RIIC)和Fc γ RIII (RIIIA、RIIIB), 此外, 在小鼠中还发现了能特异性识别IgG2a和IgG2b

收稿日期: 2018-03-06; 修订日期: 2018-05-27

基金项目: 国家自然科学基金(31172431和31602184)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31172431, 31602184)]

作者简介: 王鹏(1991—), 湖北仙桃人; 硕士研究生; 研究方向为鱼类分子免疫学。E-mail: wangpeng@ihb.ac.cn

通信作者: 张永安, 研究员; E-mail: yzhang@ihb.ac.cn

的受体Fc γ RIV^[20-22]。在牛(*Bos taurus*)、羊(*Ovis aries*)、猪(*Sus scrofa*)和马(*Equus caballus*)等家畜动物中也有相关FcR被克隆鉴定^[23-26],且表现出了一些特有的序列特征。例如,在牛中存在的只能特异识别IgG1的Fc γ R,在猪中发现的Fc γ RIIA包含有和抗菌肽cathelicidin家族同源的序列^[27,28]。另外,也有研究发现人的郎格罕细胞能表达可溶的Fc γ R(sFc γ RIIA)^[29]。

在非哺乳动物的鸟类和两栖类中也发现了FcR的同源基因^[30,31]。而有关鱼类Fc γ R的研究最近才有相关报道。2000年,Fujiki等^[32]首次在鲤(*Cyprinus carpio*)中发现跟人和小鼠Fc γ R高度同源分子;2006年,Stafford等^[33]首次在斑点叉尾鱼回鲷(*Ictalurus punctatus*)中克隆得到在结构和功能上跟哺乳动物Fc γ R α 具有同源性的FcRL(IpFcRI),并且发现它能够跟IgM的Fc段特异性结合。然而迄今为止,有关虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)Fc γ R基因的克隆鉴定尚未见报道。虹鳟属鲑形目鲑科冷水性鱼类,肉质鲜嫩、味美无腥,无小刺,蛋白质、脂肪和饱和脂肪酸含量高,现已被我国列为淡水养殖的优良品种^[34]。本文以虹鳟为研究对象克隆得到Fc γ R的 α 和 γ 亚基,研究了其序列和结构特征以及组织和细胞亚群表达分布,这不仅为研究FcR在脊椎动物中的进化提供了数据支持,也为今后研究虹鳟Fc γ R的免疫功能奠定了分子基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用的虹鳟来自湖北荆门漳水库虹鳟养殖场,实验前暂养于中国科学院水生生物研究所控温楼。虹鳟的具体饲养条件同文献^[35]。

健康状态下虹鳟组织样品的采集 取3尾健康虹鳟(50—70)g,麻醉后依次取血液、头肾、脾脏、胸腺、后肠、皮肤、鳃、肝脏、心脏、肌肉和脑组织,液氮中冻存。

诱导状态下虹鳟组织样品的采集 将健康虹鳟分为三组,第一组腹腔注射100 μ L无菌PBS,第二组腹腔注射100 μ L LPS (*E. coli* 0111:B4; 1 mg/mL,溶解于PBS; Sigma-Aldrich),第三组腹腔注射100 μ L poly (I:C)(1 mg/mL,溶解于PBS; Sigma-Aldrich)。随后分别于0、12h、24h、72h和168h各取3尾鱼,麻醉后取头肾组织,液氮中冻存。

1.2 Fc γ R α 和Fc γ R γ 亚基cDNA全长的扩增

RNA的提取与cDNA第一链的合成 用Trizol试剂(Invitrogen)从上述组织样品中提取总RNA并反转录成cDNA,详细方法见文献^[35]。

Fc γ R α 和Fc γ R γ 亚基cDNA中间片段的同源克隆

根据虹鳟的cDNA文库分别获得Fc γ R α 和Fc γ R γ 亚基的部分cDNA序列,设计特异性引物(表1)。以头肾cDNA为模板分别PCR扩增Fc γ R α 和Fc γ R γ 亚基cDNA的中间片段。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,由武汉擎科生物科技有限公司完成测序^[36]。

Fc γ R α 和Fc γ R γ 亚基cDNA序列3'-和5'-末端扩增

根据获得的Fc γ R α 和Fc γ R γ 亚基cDNA中间部分序列,设计特异性引物(表1)。以头肾cDNA为模板,进行RACE-PCR,获得3'-和5'-末端序列,再与中间序列拼接得到全长cDNA序列,最后在非翻译区(Untranslated region, UTR)设计引物(表1)来验证拼接的全长cDNA序列。PCR产物经电泳、胶回收、连接、转化后将阳性克隆送交擎科公司测序,具体操作参照本课题组前期研究^[36]。

表1 本文中所用的引物序列

Tab. 1 Primers used in the present study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer Sequence (5'-3')	退火温度 T_m (°C)	用途 Application
Fc γ R α -F	ACTCAGCCTCCTTGTT GTTTCA	66	克隆中间 片段
Fc γ R α -R	ACTGGAGCAGCCACT GAGATTA	66	
Fc γ 1-F	GCTGTGATGGGAGGC AGATTC	66	
Fc γ 1-R	TCCGCTTTCGGTGGCT TTTCT	64	
Fc γ 2a-F	ACCGTGTCTTTCATTT TGTGCCT	66	
Fc γ 2a-R	TGTTGTTTACCACCAC TCACAC	66	
Fc γ 2b-F	ATCTTGGTCGCTCTAC TCTTG	66	
Fc γ 2b-R	AGGTGTCCTGACCTT TATGGG	66	
Fc γ R α -R1	GATTACAGAGTTGGT TTCCCTC	64	5'RACE
Fc γ R α -R2	CACCCACCGTCCACC TCTAT	64	
Fc γ 1-R1	TCCGCTTTCGGTGGCT TTTCT	66	
Fc γ 1-R2	TAGAGCACGGTGAGG ATGATAC	64	
Fc γ 2a-R1	GTACAAGATGGTGAG AAGGACG	66	
Fc γ 2a-R2	GTACAAGATGGTGAG AAGGACG	66	
Fc γ 2b-R1	CAAGAGTAGAGCGAC CAAGAT	66	
Fc γ 2b-R2	CTGTGGATACCCGCC AGTGA	66	
Fc γ R α -F1	ATAGAGGTGGACGGT GGGTG	64	3'RACE
Fc γ R α -F2	GAGGGAAACCAACTC TGTAATC	64	
Fc γ 1-F1	GTATCATCCTCACCG TGCTCTA	66	
Fc γ 1-F2	AGAAAAGCCACCGAA AGCGGA	64	

续表 1

引物名称 Primer name	引物序列 Primer Sequence (5'-3')	退火温度 T_m (°C)	用途 Application
Fc γ 2a-F1	CTCTGATCTTGGTCGC TCTACT	66	
Fc γ 2a-F2	ATAAACAAATGGCGGA CCTCCAC	66	
Fc γ 2b-F1	CCCATAAAGGTCAGG ACACCT	66	
Fc γ 2b-F2	TCACTGGCGGGTATC CACAG	66	
Fc γ R α -FL-F	AACATGAAGCTCTTA CTCAGCC	66	序列验证
Fc γ R α -FL-R	GACTTTGACTGGATTT ATTGGAT	66	
Fc γ 1-FL-F	GCTGTGATGGGAGGC AGATTC	66	
Fc γ 1-FL-R	TACTGTCAAAAAGT GGGCGAT	64	
Fc γ 2a-FL-F	ACCGTGTCTTTCATTT TGTGCTT	66	
Fc γ 2a-FL-R	AGTCAACAGCCACCA ACACTA	66	
Fc γ 2b-FL-F	TACTCCAACCTCCAT CTACTC	64	
Fc γ 2b-FL-R	CAGTCAACAGCCACC AACACTA	66	
Fc γ R α -qF	TTCCACACATCCACTA CTACTTC	66	实时荧光 定量分析
Fc γ R α -qR	CTGTCACTCGCCATA ACCTAA	66	
Fc γ 1-qF	GTATCATCCTCACCCT GCTCTA	66	
Fc γ 1-qR	TCACTCTTCACCCTCT GCTACT	66	
Fc γ 2a/2b-qF	CTCTGATCTTGGTCGC TCTACT	66	
Fc γ 2a/2b-qR	GTACAAGATGGTGAG AAGGACG	66	
EF-qF	CAAGGATATCCGTCG TGGCA	66	
EF-qR	ACAGCGAAACGACCA AGAGG	66	

1.3 Fc γ R α 和Fc γ R γ 亚基序列的生物信息学分析

利用ExPASy在线翻译工具(<http://web.expasy.org/translate/>)将获得的cDNA序列翻译成对应的氨基酸序列,用SignalP 4.1 Server程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析信号肽,用TMHMM Server v. 2.0程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测跨膜区,用SMART在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白质的结构域。用ClustalW2.1软件多重比对氨基酸序列;使用MEGA 7.0中的邻接法(Neighbor-joining)构建系统进化树,自举置换(Bootstrap)1000次计算各分支的置信度。

1.4 Fc γ R α 和Fc γ R γ 亚基基因的表达模式分析

通过CFX ConnectTM Real-Time PCR仪(Bio-Rad)检测Fc γ R α 和Fc γ R γ 基因在虹鳟不同组织和不同细胞亚群中的表达水平,EF-1 α 基因为内参基因,实时荧光定量PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

引物的扩增效率及特异性检测同文献[37]。qRT-PCR体系及程序如下:稀释后的cDNA模板4 μ L、SsoAdvancedTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad)5 μ L、250 nmol/L反向引物各0.5 μ L,总反应体系10 μ L。扩增反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 3min, (95 $^{\circ}$ C 20s、60 $^{\circ}$ C 20s、72 $^{\circ}$ C 20s)45个循环,最后从65 $^{\circ}$ C到95 $^{\circ}$ C添加溶解曲线。每个组织或细胞样品设3个重复,结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.5 虹鳟头肾和外周血组织中白细胞亚群的流式分选

用注射器从虹鳟尾静脉取血后立即用DMEM培养液(添加100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素和25 U/mL肝素钠)按照1:5稀释;虹鳟头肾组织经研磨后轻轻穿过尼龙网(网眼直径为100 μ m),然后用上述DMEM培养液同比例稀释;将4 mL细胞悬液缓慢加入连续Percoll (GE)梯度(34%/51%)上,4 $^{\circ}$ C 400 \times g在水平转头上离心30min,收集头肾白细胞(Head kidney leukocyte, HKL)和外周血白细胞(Peripheral blood leukocyte, PBL),加入6 mL含肝素的DMEM培养液洗涤2次。分别加入mouse anti-trout IgM (IgG1亚型)和mouse anti-trout IgT (IgG2b亚型)(一抗),冰上孵育30min,小鼠IgG作为阴性对照,然后加入APC-goat anti-mouse IgG1和FITC-goat anti-mouse IgG2b (二抗),避光在冰上孵育30min, PBS洗涤2次后,用BD FACSAria III流式细胞仪分选髓样细胞(Myeloid cells, Mye)、IgM⁺ B细胞、IgT⁺ B细胞和双阴性(Double negative, DN)淋巴细胞,提取总RNA并反转录成cDNA,采用qRT-PCR进行表达分析。具体实验操作见文献[38]。

1.6 LPS或poly (I:C)刺激后头肾组织中Fc γ R α 和Fc γ R γ 基因的表达变化

按照上文方法,用LPS或poly (I:C)刺激虹鳟,检测头肾中Fc γ R α 和Fc γ R γ 基因在不同时间点的表达变化,分析Fc γ R是否参与了虹鳟的免疫应答。qRT-PCR的引物和流程同1.4,结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,实验数据采用SPSS 19.0软件统计分析($P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异)。

2 结果

2.1 Fc γ R α 和Fc γ R γ 基因cDNA序列分析

利用RACE技术克隆得到虹鳟Fc γ R的 α 亚基基因Fc γ R α ,其cDNA (GenBank登录号:MG993321)全长1667 bp,包含2个多聚腺苷酸化信号(AATAAA),开放阅读框(Open reading frame, ORF)为954 bp,编码317个氨基酸(Amino acid, aa)。蛋白结构分析显示它含有一个信号肽(aa1—aa19)和2个免疫球蛋白

结构域即D1(aa36—aa117)和D2(aa125—aa200)(图1A)。虹鳟FcγR的FcRγ亚基具有2种形式, FcRγ1和FcRγ2(包含FcRγ2a和FcRγ2b两个剪接异构体), 其中FcRγ1的cDNA (GenBank登录号: MG993322)全长为665 bp, ORF为279 bp, 编码92个aa (图1B); FcRγ2a的cDNA (GenBank登录号: MG993323)全长为701 bp, ORF为342 bp, 编码113个aa (图1C); FcRγ2b的cDNA (GenBank登录号: MG993324)全长

为509 bp, ORF为300 bp, 编码99个aa (图1D)。蛋白结构分析显示它们均具有信号肽、跨膜区和胞内ITAM基序等特征结构。

2.2 FcγRα和FcRγ同源性比较分析与系统进化树构建

氨基酸序列多重比对硬骨鱼类的FcγRα亚基, 结果显示虹鳟FcγRα与大西洋鲑FcγRα(*Salmo salar*, ACN10664.1)的相同率最高(85.92%), 与其他硬骨



图1 虹鳟FcγR1α (A)、FcRγ1 (B)、FcRγ2a (C)和FcRγ2b (D)的cDNA及预测氨基酸序列

Fig. 1 cDNA and predicted amino acid sequences of trout FcγR1α (A), FcRγ1 (B), FcRγ2a (C) and FcRγ2b (D)

信号肽、免疫球蛋白样结构域、跨膜区和免疫受体酪氨酸基序分别被标注, 潜在N-糖基化位点以灰色阴影表示, 终止密码子和多聚腺苷酸化信号(AATAAA)以下划线表示

Predicted signal peptide, Ig-like domains, transmembrane regions, and ITAM motif are labeled, potential N-linked glycosylation sites are gray shaded, the stop codon and polyadenylation signal (AATAAA) are underlined

鱼类FcγRα相同率为30%—40%。虹鳟FcγRα的信号肽跟其他硬骨鱼类的差异较大, D1和D2结构域在不同硬骨鱼类间相对较为保守, 且所有硬骨鱼类FcγRα都缺失跨膜区和胞质区(图 2A)。虹鳟Fcγ各亚型中, Fcγ1与其余2个亚型的氨基酸序列相同率分别为40.98%和45.37%(表 2), 而Fcγ2b相比Fcγ2a仅缺失14个氨基酸(图 2B); 氨基酸序列多重比对显示, Fcγ的跨膜区和ITAM区在硬骨鱼类中非常保守, 虹鳟Fcγ1氨基酸序列与其他硬骨鱼类以及人类的同源序列的相同率为38.83%—42.57%(图 2B)。

系统进化树结果显示, 硬骨鱼类的FcγRα聚为一支, 哺乳动物的FcγRα聚为另一支, 且虹鳟与大西洋鲑的亲缘关系最近, 这与其分类地位一致(图 3A)。用不同类型的Fcγ构建系统进化树(图 3B), 结果表明虹鳟Fcγ与斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤(*Cyprinus carpio*)和鲇(*Silurus asotus*)等硬骨鱼类亲缘关系较近, 而与哺乳动物的亲缘关系较远, 此外虹鳟

Fcγ2a和Fcγ2b聚为一亚支, 而虹鳟Fcγ1与斑马鱼的同源序列聚为另一亚支(图 3B)。

2.3 FcγRa和FcγRγ基因在虹鳟组织和细胞中的表达分析

虹鳟FcγR存在FcγR1和FcγR2两种形式, 其基因分别位于9号和8号染色体上, Fcγ2a和Fcγ2b是Fcγ2基因转录表达的不同剪接异构体(图 4)。与Fcγ2a相比, Fcγ2b在其ITAM基序前面仅缺失14个氨基酸残基(图 2B), 因此我们只能采用一对qRT-PCR引物来检测Fcγ2a和Fcγ2b的共表达模式。结果显示Fcγ1在各组织中表达量最高, 其次是Fcγ2a/2b, 且Fcγ1和Fcγ2a/2b在淋巴组织中的表达量要显著高于非淋巴组织, 其中脾脏表达量最高, 其次是头肾和外周血; 而FcγRa仅在外周血、头肾和脾脏等淋巴组织中有较高表达, 其余组织仅有微弱表达(图 5)。

采用流式细胞术从虹鳟PBL和HKL中分选得到IgM⁺ B细胞群、IgT⁺ B细胞群、DN淋巴细胞群



图 2 虹鳟FcγRa与其他鱼类相应分子氨基酸序列比对(A)和虹鳟FcγRγ与其他物种相应分子氨基酸序列比对(B)

Fig. 2 Amino acid alignment of trout FcγRa with the related sequences in other fish (A); Amino acid alignment of trout FcγRγ with the related sequences in other species (B)

各物种FcγRa和FcγRγ蛋白序列登录号: 虹鳟*Oncorhynchus mykiss* FcγRa (MG993321)、斑点叉尾鲷*Ictalurus punctatus* FcγRa (NP_001187150.1)、大西洋鲑*Salmo salar* FcγRa (ACN10664.1)、白斑狗鱼*Esox lucius* FcγRa (XP_010897459.1)、红鳍东方鲀*Takifugu rubripes* FcγRa (XP_011606648.1)、尖吻鲈*Lates calcarifer* FcγRa (XP_018557658.1); 虹鳟*O. mykiss* Fcγ1 (MG993322)、虹鳟*O. mykiss* Fcγ2a (MG993323)、虹鳟*O. mykiss* Fcγ2b (MG993324)、斑马鱼*Danio rerio* Fcγ (ABO61033.1)、人*Homo sapiens* Fcγ (AAH33872.1)、小鼠*Mus musculus* Fcγ (NP_034315.1)、牛*Bos Taurus* Fcγ (NP_776962.1)、非洲爪蟾*Xenopus laevis* Fcγ (NP_001082448.1)、斑点叉尾鲷*I. punctatus* Fcγ (NP_001187098.1)、鲤*Cyprinus carpio* Fcγ (BAA92270.1)

表2 虹鳟FcR γ 各亚型间氨基酸序列相同率Tab. 2 Amino acid sequence identity between the subunit of FcR γ in rainbow trout

	FcR γ 1 (%)	FcR γ 2a (%)	FcR γ 2b (%)
FcR γ 1	100	40.98	45.37
FcR γ 2a		100	90.01
FcR γ 2b			100

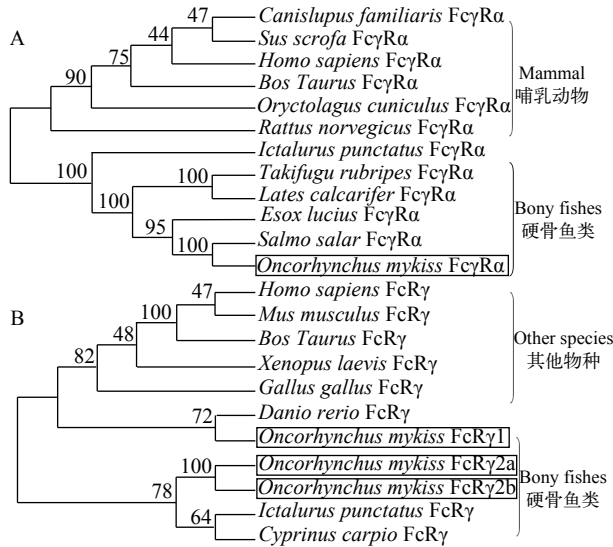


图3 脊椎动物Fc γ R α (A)和Fc γ R γ (B)氨基酸序列的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of vertebrate Fc γ R α (A) and Fc γ R γ (B)

数字代表自举置换1000次的各分支置信度(%)

Neighbor-joining trees were reconstructed with 1000 bootstrap replications (%)

各物种Fc γ R α 和Fc γ R γ 蛋白序列登录号: 虹鳟*Oncorhynchus mykiss* Fc γ R α (MG993321)、狗*Canis lupus familiaris* Fc γ R α (NP_001002976.1)、猪*Sus scrofa* Fc γ R α (NP_001028183.1)、人*Homo sapiens* Fc γ R α (NP_000557.1)、牛*Bos Taurus* Fc γ R α (NP_776963.1)、兔*Oryctolagus cuniculus* Fc γ R α (XP_017201412.1)、大鼠*Rattus norvegicus* Fc γ R α (NP_001094306.1)、斑点叉尾鲷*Ictalurus punctatus* Fc γ R α (NP_001187150.1)、红鳍东方鲀*Takifugu rubripes* Fc γ R α (XP_011606648.1)、尖吻鲈*Lates calcarifer* Fc γ R α (XP_018557658.1)、白斑狗鱼*Esox lucius* Fc γ R α (XP_010897459.1)、大西洋鲑*Salmo salar* Fc γ R α (ACN10664.1); 人*H. sapiens* Fc γ R γ (AAH33872.1)、小鼠*Mus musculus* Fc γ R γ (NP_034315.1)、牛*B. taurus* Fc γ R γ (NP_776962.1)、非洲爪蟾*Xenopus laevis* Fc γ R γ (NP_001082448.1)、鸡*Gallus gallus* Fc γ R γ (NP_001092081.1)、斑马鱼*Danio rerio* Fc γ R γ (ABO61033.1)、虹鳟*O. mykiss* FcR γ 1 (MG993322)、虹鳟*O. mykiss* FcR γ 2a (MG993323)、虹鳟*O. mykiss* FcR γ 2b (MG993324)、斑点叉尾鲷*I. punctatus* Fc γ R γ (NP_001187098.1)、鲤*Cyprinus carpio* Fc γ R γ (BAA92270.1)

和Mye细胞群。qRT-PCR结果显示, Fc γ R α 、FcR γ 1和FcR γ 2a/2b均在Mye细胞群中表达量最高, 其次是DN细胞群, 在IgM⁺和IgT⁺B细胞群仅有少量表达; 在Mye细胞群中FcR γ 1表达量最高, 在

DN淋巴细胞群中FcR γ 2a/2b表达量最高(图6)。

2.4 Poly (I:C)或LPS刺激后头肾组织中Fc γ R α 和FcR γ 基因表达分析

LPS是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分, 它能在动物体内引起强烈的免疫反应。为了研究Fc γ R基因在虹鳟抗细菌过程中的免疫作用, 我们采用qRT-PCR检测了虹鳟受LPS刺激后不同时间点Fc γ R α 和FcR γ 基因在头肾组织中的表达变化情况。结果显示, 受LPS刺激后Fc γ R α 、FcR γ 1和FcR γ 2a/

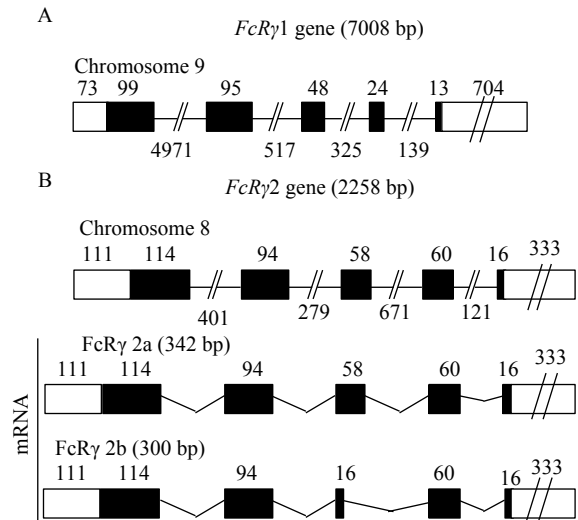


图4 虹鳟FcR γ 1(A)基因预测结构示意图和FcR γ 2(B)基因及其转录产物的预测结构示意图

Fig. 4 A schematic diagram shows the predicted gene organization of FcR γ 1 (A) and FcR γ 2 (B) and the transcripts of FcR γ 2. The coding regions are marked by black boxes

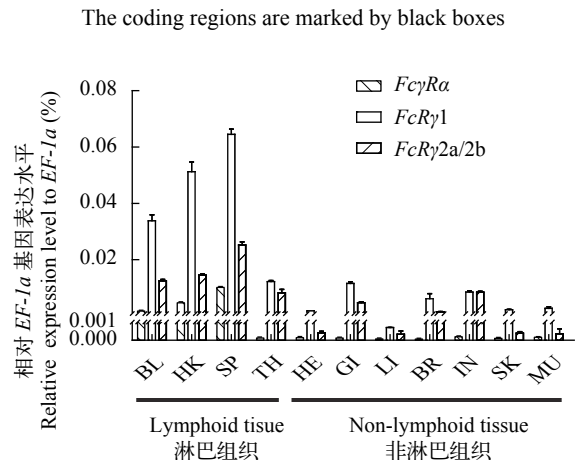


图5 虹鳟Fc γ R基因的组织表达分布

Fig. 5 Expression patterns of Fc γ R in different tissues of rainbow trout

BL. 血液, HK. 头肾, SP. 脾脏, TH. 胸腺, HE. 心脏, GI. 鳃, LI. 肝脏, BR. 脑, IN. 肠, SK. 皮肤, MU. 肌肉

BL. blood, HK. head kidney, SP. spleen, TH. thymus, HE. heart, GI. gill, LI. liver, BR. brain, IN. intestine, SK. skin, MU. muscle

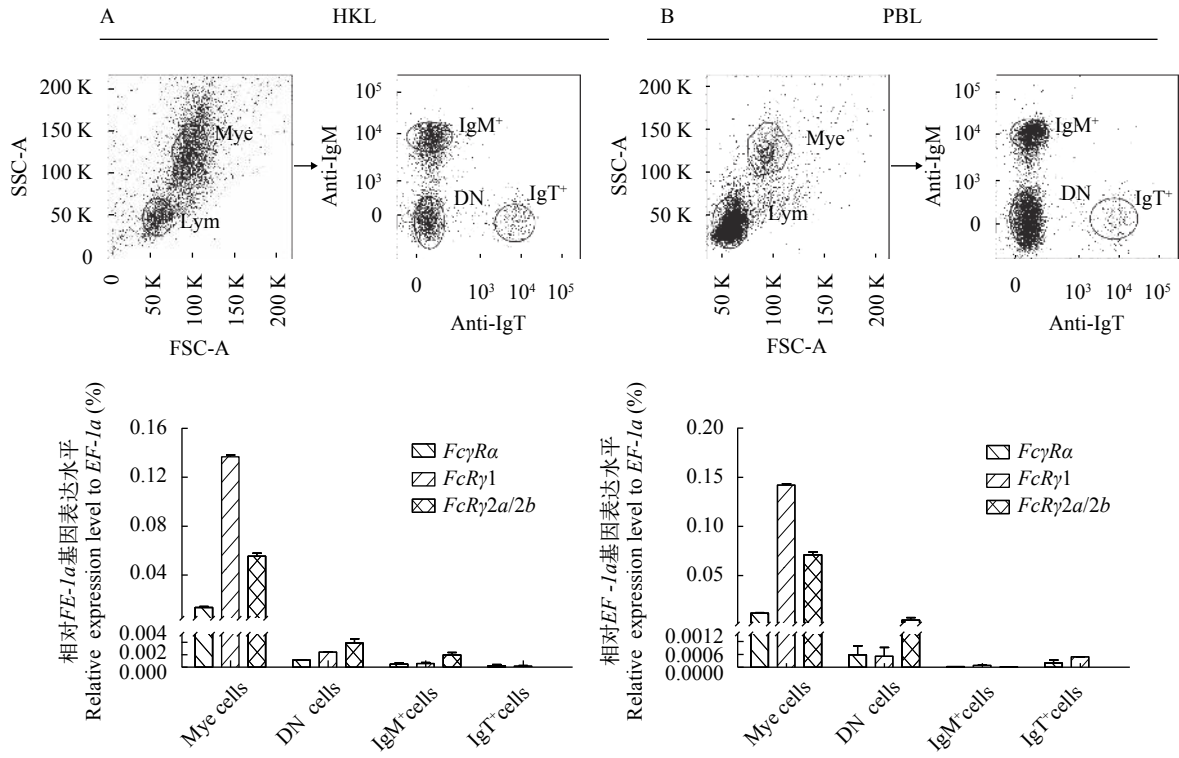


图6 虹鳟头肾白细胞(A)和外周血白细胞(B)各亚群 $Fc\gamma R$ 基因的表达分布

Fig. 6 Expression patterns of $Fc\gamma R$ in the cell subpopulations of trout head kidney leukocytes (HKL, A) and trout peripheral blood leukocytes (PBL, B)

$2b$ 基因在头肾中均呈现先上调后下降的表达趋势。其中 $Fc\gamma Ra$ 在刺激12h后表达量开始升高,并在24h达到峰值($P < 0.05$);与对照组相比, $Fc\gamma R1$ 在刺激12h后表达量有所升高,但相比对照组其差异并不显著; $Fc\gamma R2a/2b$ 在刺激12h后表达量显著升高($P < 0.05$),在24h达到峰值;所有基因的表达在刺激168h后开始呈现下降趋势并逐渐恢复到正常水平(图7A)。

作为双链RNA的类似物, Poly (I:C)可以模拟病毒感染,诱导机体产生抗病毒的免疫反应。qRT-PCR结果显示poly (I:C)可以诱导 $Fc\gamma Ra$ 、 $Fc\gamma R1$ 和 $Fc\gamma R2a/2b$ 基因的表达,其中 $Fc\gamma Ra$ 的表达在刺激12h后显著上调($P < 0.05$)并在24h达到峰值,在刺激72h后开始下调; $Fc\gamma R1$ 和 $Fc\gamma R2a/2b$ 的表达在刺激12h后达到峰值($P < 0.05$),24h后下调到正常水平(图7B)。

3 讨论

哺乳动物Fc受体Fc γ R是由Fc γ R α 和Fc γ R γ 亚基以非共价键形式形成聚合物发挥免疫功能的^[39]。在本研究中,我们克隆了虹鳟Fc γ R的Fc γ R α 和Fc γ R γ 亚基的cDNA序列。虹鳟的Fc γ R α 亚基由2个免疫球蛋白样结构域构成,没有跨膜区和胞内区,

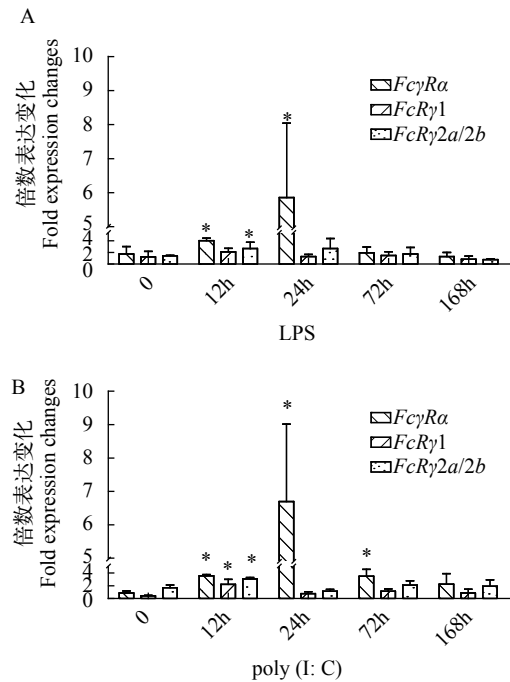


图7 虹鳟头肾组织中 $Fc\gamma R$ 基因在LPS (A)或poly (I:C)(B)刺激下不同时间点的表达水平

Fig. 7 Expression analysis of $Fc\gamma R$ in the head kidney for trout stimulated with LPS (A) or Poly (I:C) (B)

*代表实验组与对照组差异显著($P < 0.05$)

* indicates significant difference ($P < 0.05$)

暗示本研究获得的虹鳟Fc γ R α 亚基很可能是一种分泌型的可溶蛋白。可溶性的FcR (Soluble Fc receptor, sFcR)是通过mRNA的选择性剪切或者细胞膜型FcR通过蛋白酶解作用产生^[40]。在哺乳动物中, sFcR不仅可以阻遏抗体复合物与膜表面表达FcR的细胞的结合, 下调B细胞的增殖和抗体分泌, 还可以通过结合补体受体来激活细胞^[41—43]。在斑点叉尾鲷血清中用多克隆抗体可以检测到FcR蛋白, 证实了sFcR在硬骨鱼类中也存在^[33], 由此推断虹鳟Fc γ R α 亚基或许可以形成sFcR, 从而发挥免疫作用。氨基酸序列比对结果显示硬骨鱼类Fc γ R α 亚基的免疫球蛋白样结构域相似度很高, 表明硬骨鱼类Fc γ R α 亚基在进化中十分保守。与此同时, 本研究还鉴定了虹鳟Fc γ R γ 亚基的2种亚型, 它们均具有信号肽、跨膜区及胞内ITAM基序。氨基酸序列比对结果显示虹鳟Fc γ R γ 亚基与代表性脊椎动物的Fc γ R γ 亚基相似度非常高, 表明Fc γ R γ 亚基在进化中非常保守。

Fc γ R α 基因主要在虹鳟的淋巴组织中表达, 而在非淋巴组织中的表达水平明显较低, 比如心脏、腮、肝脏和肌肉, 其组织表达模式与已报道的斑点叉尾鲷的FcR基因的表达模式^[33]基本一致, 表明Fc γ R α 可能在鱼类免疫系统中扮演重要角色。Fc γ R γ 基因在虹鳟各组织中的表达水平都要高于Fc γ R α 基因, 这可能与FcR γ 也可作为其他FcR (如Fc α R、Fc ϵ R和Fc μ R等)的亚基以及激活信号元件有关^[44]。Fc γ R γ 1基因在大部分淋巴组织中的表达水平平均高于Fc γ R γ 2a/2b基因, 表明Fc γ R γ 1可能在虹鳟免疫系统中具有更广泛的作用。在人和小鼠中, Fc γ R基因主要在树突状细胞、单核细胞和巨噬细胞以及绝大多数的中性粒细胞中表达, 而在淋巴细胞中表达^[45], 而有关硬骨鱼类Fc γ R的表达细胞类型却甚少报道。本研究结果表明虹鳟的Fc γ R基因主要表达在头肾和外周血的髓样细胞(包含树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等)中, 其表达细胞类型和哺乳动物中相似。

在硬骨鱼类中, 头肾被认为是类似于哺乳动物骨髓的中枢免疫器官, 在免疫系统中起重要作用^[46]。在本研究中, LPS和Poly (I:C)刺激后虹鳟Fc γ R α 基因在头肾中的表达水平显著上调, 预示Fc γ R α 在鱼类抗细菌和抗病毒免疫过程中发挥重要作用^[47]。Fc γ R γ 1和Fc γ R γ 2a/2b基因在头肾中的表达在受刺激后12h也达到峰值, 表明鱼类Fc γ R γ 亚基可能通过ITAM参与了抗细菌和抗病毒免疫信号的传导过程。

总而言之, 本研究克隆的虹鳟Fc受体Fc γ R的亚基基因(Fc γ R α 和Fc γ R γ)广泛表达于各种组织中, 特

别是包括外周血、头肾和脾脏在内的淋巴组织中。此外, 从头肾和外周血白细胞中分选得到的亚细胞群中, Fc γ R的亚基基因主要表达在髓样细胞群, 而且在受到LPS和Poly (I:C)刺激后虹鳟头肾组织中Fc γ R的亚基基因的上调表达说明该基因参与了抗细菌和抗病毒的免疫反应。然而, 虹鳟Fc γ R在细胞和体液免疫中的具体功能还需要进一步探究。

参考文献:

- [1] 史平玲, 王爱萍, 乔松林, 等. 家畜IgG Fc受体研究进展[J]. 河南农业科学, 2010, (1): 124—128
- [2] Akula S, Mohammadamin S, Hellman L. Fc receptors for immunoglobulins and their appearance during vertebrate evolution [J]. *PLoS One*, 2014, **10**(4): e0124530
- [3] Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fc gamma receptors as regulators of immune responses [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, **8**(1): 34—47
- [4] Edberg J C, Qin H, Gibson A W, et al. The CY domain of the Fc gamma RI α chain alter CD(64) gamma-chain tyrosine-based signaling and phagocytosis [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(43): 41287—41293
- [5] Rivera J, Fierro N A, Olivera A, et al. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE [J]. *Advances in Immunology*, 2008, **98**(8): 85—120
- [6] Kubagawa H, Oka S, Kubagawa Y, et al. Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2009, **206**(12): 2779—2793
- [7] Tamma S M, Amin A R, Finkelman F D, et al. IgD receptors on murine T-helper cells bind to Fd and Fc regions of immunoglobulin D [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, **88**(20): 9233—9237
- [8] Flesch B K, Neppert J. Functions of the Fc receptors for immunoglobulin G [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2000, **14**(4): 141—156
- [9] Cassatella M A, Flynn R M, Amezcua M A, et al. Interferon gamma induces in human neutrophils and macrophages expression of the mRNA for the high affinity receptor for monomeric IgG (Fc gamma R-I or CD64) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990, **170**(2): 582—588
- [10] Pan L Y, Mendel D B, Zurlo J, et al. Regulation of the steady state level of Fc gamma RI mRNA by IFN-gamma and dexamethasone in human monocytes, neutrophils, and U-937 cells [J]. *Journal of Immunology*, 1990, **145**(1): 267—275
- [11] Parren P W, Warmerdam P A, Boeijs LC, et al. On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc

- gamma RIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1992, **90**(4): 1537—1546
- [12] Sondermann P, Kaiser J, Jacob U. Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, **309**(3): 737—749
- [13] Rankin B M, Yocum S A, Mittler R S, *et al.* Stimulation of tyrosine phosphorylation and calcium mobilization by Fc gamma receptor cross-linking. Regulation by the phosphotyrosine phosphatase CD45 [J]. *Journal of Immunology*, 1993, **150**(2): 605—616
- [14] Takai T, Li M, Sylvestre D, *et al.* FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects [J]. *Cell*, 1994, **76**(3): 519—529
- [15] Anderson C L, Shen L, Eicher D M, *et al.* Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1990, **171**(4): 1333—1345
- [16] Fanger M W, Shen L, Graziano R F, *et al.* Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG [J]. *Immunology Today*, 1989, **10**(3): 92—99
- [17] Clynes R, Maizes J S, Guinamard R, *et al.* Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1999, **189**(1): 179—185
- [18] Simister N E, Story C M. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus [J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 1997, **37**(1): 1—23
- [19] Nimmerjahn F, Gordan S, Lux A. Fc gammaR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities [J]. *Trends in Immunology*, 2015, **36**(6): 325—336
- [20] Osman N, Kozak C A, McKenzie I F, *et al.* Structure and mapping of the gene encoding mouse high affinity Fc gamma RI and chromosomal location of the human Fc gamma RI gene [J]. *Journal of Immunology*, 1992, **148**(5): 1570—1575
- [21] Qiu W Q, de Bruin D, Brownstein B H, *et al.* Organization of the human and mouse low-affinity Fc gamma R genes: duplication and recombination [J]. *Science*, 1990, **248**(4956): 732—735
- [22] Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, *et al.* Fc gammaRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity [J]. *Immunity*, 2005, **23**(1): 41—51
- [23] Collins R A, Gelder K I, Howard C J. Nucleotide sequence of cattle FcGRIII: its identification in gammadelta T cells [J]. *Immunogenetics*, 1997, **45**(6): 440—443
- [24] Qiao S, Liu Y, Zhang J, *et al.* Genetic characterization and ligand specificity of the ovine Fc gamma receptor I (ovFc gamma RI) [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, **137**(2): 317—321
- [25] Kumura B H, Sone T, Shimazaki K, *et al.* Sequence analysis of porcine polymeric immunoglobulin receptor from mammary epithelial cells present in colostrum [J]. *The Journal of Dairy Research*, 2000, **67**(4): 631—636
- [26] McAleese S M, Halliwell R E, Miller H R. Cloning and sequencing of the horse and sheep high-affinity IgE receptor alpha chain cDNA [J]. *Immunogenetics*, 2000, **51**(10): 878—881
- [27] Zhang G, Young J R, Tregaskes C R, *et al.* Cattle Fc gamma RII: molecular cloning and ligand specificity [J]. *Immunogenetics*, 1994, **39**(6): 423—427
- [28] Sweeney S E, Kim Y B. Identification of a novel Fc gamma RIIIa alpha-associated molecule that contains significant homology to porcine cathelin [J]. *Journal of Immunology*, 2004, **172**(2): 1203—1212
- [29] Astier A, Salle H, Salle C, *et al.* Human epidermal Langerhans cells secrete a soluble receptor for IgG (Fc gamma RII/CD32) that inhibits the binding of immune complexes to Fc gamma R+cell [J]. *Journal of Immunology*, 1994, **152**(1): 201—212
- [30] Taylor A I, Gould H J, Sutton B J, *et al.* The first avian Ig-like Fc receptor family member combines features of mammalian FcR and FCRL [J]. *Immunogenetics*, 2007, **59**(4): 323—328
- [31] Guselnikov S V, Bell A, Najakshin A M, *et al.* Signaling FcRgamma and TCRzeta subunit homologs in the amphibian *Xenopus laevis* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003, **27**(8): 727—733
- [32] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta, high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2000, **10**(3): 229—242
- [33] Stafford J L, Wilson M, Nayak D, *et al.* Identification and characterization of a FcR homolog in an ectothermic vertebrate, the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Journal of Immunology*, 2006, **177**(4): 2505—2517
- [34] Wang W. Culture and Enhancement of Fishes [M]. China Agricultural Press. 2000, 469—480
- [35] Zhang X J, Zhang X Y, Zhang N, *et al.* Distinctive structural hallmarks and biological activities of the multiple cathelicidin antimicrobial peptides in a primitive teleost fish [J]. *Journal of Immunology*, 2015, **194**(10): 4974—4987
- [36] Zhang N, Zhang X J, Song Y L, *et al.* Preferential combination between the light and heavy chain isotypes of fish immunoglobulins [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, **61**: 169—179
- [37] Zhang Y A, Hikima J, Li J, *et al.* Conservation of structural and functional features in a primordial CD80/86 molecule from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a primi-

- tive teleost fish [J]. *Journal of Immunology*, 2009, **183**(1): 83—96
- [38] Zhang X J, Wang P, Zhang N, *et al.* B cell functions can be modulated by antimicrobial peptides in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: novel insights into the innate nature of B cells in fish [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, **8**: 388—392
- [39] Ravetch J V, Bolland S. IgG Fc receptors [J]. *Annual Review of Immunology*, 2001, **19**(1): 275—290
- [40] Fridman W H, Teillaud J L, Bouchard C, *et al.* Soluble Fc gamma receptors [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1993, **54**(2): 504—512
- [41] Galon J, Bouchard C, Fridman W H, *et al.* Ligands and biological activities of soluble Fc gamma receptors [J]. *Immunology Letters*, 1995, **44**(2): 175—181
- [42] Galon J, Paulet P, Galinha A, *et al.* Soluble Fc gamma receptors: interaction with ligands and biological consequences [J]. *International Reviews of Immunology*, 1997, **16**(1): 87—111
- [43] Galon J, Gauchat J F, Mazieres N, *et al.* Soluble Fc gamma receptor type III (Fc gamma RIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors [J]. *Journal of Immunology*, 1996, **157**(3): 1184—1192
- [44] Hamerman J A, Lanier L L. Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors [J]. *Science Signal*, 2006, (32031): 300—321
- [45] Kacsokovics I. Fc receptors in livestock species [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, **102**(3): 351—362
- [46] Chettri J K, Raida M K, Holten-Andersen L, *et al.* PAMP induced expression of immune relevant genes in head kidney leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, **35**(4): 476—482
- [47] Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fc gamma receptors: old friends and new family members [J]. *Immunity*, 2006, **24**(1): 19—28

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF THE α AND γ SUBUNIT GENES OF Fc γ R IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

WANG Peng^{1,2}, ZHANG Nu³, ZHANG Xu-Jie⁴ and ZHANG Yong-An^{1,4}

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. School of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China; 4. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In this study, the cDNA sequences of Fc γ R α and Fc γ R γ subunits of Fc γ R rainbow trout were cloned for the first time by RACE technique. The sequences of Fc γ R α and Fc γ R γ were analyzed by using bioinformatics software. The expressions of the genes in different cell subpopulations and tissues, as well as in the head kidney after Poly (I:C) and lipopolysaccharide (LPS) stimulations were analyzed by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR). The results showed that the full-length cDNA of Fc γ R α is 1677 bp with an open reading frame (ORF) of 954 bp encoding 317 amino acids. The Fc γ R α is composed of a signal peptide and two Ig-like domains, however, without including transmembrane and intracellular regions. There are three kinds of Fc γ R subunit, involving Fc γ R1, Fc γ R2a, and Fc γ R2b. Fc γ R1 and Fc γ R2 genes are located on different chromosomes, while Fc γ R2a and Fc γ R2b are two splicing isoforms of Fc γ R2 gene. These subunits are composed of signal peptide, transmembrane domain, and immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). Amino acid sequence similarity analysis showed that the highest identity (30%) of Fc γ R α is between rainbow trout and channel catfish (*Ictalurus punctatus*), and Fc γ R1 and Fc γ R2a/2b in rainbow trout have the maximum sequence identity (40%) with mammalian Fc γ R. Tissue distribution analysis showed that the expression of Fc γ R α , Fc γ R1, and Fc γ R2a/2b was higher in head kidney, spleen, and blood cells, respectively. Analysis of cell subpopulations showed that the expression of Fc γ R α , Fc γ R1, and Fc γ R2a/2b was the highest in the myeloid cell population. In addition, the expression of Fc γ R α , Fc γ R1, and Fc γ R2a/2b in the head kidney was significantly up-regulated after LPS and Poly (I:C) stimulations, indicating that Fc γ R plays an important role in the antibacterial and antiviral immunity.

Key words: FcR; Fc γ R α ; Fc γ R γ ; Rainbow trout; Molecular cloning; Gene expression