

# 鱼类非特异性免疫研究进展

李 莉, 李春梅

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

**摘要:** 鱼类是兼具特异性免疫和非特异性免疫的低等脊椎动物, 而非特异性免疫在抵御外源微生物中发挥重要作用。为此, 概述了鱼类非特异性免疫抗原识别以及非特异性细胞毒细胞、吞噬细胞、溶菌酶、抗菌肽、干扰素、补体、白细胞介素、天然抗体、铁传递蛋白等在抵御病原感染方面的研究进展。

**关键词:** 鱼类; 非特异性免疫; 抗原识别; 免疫因子

中图分类号: S852.4<sup>+</sup>2 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)02-0026-07

## Research Progress on Non-specific Immune of Fish

LI Li, LI Chun-mei

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** Fish is the lowest vertebrate which possesses the adaptive and innate immunity and the latter plays an important role in resisting foreign microorganisms. This review is briefly summarized on the non-specific immunity antigen identification and the important function of non-specific cytotoxic cells, phagocytic cell, lysozyme, antimicrobial peptide, complement, interferon, natural antibody, interleukin, and transferrin involved in pathogen invades.

**Key words:** fish; innate immune system; antigen identification; immune factor

随着水产养殖业的快速发展, 水产养殖产量大幅增加, 但高密度集约化养殖也为病原微生物的传播提供了有利条件, 鱼病频发对渔业发展造成了不可估量的损失。在对疾病防治途径进行探索的过程中, 人们逐渐认识到免疫防病技术的优越性。鱼类是特异性免疫和非特异性免疫并存的脊椎动物, 但与哺乳动物相比, 鱼类特异性免疫机制还不完善, 在抵御病原微生物时主要依赖非特异性免疫发挥作用。本研究主要介绍由胚系基因编码的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)、鱼类非特异性免疫细胞和体液免疫因子如溶菌酶、干扰素、补体、白细胞介素、铁传递蛋白、天然抗体、抗菌肽等在抵御外来病原方面的研究进展。

### 1 非特异性模式识别受体

免疫细胞活性的作用主要是通过胚系编码的模式识别受体(PRR)识别与病原相关的分子模式

(pathogen-associated molecular patterns, PAMP), 实现对外来病原体的早期识别, 进而启动先天性免疫的效应机制。PAMP 是微生物所具有的某些高度保守的结构, 包括细菌脂多糖、肽聚糖、鞭毛蛋白、非甲基化 CpG DNA、病毒双链 RNA、 $\beta$ -1, 3 葡聚糖等。PRR 可分为膜结合受体和可溶性受体 2 类, 前者在鱼类中有 Toll 样受体(TLR), 而后者则在鱼类中已分离出 C3、凝集素等。TLR 是一种跨膜蛋白, 胞外序列富含亮氨酸重复片段(LRR), 与病原识别有关; 胞内序列含有 Toll/IL-1 受体结构域(TIR), 与 TLR 定位和信号传递有关, 其关键部位在无脊椎动物和脊椎动物中高度保守, 通过识别 PAMP 启动细胞内信号转导介导炎症过程相关基因的表达及抗病毒反应。不同的 TLRs 通过不同的信号途径激活共同或独特的转录因子, 推动抗病原微生物的特定生物反应<sup>[1]</sup>。

在鱼类中, 已经确定的 17 种 TLR 家族成员有

收稿日期: 2011-08-30

基金项目: 河南省重点科技攻关计划项目 (092102110030); 河南省教育厅自然科学研究计划(2009B240001, 2011B240002)

作者简介: 李 莉(1969-), 女, 河南巩义人, 副教授, 博士, 主要从事水产动物病害与免疫研究。E-mail: lily-fish@163.com

TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR5S、TLR7、TLR8、TLR9、TLR13、TLR14、TLR18、TLR19、TLR20、TLR21、TLR22、TLR23<sup>[2]</sup>。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和斑马鱼(*Danio rerio*)经注射 Poly(I:C)或病毒诱导时,TLR3 表达量增加<sup>[3]</sup>。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和草鱼呼肠孤病毒感染引起稀有鮎鲫(*Gobiocypris rarus*)体内 TLR4 表达<sup>[4]</sup>。Raida 等用耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)2次感染同一批虹鳟时发现,TLR5 能够与耶尔森氏弧菌鞭毛结合,激活虹鳟肝脏中免疫因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达<sup>[5]</sup>。鱼类 TLR9 能够识别 CpG 并激活肿瘤坏死因子(TNF)基因表达,Hwang 等用 VHSV、海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)感染牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)时发现,TLR14 主要参与革兰氏阴性细菌引起的免疫反应<sup>[6]</sup>。河豚(*Takifugu rubripes*)细胞表面 TLR22 能够识别 dsRNA 病毒,诱导细胞表达 IFN 发挥抗病毒作用<sup>[3]</sup>。

## 2 非特异性免疫细胞

参与免疫应答或与免疫应答有关的细胞均称为免疫细胞。在鱼类血液和组织中的非特异性免疫细胞主要有吞噬细胞(粒细胞、单核细胞、巨噬细胞)、细胞毒细胞及树突状细胞(DC)等。

### 2.1 非特异性细胞毒细胞(non-specific cytotoxic cells, NCCs)

硬骨鱼类 NCCs 是非特异性免疫的主要承担者,鱼类 NCCs 体积较小且无颗粒,多存在于肾脏、腹腔中,血液中较少。罗非鱼(*Sarotherodon galilaeus*)的 NCCs 激活后组成型表达 TNF- $\alpha$ ,通过 TNF $\alpha$  与细胞膜表面的受体 TNFR-1 结合而发挥作用,对癌细胞、病毒感染细胞都有极强的清除功能<sup>[7]</sup>。Greenlee 等的研究表明,虹鳟头肾、脾脏、末梢血管中的 NCC 可直接与靶细胞接触,通过自身产生的淋巴毒素来杀伤、破坏靶细胞<sup>[8]</sup>。NCC 还通过受体来识别靶细胞,与靶细胞结合后,通过释放穿孔素、颗粒酶及 FasL/Fas 介导的程序性细胞死亡 2 种方式来诱导靶细胞凋亡。

非特异性细胞毒细胞受体(NCC receptor protein, NCCRP)是 NCC 发挥功能的分子基础。Ishimoto 等从鲱鱼体内克隆得到 NCCRP-1 的 cDNA, NCCRP-1 蛋白具有抗原结合域、信号域及转录激活域,是一个双功能分子,不仅能够识别肿瘤、原生动

物、寄生虫等抗原,还能够激活 JAK/STAT 信号通路<sup>[9]</sup>。斑点叉尾鲷(*Ictalurus melas*)NCC 细胞颗粒提取物中发现一种新的受体蛋白——NCC 阳离子抗菌蛋白(NCC cationic antimicrobial protein-1, NCAMP-1),它以可溶性和膜蛋白 2 种形式存在,以可溶性形式存在时直接杀灭入侵的革兰氏阴性菌,以膜蛋白形式存在时是一种模式识别受体,可以识别细菌的 GpC 并与之结合从而杀灭细菌<sup>[10]</sup>。

### 2.2 吞噬细胞(phagocytic cell)

鱼类的吞噬细胞主要有单核细胞、巨噬细胞和粒细胞。黏膜吞噬细胞构成抗感染的第一道屏障;单核细胞和粒细胞等血细胞作为第二道防线可以破坏出现在循环系统中的病原生物;器官和组织中具有吞噬活性的细胞,能够摄取和降解微生物及其产物。

鱼类单核细胞具有较强的粘附和吞噬能力,能够吞噬血液中非己物质和衰老细胞。鱼体受到病原微生物侵扰时,粒细胞和巨噬细胞是机体炎症反应的核心细胞。鱼类血液中的嗜中性粒细胞具有活跃的吞噬和杀伤功能,此外,还能通过产生活性氧杀死病原微生物,鱼类嗜酸性粒细胞也具有吞噬能力,在寄生虫长期感染的情况下能够聚集在寄生部位,参与机体抵御寄生虫的免疫反应<sup>[11]</sup>。鱼类是否有嗜碱性粒细胞目前尚存在争议。鱼类的巨噬细胞可通过多种途径参与鱼类的非特异性防御,当病原微生物表面覆盖有免疫球蛋白和补体成分时,巨噬细胞可通过这些因子的特异性受体识别并杀伤微生物,如巨噬细胞能够识别细菌 LPS 和真菌  $\beta$ -1,3-葡聚糖并与之结合,直接吞噬杀灭病原微生物。巨噬细胞膜表面的碳水化合物受体同样有助于识别和吞噬入侵微生物,并通过其中所含溶菌酶和其他水解酶,对被识别和吞噬的异物进行消化分解。而在炎症反应中,巨噬细胞可以分泌出多种生物活性物质,增强呼吸爆发作用,促进活性氧离子和氮离子的释放来杀死微生物。Chen 等发现,巨噬细胞中具有与非特异性抵抗力相关的蛋白质 Nramp,该蛋白质可对细胞内的寄生虫感染进行非特异性抵抗<sup>[12]</sup>。Teles 等用铜、LPS 及铜与 LPS 的组合对虹鳟巨噬细胞进行试验,巨噬细胞中 SAA (serum amyloid A)、TCPBP (trout C-polysaccharide binding protein)、NADH 氧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶、炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及肿瘤坏死因子 TNF $\alpha$  等表达量明显增加<sup>[13]</sup>。

### 3 非特异性免疫因子

#### 3.1 溶菌酶(lysozyme)

溶菌酶是存在于鱼类黏液、淋巴组织、血清、头肾中的一种水解酶。血清中的溶菌酶主要来源于中性粒细胞、单核细胞和吞噬细胞。溶菌酶能够催化细菌细胞壁水解,使细菌细胞因渗透压差而破裂,从而杀灭病原微生物。在脊椎动物中主要有 C 型和 G 型 2 种溶菌酶,它们在分子质量、氨基酸组成及酶活性方面有明显区别。

Mitra 等从虹鳟的肝脏和肾脏 cDNA 文库中获得 C 型溶菌酶基因片段(I 型和 II 型),发现只有 II 型溶菌酶基因编码的蛋白具有潜在的抗菌活性<sup>[14]</sup>;禹绍国等获得了奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)3 种 C 型溶菌酶基因,分析显示,这 3 个基因均具有 C 型溶菌酶的典型结构,但氨基酸序列间存在一定差异,其中 C-1 的等电点较低且碱性氨基酸较少,推断 3 种溶菌酶可能具有生理功能上的差异与分工<sup>[15]</sup>。

牙鲆、大西洋鲑和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)等鱼类的 G 型溶菌酶基因已经克隆成功<sup>[16-18]</sup>;G 型溶菌酶序列与牙鲆的 G 型溶菌酶基因的同源性为 72.2%<sup>[17]</sup>。而 G 型溶菌酶与 C 型溶菌酶的同源性只有 10%。

溶菌酶基因在体内广泛分布,经细菌感染后在某些组织中的表达量明显提高。异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)C 型溶菌酶基因编码 146 个氨基酸<sup>[19]</sup>,头肾和脾脏中 C 型溶菌酶 mRNA 的表达量约为肝胰脏的 219 倍和 117 倍,而头肾和脾脏的溶菌酶活性约为肝胰脏的 612 倍和 4 倍。塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)经 LPS 诱导或者发光菌感染后脾脏、头肾和肝脏中 C 型溶菌酶含量增加<sup>[20]</sup>;健康牙鲆 C 型溶菌酶在肾脏、脾脏、脑和卵巢等组织中表达,经爱德华氏菌感染后,头肾、脾脏和卵巢中的转录量显著提高,而牙鲆的 G 型溶菌酶经爱德华氏菌感染后,其表达量在心脏、肠和血液中显著提高<sup>[16,21]</sup>。Whang 等用 LPS、Poly(I:C)、迟缓爱德华氏菌和海豚链球菌等分别感染条石鲷,血液、鳃和头肾中的 G 型溶菌酶表达量明显增加<sup>[22]</sup>。

欧洲比目鱼(*Scophthalmus rhombus*)C 型溶菌酶主要在肝脏中表达,G 型则主要存在于脾脏中。LPS 诱导后头肾中 G 型溶菌酶表达量增加,而 C 型溶菌酶含量没有明显变化,说明 G 型溶菌酶参与抗细菌感染反应<sup>[23]</sup>。草鱼的 G 型和 C 型溶菌酶在正常个体中均具广泛的组织分布,但 G 型溶菌酶各组

织表达量较 C 型溶菌酶的低,人工感染细菌后,G 型溶菌酶基因上调幅度均比 C 型溶菌酶基因高,说明草鱼 G 型溶菌酶和 C 型溶菌酶均具有抵抗细菌入侵的作用,但二者存在着不同的调控机制与作用机制<sup>[24]</sup>。

Minagawa 等利用杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达牙鲆 C 型溶菌酶,重组溶菌酶对鳗弧菌(*V. anguillarum*)、溶壁微球菌(*M. lysodeikticus*)等有明显的溶菌作用,但对爱德华氏菌和链球菌的活力很低<sup>[25]</sup>。重组 G 型溶菌酶具有溶解革兰氏阴性病原菌的能力<sup>[16,18]</sup>。

#### 3.2 抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)

AMPs 是在低等脊椎动物的非特异性免疫中发挥重要抗菌作用的小分子多肽。鱼类抗菌肽在结构上有共性,含有较多的精氨酸、赖氨酸和疏水氨基酸,分子可折叠形成  $\alpha$  螺旋,作用于细胞膜,使细胞膜通透性增加,影响细胞正常生理功能,从而杀灭细菌。

鱼类抗菌肽数量和种类繁多, Park 等从泥鳅中分离的 misgurin 表现出广谱的抗菌活性,对革兰氏阳性、阴性细菌及真菌都有抑制作用,但没有明显的溶血活性<sup>[26]</sup>。Salern 等对狼鲈头肾白细胞 cDNA 文库筛选克隆抗菌肽基因时,发现了 moronecidins 家族新成员 dicentracin<sup>[27]</sup>。Wang 等发现了斑点叉尾鲷的抗菌肽 NK-lysines(NKLs),具广谱杀菌作用,可作用于细菌、真菌、原生动物和寄生虫等<sup>[28]</sup>。Noga 等从杂交条纹鲈中分离出抗菌肽 Piscidin 4,具有较强的抗革兰氏阴性和阳性细菌的能力<sup>[29]</sup>。

Hepcidin 是肝脏特异表达的抗菌肽, Hepcidin 又称为 LEAP-1(liver expressed antimicrobial peptide 1),是机体天然免疫的一种效应分子。在机体出现感染、炎症和铁超载时, Hepcidin 基因的表达量增加,在低氧和贫血时表达量下降<sup>[30]</sup>。刘碧莲等从鳊(*Siniperca chuatsi*)肝脏中克隆出 Hepcidin cDNA,编码 86 个氨基酸,含有 8 个保守的 cys 残基,可形成 4 个链内二硫键<sup>[31]</sup>。黄文树等从尼罗罗非鱼肝脏中分离克隆的 Hepcidin 基因包含 3 个外显子和 2 个内含子,编码 88 个氨基酸<sup>[32]</sup>;黄鳍(*Monopterus albus*) Hepcidin 基因编码 90 个氨基酸,注射 LPS 24 h 后,各组织的 Hepcidin 基因表达量都明显升高,显示 Hepcidin 可能在鱼体抵抗外源病原物侵染过程中起着重要作用<sup>[33]</sup>。黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) Hepcidin cDNA 编码 93 个氨基酸,感染嗜水单胞菌和腊样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)后肝脏 Hepcidin mRNA 水平显著升

高<sup>[34]</sup>;大黄鱼 Hecidin 对鱼类病原菌嗜水气单胞菌、副溶血弧菌、鳃弧菌和哈氏弧菌具有强烈的抑菌作用<sup>[35]</sup>。鲶鱼感染细菌后,LEAP-2 在多个组织中呈上调表达,体外表达的 LEAP-2 成熟肽具有抑制嗜水气单胞菌生长的活性<sup>[36]</sup>。

### 3.3 补体(complement)

补体既是非特异性免疫系统中重要的组成成分,又在特异性免疫中发挥作用。鱼类补体系统具有3条激活途径:经典途径(CCP)、旁路途径(ACP)和凝集素途径(LCP),并公用一条终末途径(或裂解途径)。经典途径由细胞表面的抗体激活,其作用具特异性且同时需要  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  参与;旁路途径可直接把 C3 或外来病原微生物特定结构激活,需要  $\text{Mg}^{2+}$  参与。Bf 和 C2 是旁路激活途径和经典途径中2个重要的蛋白酶——C3 转化酶和 C5 转化酶的组成亚基,大黄鱼中存在 Bf/C2A、Bf/C2B 2种 Bf/C2 cDNA, Bf/C2A 与哺乳动物 Bf 基因相似, Bf/C2B 则与 C2 更相似,他们与哺乳动物 Bf 和 C2 具有相同的功能。用溶藻弧菌感染大黄鱼, Bf/C2A 表达量增加比 Bf/C2B 明显,说明两者可能在大黄鱼抵御细菌感染过程中具有不同作用<sup>[37]</sup>。鱼类补体系统中, C3、Bf 存在多种亚型,已研究过的高等脊椎动物除眼镜蛇外, C3 都是单个基因编码的产物,但目前从硬骨鱼获得的 C3 基因都有多个亚型,虹鳟有4种 C3 亚型<sup>[38]</sup>,鲤鱼有 C4-1 和 C4-2 等2个亚型<sup>[39]</sup>。

哺乳动物异源二聚体血清蛋白(I因子)由轻链和重链构成,轻链具有蛋白酶活性,重链具有识别特异性。Abernathy 等克隆了斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*) I 因子 cDNA, 编码 668 个氨基酸,与哺乳动物 I 因子具有相似的结构域,在进化上高度保守,通过裂解 C3b 和 C4b 片段使其失活,从而控制补体系统的活化<sup>[40]</sup>。

鱼类补体系统基本上和高等脊椎动物相似,但鱼类补体也有其自身的特性,鱼类补体在 15~25 °C 的活性最高,在 0~4 °C 依然保持活跃。鱼类是变温动物,在较低温度下生活时,特异性免疫反应可能会相对缓慢或受到抑制,而此时补体系统可以弥补这一不足<sup>[1]</sup>。

### 3.4 干扰素(interferon, IFN)

IFN 是一类在鱼类抗病毒防御中起重要作用的诱导性多基因家族细胞因子。作为重要的 II 型细胞因子, IFN 通过与细胞膜上相应的受体结合启动信号转导,发挥其相应的生物学效应,如激活抗病毒基因参与病毒免疫、调节机体细胞生长和分化、细胞凋

亡及机体和细胞的免疫反应等。鱼类 IFN 有 Type I IFN 和 Type II IFN 2 类: Type I IFN 耐酸、耐热,由白细胞和成纤维细胞产生; Type II IFN 不耐酸、不耐热,由白细胞、T 细胞或巨噬细胞产生,有丝分裂素等诱导。目前, Type I IFN 已在斑马鱼、大西洋鲑(*Oncorhynchus tshawytscha*)中得到预测及克隆<sup>[41-42]</sup>。

鱼类 Type I IFN 具有广谱抗病毒活性,转染斑马鱼 IFN 基因的细胞对杆状病毒的抵抗力显著提高,而且 *Mx* 基因表达量也显著增加<sup>[41]</sup>。Li 等研究斑马鱼重组 IFN1(zfrIFN1)对传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)感染斑马鱼引起急性病毒感染的抑制作用,结果显示, zfrIFN1 能够强烈抑制 ISKNV 对斑马鱼的急性感染并且启动先天性免疫反应,其抑制效率与注射 zfrIFN1 的时间有关<sup>[43]</sup>。IFN 可通过多种 IFN 诱导基因编码的蛋白发挥作用,如 *Mx* 蛋白、ISG-15、PKR、Viperin、TRIM 蛋白等<sup>[3]</sup>。现已确认的 IFN 诱导基因有 300 种左右,这些基因产物的功能可分为抗病毒、抑制细胞增殖、免疫调节、抗原加工和呈递、信号传导等。Suzuki 等从牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)体内获得干扰素调节因子 10(IRF10)基因,其氨基酸序列包括 DNA 结合域(DBD)、核定位信号(NLS)和 IRF 相关域(IAD)。细菌或病毒感染时, IRF10 在头肾中的表达量增加, LPS 或 Poly (I : C) 诱导时, 外周血淋巴细胞中 IRF10 表达量增加<sup>[44]</sup>。

### 3.5 天然抗体(natural antibody)

天然抗体是指未经过明显的自然感染或人工免疫的鱼类血清中存在的各种抗体,与特异性抗原刺激产生的特异性抗体不同,天然抗体都是由遗传基因编码,天然抗体这种特性使得机体在第一次遇到病原时能够快速有效产生抗体反应。研究显示,不同品系鲤鱼血清中天然抗体水平有显著差异,这种遗传差异的存在不受外界环境和年龄因素的影响,但是这些外源性因素也影响抗体含量,年龄大的动物显示比低龄动物有较多的天然抗体<sup>[45]</sup>。Gudmundsdóttir 等采用浸浴、腹腔注射、浸浴和腹腔注射组合3种方式给鳙鱼幼鱼感染溶藻弧菌,这3种方式均引起鳙鱼幼鱼体内天然抗体水平增加,但所有试验组鱼体内天然抗体水平偏低,和对照组没有显著差异<sup>[46]</sup>。

鱼类 IgM 在卵生和胎生鱼类中都可以从母体转移到卵子或胚胎。据认为,卵和胚胎内 IgM 可以与病原微生物结合,抑制其感染作用。卵内 IgM 主要是防止母体病原垂直转移到卵内,或者有助于早

期胚胎细胞吞噬作用与激活早期胚胎的补体系统<sup>[47]</sup>。Swain 等认为,鱼类繁殖期的血清 Ig 含量显著升高;由于血液中 Ig 含量高于卵泡,因此亲鱼循环系统中的 Ig 便通过血液循环而进入卵泡<sup>[48]</sup>。进入卵子的母源性 Ig 会随着胚胎或仔鱼的体液(或血液)循环从卵黄囊进入其他各个器官,母源抗体在卵子中可能发挥 2 种作用,在卵膜中的抗体能够起到卵子免疫屏障的作用,而在卵黄中的抗体主要是传递到胚胎和仔鱼体内发挥保护作用,从而使仔鱼保持较高的存活能力。

### 3.6 白细胞介素(interleukin, IL)

IL 是由活化的单核-巨噬细胞及淋巴细胞等产生的一类细胞因子,作用于淋巴细胞、巨噬细胞或其他细胞,负责信号传递,联络白细胞群的相互作用。在细胞的活化、增殖和分化中起调节作用。Wang 等在虹鳟中发现了 2 种新型白细胞介素: tIL-17C1 和 tIL-17C2,分别与哺乳动物 IL-17C 和 IL-17E 有较高的同源性。在机体发生炎症反应和抵御细菌感染时, tIL-17C1 主要在鳃和皮肤中表达, tIL-17C2 主要存在于脾脏、头肾和脑中<sup>[49]</sup>。Korenaga 等从河豚身上发现 IL-17 家族新成员 IL-17N<sup>[50]</sup>。Kono 等通过对青鳉、棘鱼和斑马鱼 IL-17N 序列分析发现, IL-17N 蛋白结构中具有由 4 个半胱氨酸残基形成的 2 个二硫键。通过对鱼类和其他物种 IL-17 家族系统发育分析发现, IL-17N 可能是真骨鱼类所特有的,其功能还有待进一步的研究<sup>[51]</sup>。Wang 等在虹鳟中发现一种新的白细胞介素 IL-20L 基因,其转录产物最终形成有 156 个氨基酸的成熟多肽。IL-20L 基因在细胞或免疫组织中的表达受到严格控制,能够被促炎症细胞因子、信号转导通路激活子、病原细菌、免疫抑制剂等诱导表达,可能与哺乳动物中的 IL-19、IL-20、IL-24 来源于同一祖先基因<sup>[52]</sup>。

### 3.7 铁传递蛋白(transferrin, Tf)

Tf 是一种非血红素结合铁的  $\beta$  球蛋白,分子质量为 70~80 kD 的单一肽链。Tf 基因是一组编码包括血清转铁蛋白、卵转铁蛋白、乳转铁蛋白以及转铁蛋白类似物的基因家族。Tf 家族通常含有糖基,具有 2 个球状结构域,每个结构域都有一个铁结合位点,两者具有较高的同源性<sup>[53]</sup>。Tf 主要在肝脏合成,分泌进入血液,在脑、中枢神经系统、脾和肾脏中也有明显表达<sup>[54]</sup>。在正常情况下,血浆中大多数铁都与 Tf 结合形成复合物,复合物通过 Tf 受体介导的内吞作用进入细胞, Tf 与铁的结合使周围形成低铁环境,可以有效抑制微生物的生长和繁殖<sup>[55]</sup>。

Liu 等用迟缓爱德华菌感染斑点叉尾鲷, Tf 的表达量显著增加。其 Tf 基因与脊椎动物 Tf 具有较高的相似性,都具有典型的铁结合域,在肝脏中表达量高,说明 Tf 除了能完成铁离子转移的生理过程,还具有抗菌杀菌的性能,是抑制细菌繁殖的重要因子<sup>[55]</sup>。

## 4 结语

鱼类特异性免疫系统较哺乳动物简单,非特异性免疫在病原入侵的防御中发挥重要作用。非特异性免疫产生了一套非克隆性分布的模式识别受体(PRRS)来辨别病原体的保守结构 PAMP,但不具备特异性免疫所特有的免疫记忆成分,也没有二次免疫应答。非特异性细胞毒细胞、吞噬细胞及溶菌酶、抗菌肽、干扰素、补体、白细胞介素、铁传递蛋白、天然抗体等非特异性免疫细胞和因子则是鱼类消除外来病原的重要基础。

### 参考文献:

- [1] Whyte S K. The innate immune response of finfish — A review of current knowledge[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(6): 1127-1151.
- [2] Rebl A, Gold T, Seyfert H M. Toll-like receptor signaling in bony fish [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 134: 139-150.
- [3] Workenhe S T, Iseb M L, Kibengea M J T, et al. The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses[J]. Mol Immunol, 2010, 47: 2525-2536.
- [4] Su J, Yang C, Xiong F, et al. Toll-like receptor 4 signaling pathway can be triggered by grass carp reovirus, *Aeromonas hydrophila* infection in rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(1): 33-39.
- [5] Raida M K, Buchmann K. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1 [J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33: 34-45.
- [6] Hwang S D, Kondo H, Hirano I, et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 14 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(1): 425-429.
- [7] Praveen K, Evans D L, Jaso-Friedmann L. Constitutive expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity [J]. Mol Immunol, 2006, 43: 279-291.
- [8] Greenlee A R, Brown R A, Ristow S S. Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptotic mechanisms [J]. Dev Comp Immunol, 1991, 15: 153-164.

- [9] Ishimoto Y, Savan R, Endo M, *et al.* Non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP)-1 type gene in tilapia (*Oreochromis niloticus*): its cloning and analysis[J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16(2): 163-172.
- [10] Connor M A, Liliana J F, John H, *et al.* Role of non-specific cytotoxic cells in bacterial resistance: Expression of a novel pattern recognition receptor with antimicrobial activity[J]. Mol Immunol, 2009, 46: 953-961.
- [11] Chaves P E, Muno P, Lope M A, *et al.* Early innate-immune response and redistribution of inflammatory cells in the bonyfish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum* [J]. Cell Tissue Res, 2005, 320(1): 61-68.
- [12] Chen S L, Xu M Y, Ji X S, *et al.* Cloning and characterisation of natural resistance associated macrophage protein(Nramp) cDNA from red sea bream(*Pagrus-major*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 17(4): 305-313.
- [13] Teles M, Mackenzie S, Boltana S, *et al.* Gene expression and TNF-alpha secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(1): 340-346.
- [14] Mitra A, Foster F J, Rexroad T, *et al.* Molecular characterization of lysozyme type II gene in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence of gene duplication [J]. Anim Biotechnol, 2003, 14(1): 7-12.
- [15] 禹绍国, 叶星, 张莉莉, 等. 奥利亚罗非鱼 3 种 C 型溶菌酶基因的克隆及其序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(1): 66-74.
- [16] Hikima J, Minagawa S, Hirono, *et al.* Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2001, 1520: 35-44.
- [17] Kyomuhendo P, Myrnes B, Nilsen I W. A cold-active salmon goose-type lysozyme with high heat tolerance [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2007, 64(21): 2841-2847.
- [18] Yin Z X, He J G, Deng W X, *et al.* Molecular cloning, expression of orange-spotted grouper goose-type lysozyme cDNA, and lytic activity of its recombinant protein[J]. Dis Aquat Organ, 2003, 55(2): 117-123.
- [19] 钱曦, 华雪铭, 黄旭雄, 等. 异育银鲫 c 型溶菌酶全长 cDNA 序列的生物信息学分析及其组织表达分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(4): 337-342.
- [20] Ferna'ndez-Trujillo M A, Porta J, Manchado M, *et al.* C-Lysozyme from Senegalese sole (*Solea senegalensis*): cDNA cloning and expression pattern[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(5): 697-700.
- [21] Hikima J, Hirono I, Aoki T. Characterization and expression of c-type lysozyme cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1997, 6(4): 339-344.
- [22] Whang I, Lee Y, Lee S, *et al.* Characterization and expression analysis of a goose-type lysozyme from the rock bream *Oplegnathus fasciatus*, and antimicrobial activity of its recombinant protein[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(2): 532-542.
- [23] Jime'nez-Cantizano R M, Infante C, Martin-Antonio B, *et al.* Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(1/2): 57-65.
- [24] Ye Xing, Zhang Lili, Tian Yuanyuan, *et al.* Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34: 501-509.
- [25] Minagawa S, Hikima J, Hirono I, *et al.* Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells[J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 439-445.
- [26] Park C B, Lee J H, Park I Y, *et al.* A novel antimicrobial peptide from the loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. FEBS Letters, 1997, 411(23): 173-178.
- [27] Salerno G, Parrinello N, Roch P. cDNA sequence and tissue expression of an antimicrobial peptide, dicentracin, a new component of thymoronecin family isolated from head kidney leukocytes of sea bass [J]. Comp Biochem Physiol, B Biochem Mol Biol, 2007, 146(4): 521-529.
- [28] Wang Q, Wang Y, Xu P, *et al.* NK-lysin of channel catfish: gene triplication, sequence variation, and expression analysis[J]. Mol Immunol, 2006, 43: 1676-1686.
- [29] Noga J, Silphaduang U, Park NG, *et al.* Piscidin 4: a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2009, 152: 299-305.
- [30] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3: 710-720.
- [31] 刘碧莲, 白俊杰. 鳊 hepcidin cDNA 的分子克隆及序列分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(6): 995-1000.
- [32] 黄文树, 李少菁, 蔡灵, 等. 尼罗罗非鱼 *Hepcidin* 基因结构与序列分析[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 4(3): 390-395.
- [33] 李伟, 孙文秀, 熊涛. 黄鳝抗菌肽 *hepcidin* 基因 cDNA

- 的克隆及表达分析[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2009, 35(3): 304-308.
- [34] 沈文英, 李卫芬, 雷凯, 等. 黄颡鱼抗菌肽 *Hepcidin* 基因的克隆和表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(6): 972-978.
- [35] Wang K J, Cai J J, Cai L, *et al.* Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide[J]. Peptides, 2009, 30: 638-646.
- [36] Bao B L, Peatman E, Xu P, *et al.* The catfish liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated[J]. Mol Immunol, 2006, 43: 367-377.
- [37] Wei W, Wu H Z, Xu H G, *et al.* Cloning and molecular characterization of two complement Bf/C2 genes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(2): 285-295.
- [38] Nonaka M, Irie M, Tanabe K, *et al.* Identification and characterization of a variant of the third component of complement (C3) in rainbow trout *sernm* [J]. J Biol Chem, 1985, 260: 809-814.
- [39] Nakao M, Mutsuro J, Nakahara M, *et al.* Expansion of genes encoding complement components in bony fish; biological implications of the complement diversity [J]. Dev Comp Immunol, 2003, 27: 749-762.
- [40] Abernathy J W, Lu J G, Liu H, *et al.* Molecular characterization of complement factor I reveals constitutive expression in channel catfish [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(2): 768-772.
- [41] Altmann S M, Mellon M T, Distel D L, *et al.* Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish *Danio rerio* [J]. J Virol, 2003, 77(3): 1992-2002.
- [42] Sun B J, Robertsen B, Wang Z Q, *et al.* Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with wary different expression properties[J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33: 547-558.
- [43] Li Z S, Xu X P, Huang L C, *et al.* Administration of recombinant IFN1 protects zebrafish (*Danio rerio*) from ISKNV infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(3): 399-406.
- [44] Suzuki Y, Yasuike M, Kondo H, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of interferon regulatory factor 10 (IRF10) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(1): 67-76.
- [45] Kachamakova N M, Irnazarow I, Parmentier H K, *et al.* Genetic differences in natural antibody levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21(4): 404-413.
- [46] Gudmundsdottir S, Magnadóttir B, Björnsdóttir B, *et al.* Specific and natural antibody response of cod juveniles vaccinated against *Vibrio anguillarum* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(4): 619-624.
- [47] Huttenhuis H B, Grou C P, Taverne-Thiele A J, *et al.* Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20(4): 586-596.
- [48] Swain P, Nayak S K. Role of maternally derived immunity in fish [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(2): 89-99.
- [49] Wang T H, Samuel A M, Martin, *et al.* Two interleukin-17C-like genes exist in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* that are differentially expressed and modulated [J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34: 491-500.
- [50] Korenaga H, Kono T, Sakai M. Isolation of seven IL-17 family genes from the Japanese pufferfish *Taki fugu rubripes* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(5/6): 809-818.
- [51] Kono T, Korenaga H, Sakai M. Genomics of fish IL-17 ligand and receptors; A review [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 31(5): 635-643.
- [52] Wang T H, Patricia Díaz-Rosales, Martin A M, *et al.* Cloning of a novel interleukin (IL)-20-like gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* gives an insight into the evolution of the IL-10 family [J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34: 158-167.
- [53] Neves J V, Wilson J M, Rodrigues P N S. Transferrin and ferritin response to bacterial infection; the role of the liver and brain in fish [J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33: 848-857.
- [54] Lambert LA, Perri H, Halbrooks P J, *et al.* Evolution of the transferrin family; conservation of residues associated with iron and anion binding [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2005, 142: 129-141.
- [55] Liu H, Takano T, Abernathy J, *et al.* Structure and expression of transferrin gene of channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(1): 159-166.