

香鱼 *hepcidin* 基因的克隆、序列分析及组织表达特征

陈梅珍, 陈 炯*, 陆新江, 史雨红

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: Hecpcidin 是一类富含半胱氨酸的抗菌肽, 在鱼类非特异性免疫中起重要作用, 具有调节铁代谢的功能。该研究克隆了香鱼 *hepcidin* 基因 cDNA 序列, 全长 763 个核苷酸, 包含一个完整的开放阅读框, 推测编码一个由 85 个氨基酸组成的相对分子质量为 9.7 k 的多肽, N 端 24 个氨基酸是信号肽序列。香鱼 *hepcidin* 的成熟肽序列由 25 个氨基酸组成, 含有 8 个半胱氨酸, 可形成 4 个分子内二硫键结构。系统进化树分析表明, *hepcidin* 的物种进化关系与目前接受的物种分类关系基本一致, 香鱼 *hepcidin* 位于鱼类 *hepcidin* 簇中, 与大西洋鲑 *hepcidin* 的亲缘关系最近, 达 60%。香鱼 *hepcidin* 在肝脏中表达量最大, 在脾、肾、心脏和肌肉中也有表达。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 结果表明, 鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)感染以后香鱼肝组织中 *hepcidin* 基因 mRNA 表达量显著增加, 在 12 h 增加了 8.26 倍。*hepcidin* 基因可能在香鱼抗外界病原物感染过程中起重要作用。

关键词: Hecpcidin; 香鱼; 鳃利斯顿氏菌; qRT-PCR

中图分类号: Q785; Q959.499; Q516 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2010)06-0595-06

Molecular cloning, sequence analysis and expression pattern of *hepcidin* gene in ayu (*Plecoglossus altivelis*)

CHEN Mei-Zhen, CHEN Jiong*, LU Xin-Jiang, SHI Yu-Hong

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Hecpcidin, a member of cysteine-rich antimicrobial peptides, plays an important role in both fish adaptive immunity and the regulation of iron metabolism. In this paper, the nucleotide sequence of a full-length cDNA clone for ayu (*Plecoglossus altivelis*) *hepcidin* gene, 763 nucleotides in length, was determined. Ayu *hepcidin* gene contained a complete open reading frame (ORF) encoding an 85-amino-acid peptide with a molecular weight of 9.7 k. A signal peptide of 24 residues existed in *hepcidin* N-terminus. The ayu *hepcidin* mature peptide sequence contained 25 amino acids with eight cysteines that formed four disulfide bonds. Sequence comparison and phylogenetic analysis showed that ayu *hepcidin* was most similar to Atlantic salmon (*Salmo salar*), and the relationships of the different *hepcidin* coincided well with the evolutionary relationships of their organisms. In healthy ayu, *hepcidin* mRNA was mainly expressed in the liver, spleen, kidney, heart, and muscle. After *Listonella anguillarum* infection, liver *hepcidin* mRNA expression change was determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) method. *Hecpcidin* transcripts of ayu liver were significantly up-regulated and peaked at 12 h. These results suggest that *hepcidin* may be involved in the immune response of ayu.

Key words: Hecpcidin; Ayu; *Listonella anguillarum*; qRT-PCR

鱼类生活在含有多种微生物的水体中, 它们的先天免疫系统对微生物的入侵起到重要作用。抗菌肽(antimicrobial peptide)是一类具有广谱抗菌活性的小分子多肽, 广泛存在于生物界(Gong et al, 2010; Arvidsson et al, 2001)。抗菌肽是鱼类先天性免疫系统的重要组成部分, 它在鱼体内持续存在且在病原

体诱导下表达量上升(Lehrer et al, 2005)。研究表明, 鱼类抗菌肽对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、霉菌、病毒等病原微生物均具有很强的杀伤活性(Hancock & Lehrer, 1998)。Hecpcidin 是一类富含半胱氨酸的抗菌肽, 在不同物种间高度保守, 有四个独特二硫键结构, 在生物体内具有调节铁代谢的功能, 是机

收稿日期: 2010-04-26; 接受日期: 2010-09-16

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0734); 宁波市科技创新公共服务平台项目(2007A31004)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: jchen1975@163.com

第一作者简介: 陈梅珍(1984—), 女, 浙江丽水人, 硕士生, 研究方向: 水产分子生物学; Tel: 13957420181; E-mail: cmz1211@163.com

体天然免疫的重要效应分子(Park et al, 2001)。Hepcidin 最初是从人的尿和血浆里面纯化得到, 主要在肝脏中表达(Park et al, 2001)。Hepcidin 在体内或体外均具有抑制真菌、细菌及原生动物的作用(Douglas et al, 2003), 而且在机体受病原感染后, 表达显著上升(Chen et al, 2007)。Hepcidin 也是一种信号分子, 参与机体铁代谢, 通过直接抑制肠上皮细胞对铁的吸收的方式调节机体的铁浓度(Knutson et al, 2005), 与炎症性贫血、遗传性血色素沉着病等铁代谢紊乱性疾病的发病机制密切相关(Nicolas et al, 2005)。近年来, 采用同源克隆和 EST 等分子生物学技术, 已克隆并测定了多种哺乳动物和大西洋鲑(*Salmo salar*)(Douglas et al, 2003)、黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)(Rodrigues et al, 2006)、真鲷(*Pagrus major*)(Chen et al, 2005)、斑马鱼(*Danio rerio*)(Shike et al, 2004)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)(Bao et al, 2006)等多种鱼类的 *hepcidin* 基因。

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)隶属胡瓜鱼目香鱼科, 是东亚地区中国、日本和朝鲜等国家特有的一种小型经济名贵鱼类。野生香鱼栖息于溪流, 对环境水质要求极高, 非常适合绿色水产养殖。然而, 香鱼又是一种极易感病的鱼, 集约化养殖密度又很大, 容易爆发细菌性病害, 造成严重的经济损失, 其中鳃利斯顿氏菌是最早被发现, 也是最重要的香鱼病原菌之一(Muroga et al, 1984; Li et al, 2009)。病害问题已成为制约香鱼养殖产业蓬勃发展的瓶颈之一。*hepcidin* 由于具有广谱的抗菌作用、高效的抗菌活性和不易产生抗药性等优点, 在鱼类饲料中可作为抗生素添加剂的良好替代品。本文测定了香鱼 *hepcidin* 基因的 cDNA 全序列, 明确了它的序列特征、系统进化关系和其 mRNA 的组织表达特征, 并用实时荧光定量 PCR 技术检测鳃利斯顿氏菌感染后不同时间香鱼肝组织 *hepcidin* 基因的 mRNA 的表达变化, 为进一步深入研究香鱼 *hepcidin* 的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

健康香鱼 39 尾, 体重(45 ± 5) g, 购自宁波水产大世界。

大肠杆菌 TG1 菌株和载体 pBluescript SKII(+) 由本实验室保存。T₄ DNA 连接酶、RNAiso 试剂、

Oligotex-dT30^{super} mRNA Purification Kit、AMV 逆转录酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶、cDNA Library Construction Kit 和 SYBR *Premix Ex Taq* 试剂盒均购于 Takara 公司; Gel Extraction Kit 购于 Omega 公司; 引物合成及序列测定由上海英骏生物工程公司完成。鳃利斯顿氏菌分离株 ayu-H080701 分离自弧菌病香鱼(Li et al, 2009), 由本实验室保存。

1.2 组织制备

购回的香鱼暂养一周后, 随机选取 3 尾香鱼, 分别取肝、脾、肾、脑、心、鳃、肌肉和肠组织立即投入液氮保存, 随后转于 -70℃ 超低温冰箱保存, 收集的组织作为健康香鱼样品。剩余的香鱼分为注射组(18 尾)和对照组(18 尾), 注射组用 1.0×10^4 CFU/尾的感染浓度腹腔注射鳃利斯顿氏菌分离株 ayu-H080701 悬液, 对照组注射等剂量的无菌生理盐水。注射后 4、8、12、16、24 和 36 h 分别取样, 每组每次取样 3 尾, 取样方法同上。

1.3 香鱼 *hepcidin* 基因 cDNA 序列的获得

提取健康香鱼肝组织总 RNA, 用 Oligotex-dT30^{super} 纯化 mRNA, 以其为模板, 采用 cDNA Library Construction Kit 构建香鱼肝组织 cDNA 文库, 具体方法参照厂家说明。随机挑选 287 个克隆, 部分测序并经 BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)分析, 测通与已知物种 *hepcidin* 基因序列相似的插入片段克隆。

1.4 序列分析

同源比对采用 Blast 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 信号肽序列预测采用 SignalP 3.0 系统(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 多重序列比对采用 Clustal W 程序(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>), 系统进化树构建采用 MEGA 4.0(Tamura et al, 2007)。

1.5 *Hepcidin* 基因 mRNA 的组织表达特征

采用 RNAiso 试剂提取香鱼各组织总 RNA, 并用 DNase I (RNase-free) 进行处理。取 1 μg 总 RNA 为模板, oligo(dT)₃₀ 为引物, 用 AMV 逆转录酶在 42℃ 作用 1.5 h, 合成第一链 cDNA。根据已获得的香鱼 *hepcidin* 全长基因 cDNA 序列设计引物, Heptest(+): 5'-GACACTACCCAACGGACTCT-3' 和 Heptest(-): 5'-TCTTCTACCTGCTGGTGTTC-3', 预期扩增片段长度为 260 bp; 根据 GenBank 中香鱼 β-actin cDNA 序列(AB020884)设计引物, pActin2(+): 5'-TCGTGCGTGACATCAAGGAG-3' 和 pActin2(-):

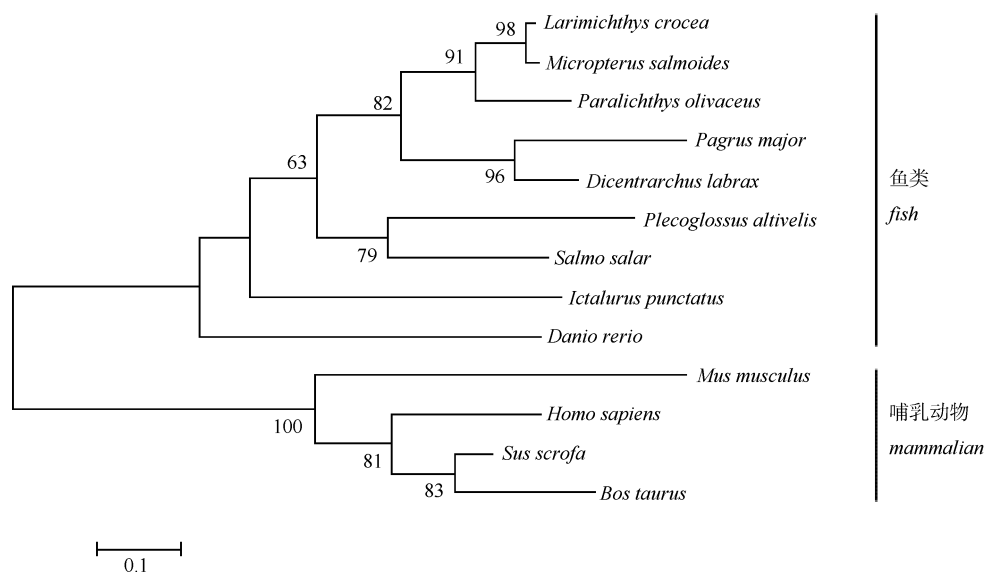


图2 基于 Neighbor-Joining 法构建香鱼和其他物种全长 hepcidin 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of animal hepcidin on the amino acid sequences using Neighbor-Joining method

分叉处的数值表示 1000 次重复抽样所得的置信度, 只显示置信度 60% 以上的分支。图中所用物种 hepcidin 序列的 GenBank 登陆号分别为: 香鱼: FN811135; 大黄鱼: DQ307050; 大嘴鲈鱼: EU502749; 日本牙鲆: AB198061; 真鲷: AY766390; 黑鲈: DQ131605; 大西洋鲑: NM_001140849; 斑点叉尾鲷: DQ200985; 斑马鱼: AY363454; 鼠: NM_183257; 人: NM_021175; 猪: NM_214117; 牛: NM_001114508。

The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1000 replicates; shown only when >60%). The scale bar shows the number of substitutions per base. Accession numbers of sequences used are *Plecoglossus altivelis*, FN811135; *Larimichthys crocea*, DQ307050; *Micropterus salmoides*, EU502749; *Paralichthys olivaceus*, AB198061; *Pagrus major*, AY766390; *Dicentrarchus labrax*, DQ131605; *Salmo salar*, NM_001140849; *Ictalurus punctatus*, DQ200985; *Danio rerio*, AY363454; *Mus musculus*, NM_183257; *Homo sapiens*, NM_021175; *Sus scrofa*, NM_214117; *Bos taurus*, NM_001114508.

香鱼 hepcidin 与其他鱼类 hepcidin 同簇, 与大西洋鲑的进化相关性最高。鱼类 hepcidin 与哺乳动物 hepcidin 分别成簇。

2.2 健康香鱼 hepcidin 基因 mRNA 的组织表达特征

图 3a 显示的是香鱼 hepcidin 基因的组织表达差异。RT-PCR 结果显示 hepcidin 在不同的组织表达水平不尽相同。健康香鱼 hepcidin 基因 mRNA 在肝组织中表达最高, 在脾、肾脏、心脏和肌肉中也有少量表达, 但在其他组织中未检测到。

2.3 鳃利斯顿氏菌感染香鱼病症和对肝 hepcidin 基因 mRNA 表达的影响

鳃利斯顿氏菌腹腔注射感染 8 h 后, 香鱼无明显症状。而在 16 h 后鳃利斯顿氏菌感染香鱼失去食欲, 游动缓慢, 平衡失调, 部分鱼体表形成溃疡。到鳃利斯顿氏菌感染香鱼 24 和 36 h, 感病香鱼表现出典型的细菌败血症的症状, 包括鳍基部充血发红, 体表肌肉腐烂。解剖鳃利斯顿氏菌感染香鱼, 发现感病香鱼的腹腔有大量腹水, 肠道充血, 脾和肾充血肿大; 但是, 生理盐水注射的对照香鱼不表现任何异常。

取鳃利斯顿氏菌感染香鱼 4、8、12、16、24 和 36 h 的肝组织, 进行 qRT-PCR 分析。结果表明与对照组相比, 接种后 12 h, 香鱼肝组织 hepcidin 基因 mRNA 表达量显著增加 ($P < 0.05$) 并达到峰值, 约为对照组的 8.26 倍。16 h 之后表达量开始下降, 但是仍然比对照显著性上调, hepcidin 在肝组织的高表达一直持续到 36 h (图 3b)。

3 讨论

本文测定了香鱼 hepcidin 基因的全长 cDNA 序列, 该序列编码一个由 85 个氨基酸组成的相对分子质量为 9.7 k 的多肽。系统进化分析表明, 在已知鱼类中, 香鱼 hepcidin 与大西洋鲑亲缘关系最近。组织差异表达结果显示, 香鱼 hepcidin 主要在肝脏中表达, 这和很多其他鱼类及哺乳动物中所观察到的结果是一致的 (Pigeon et al, 2001; Shike et al, 2002; Lauth et al, 2005; Chen et al, 2007)。

hepcidin 可能在动物抗外界病原感染过程中起重要作用 (Chen et al, 2007); 炎症、高铁饮食及注射脂多糖 (LPS) 等均可诱导小鼠 hepcidin 表达升高 (Nicolas et al, 2001)。推测 hepcidin 在体内可能存在

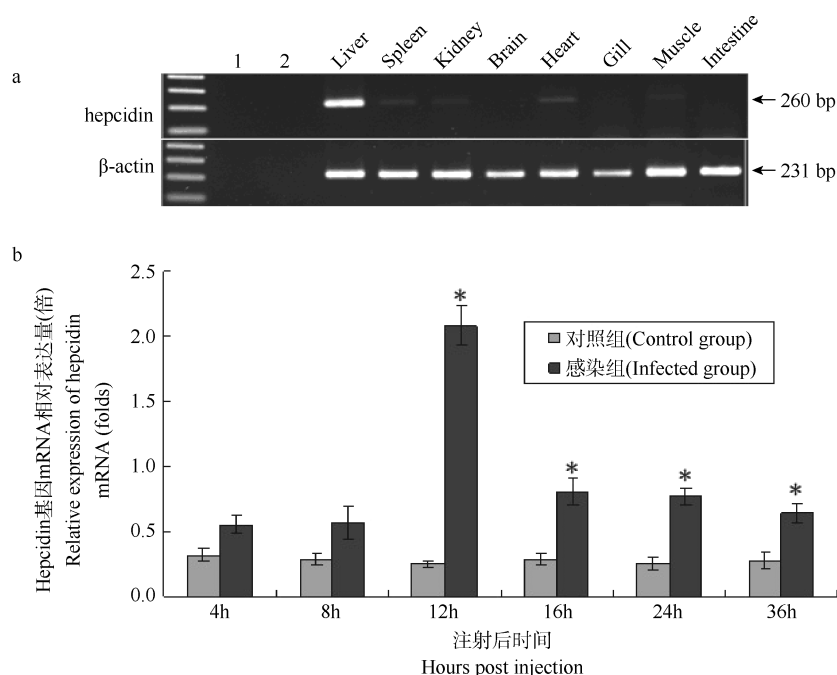


图3 香鱼 hepcidin 基因 mRNA 的组织表达差异

Fig. 3 The mRNA expression patterns of ayu hepcidin

(a) hepcidin 基因 mRNA 在健康香鱼各组织中的表达差异。1: 香鱼基因组 DNA; 2: 无模板阴性对照。使用的 Marker 为 100 bp DNA/MspI。图中的条带大小分别为 400、300、200 和 100 bp。(b) 鳗利斯顿氏菌感染的香鱼肝脏 hepcidin 基因 mRNA 表达变化。*: 显著性差异($n=3$)($P<0.05$)。 (a) Differential expression of hepcidin mRNA in various tissues of healthy ayu. 1: ayu genomic DNA used as template; 2: without template, used as negative control; 100 bp DNA/MspI Marker was used, and the size of band (up to below) means 400, 300, 200, and 100 bp respectively. (b) Analysis of liver hepcidin mRNA expression changes following *L. anguillarum* infection in ayu ($n=3$), * means significant differences ($P<0.05$).

两种抑菌机制: 一种是作为抗菌肽, 直接杀菌抑菌。Hepcidin 无论是人工合成的还是天然的多肽, 均具有直接抑菌活性。体外实验证明, 大黄鱼 hepcidin 的酸提取物对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)具有高效的抑制能力(Zhang et al, 2009)。人工合成的 hepcidin 以较低浓度对革兰氏阴性菌和真菌都显示出较强的体外抗菌活性(Lauth et al, 2005)。另一种推测认为, 由于铁是细菌生长和繁殖的必需元素, hepcidin 可能通过作用铁代谢途径而限制病原体对铁的摄取利用, 从而抑制病原体的生长和繁殖。多种鱼类 hepcidin 在机体内具有调节铁离子代谢的功能(Rodrigues et al, 2006; Hu et al, 2007)。本研究表明,

鳗利斯顿氏菌感染香鱼后, 肝组织 hepcidin 的 mRNA 表达量呈现上升趋势, 到 12 h 时, hepcidin 表达量达到峰值, 约 8.26 倍, 此后表达量开始下降, 但与对照组相比仍表现为显著性增加。类似的结果在其他鱼类中也有报道, 例如大西洋鲑鱼(*Gadus morhua* L.)肝脏 hepcidin 的表达量在感染鳗利斯顿氏菌两天后达到最大值, 约为对照组的 4.5 倍, 之后开始下降(Solstad et al, 2008); 斑点叉尾鲷在爱德华氏菌感染后的 4、24 和 48 h, 肝脏中 hepcidin mRNA 的表达量分别上升了 4、19 和 22 倍 (Hu et al, 2007)。我们的结果为进一步研究 hepcidin 在香鱼免疫中的作用和作用机制提供了基础。

参考文献:

- Arvidsson PI, Frackenpohl J, Ryder NS, Liechty B, Petersen F, Zimmermann H, Camenisch GP, Woessner R, Seebach D. 2001. On the antimicrobial and hemolytic activities of amphiphilic beta-peptides[J]. *ChemBioChem*, 2(10): 771-773.
- Bao B, Peatman E, Xu P, Li P, Zeng H, He C, Liu Z. 2006. The catfish liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated[J]. *Mol Immunol*, 43(4): 367-377.
- Chen SL, Li W, Meng L, Sha ZX, Wang ZJ, Ren GC. 2007. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 22(3): 172-181.
- Chen SL, Xu MY, Ji XS, Yu GC, Liu Y. 2005. Cloning, characterization, and expression analysis of hepcidin gene from Red Sea Bream(*Chrysophrys*

- major)[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**(4): 1608-1612.
- Douglas SE, Gallant JW, Liebscher RS, Dacanay A, Tsoi SC. 2003. Identification and expression analysis of hepcidin like antimicrobial peptides in bony fish[J]. *Dev Comp Immunol*, **27**(6-7): 589-601.
- Gong D, Wilson PW, Bain MM, McDade K, Kalina J, Hervé-Grépinet V, Nys Y, Dunn IC. 2010. Gallin: An antimicrobial peptide member of a new avian defensin family, the ovodefensins, has been subject to recent gene duplication[J]. *BMC Immunol*, **12**: 11: 12.
- Hancock RE, Lehrer R. 1998. Cationic peptides: A new source of antibiotics[J]. *Trends Biotechnol*, **16**(2): 82-88.
- Hu X, Camus AC, Aono S, Morrison EE, Dennis J, Nusbaum KE, Judd RL, Shi J. 2007. Channel catfish hepcidin expression in infection and anemia[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **30**(1): 55-69.
- Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. 2005. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**(5): 1324-1328.
- Lauth X, Babon JJ, Stannard JA, Singh S, Nizet V, Carlberg JM, Ostland VE, Pennington MW, Norton RS, Westerman ME. 2005. Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and *in vivo* hepatic response to bacterial infections[J]. *J Biol Chem*, **280**(10): 9272-9282.
- Lehrer RI, Ganz T. 2005. Defensins of vertebrate animals[J]. *Curr Opin Immunol*, **12**(1): 19-25.
- Li CH, Chen J, Shi YH, Li MY. 2009. Characterization of *Listonella anguillarum* as the aetiological agent of vibriosis occurred in cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Ninghai country, China[J]. *Acta Microbiol Sin*, 2009, **49**(7): 931-937[李长红, 陈炯, 史雨红, 李明云. 2009. 宁海地区香鱼弧菌病原菌鉴定. 微生物学报, **49**(7): 931-937.]
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) method [J]. *Methods*, **25**(4): 402-408.
- Muroga K, Yamanoi H, Hironaka Y, Yamamoto S, Tatani M, Jo Y, Takahashi S, Hanada H. 1984. Detection of *Vibrio anguillarum* from wild fingerlings of ayu *Plecoglossus altivelis*[J]. *Bull Jpn Soc Scient Fish*, **50**(4): 591-596.
- Nakayama K. 1997. Furin: A mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins[J]. *Biochem J*, **327** (3): 625-635.
- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. 2001. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**(15): 8780-8785.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver[J]. *J Biol Chem*, **276**(11): 7806-7810.
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O. 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload[J]. *J Biol Chem*, **276**(11): 7811-7819.
- Rodrigues PN, Vázquez-Dorado S, Neves JV, Wilson JM. 2006. Dual function of fish hepcidin: Response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Dev Comp Immunol*, **30**(12): 1156-1167.
- Shike H, Lauth X, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC, Shimizu C, Bulet P, Burns JC. 2002. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge[J]. *Eur J Biochem*, **269**(8): 2232-2237.
- Shike H, Shimizu C, Lauth X, Burns JC. 2004. Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates[J]. *Dev Comp Immunol*, **28**(7-8): 747-754.
- Solstad T, Larsen AN, Seppola M, Jørgensen TØ. 2008. Identification, cloning and expression analysis of a hepcidin cDNA of the Atlantic cod[J]. *Fish Shellfish Immunol*, **25**(3): 298-310.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, **24**(8): 1596-1599.
- Zhang J, Yan Q, Ji R, Zou W, Guo G. 2009. Isolation and characterization of a hepcidin peptide from the head kidney of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, **26**(6): 864-870.