

日本鳗鲡 *COX-2* 基因的克隆、鉴定及表达分析

张芳芳¹, 熊 静^{1,2}, 段明珠¹, 李春艳¹, 彭喜霞¹, 黄文树^{1,2,3}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;
3. 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 应用 PCR 及 RACE 技术从日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 中克隆获得一个 2463 bp 环氧化酶基因 (*Cyclooxygenase-2*, *AjCOX-2*) 的 cDNA 序列. *AjCOX-2* 前体为 606 肽, 含有脊椎动物 *COX-2* 的保守结构域, 以及加氧酶和过氧化物酶的活性位点. 在正常生理条件下, *AjCOX-2* 基因在日本鳗鲡的鳃、鳔和皮肤中高水平转录表达. 脂多糖刺激后 8 h, *AjCOX-2* 基因在皮肤和鳔中的转录表达显著上调 ($P < 0.05$); 多聚胞苷酸刺激后 8 h, *AjCOX-2* 在皮肤、鳔和鳃中的转录表达显著上调 ($P < 0.05$); 迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 刺激后 8 h, *AjCOX-2* 在鳔中的转录表达也极显著上调 ($P < 0.01$). 结果表明, *AjCOX-2* 基因是对外来病原刺激的早期响应基因, 参与机体抵抗外来刺激物的先天免疫应答.

[关键词] 日本鳗鲡; *COX-2*; 脂多糖; 多聚胞苷酸; 迟缓爱德华氏菌

[中图分类号] S 917

[文献标志码] A

Molecular Cloning, Characterization and Expression of *COX-2* in Japanese eel, *Anguilla japonica*

ZHANG Fang-fang¹, XIONG Jing^{1,2}, DUAN Ming-zhu¹, LI Chun-yan¹, PENG Xi-xia¹, HUANG Wen-shu^{1,2,3}

(1. Fishery College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China; 3. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, a full-length cDNA for *Cyclooxygenase-2* (*AjCOX-2*) was successfully cloned from the Japanese eel (*Anguilla japonica*) by PCR and RACE. The predicted protein of *AjCOX-2* is 606 amino acids in length, which contained all the conservative structural domains and the active sites for both the peroxidase and cyclooxygenase as in its vertebrate homologues. In physiological condition, *AjCOX-2* mRNA was highly expressed in gill, skin and swim bladder in Japanese eel. Additionally, a significant increasing *AjCOX-2* mRNA was detected in both skin and swim bladder ($P < 0.05$) at 8 h after *in vivo* intraperitoneal challenged with LPS and Poly I: C, whilst a significant up-regulation of *AjCOX-2* mRNA was found only in swim bladder at 8 h after challenged by *Edwardsiella tarda*, a pathogenic bacterium isolated from Japanese eel. The results suggested that *AjCOX-2* might be an early immediate gene in response to the immune stimuli and involved in the innate immune response against the pathogens infection in Japanese eel.

Key words: *Anguilla japonica*; *COX-2*; LPS; Poly I: C; *Edwardsiella tarda*

[收稿日期] 2015-05-14

[修回日期] 2015-06-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (31172438); 福建省自然科学基金项目 (2012J06008); 福建省科技项目 (201311180002); 福建省教育厅项目 (JA12195)

[作者简介] 张芳芳 (1990—), 女, 硕士, 从事水产动物病害防治方向研究, 通信作者: 黄文树 (1973—), 男, 副教授. E-mail: wshuang@jmu.edu.cn.

0 引言

环氧化酶 (Cyclooxygenase, COX) 也称为前列腺素内过氧化物 G/H 合成酶 (Peroxide G/H synthetase) (EC 1. 14. 99. 1), 具有催化花生四烯酸形成前列腺素内过氧化物 G₂ (Prostaglandin endoperoxides G₂, PGG₂) 的双加氧酶 (或环氧合酶) 活性, 以及还原 PGG₂ 形成 PGH₂ (Prostaglandin endoperoxides H₂, PGH₂) 的过氧化物酶活性^[1]. PGH₂ 是前列腺素 (prostaglandins)、环前列腺素 (prostacyclins) 及血栓烷 (thromboxanes) 的前体. 前列腺素类物质在发热、炎症反应、维持妊娠、调节离子运输、水平衡和止血等多种生物过程中起重要作用^[2].

COX 属于血红素依赖的髓过氧化物酶超家族, 普遍存在于动物、单细胞生物和微生物中. 此外, 在植物和真菌中也发现了 COX 类似物, 分别是病原诱导的加氧酶和亚油酸酯二醇合成酶^[3]. 已有研究表明, COX 存在三种同工酶, 即: COX-1、COX-2 和 COX-3. COX-3 亦称为 COX-1B 或 COX-1 变体 (COX-1V), 是 COX-1 的可变剪切体^[4]. 哺乳类 COX-1 和 COX-2 的氨基酸序列的一致性约为 60%, 其三级结构相似^[2], 但表达模式不同^[5]. COX-1 在多种组织/细胞中是组成型表达, 以维持细胞的正常功能; 而 COX-2 是组织特异性表达, 并受炎症反应、细胞因子、生长因子和渗透压等诱导而上调^[6].

在硬骨鱼类中, COX 同源物已从虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[7]、金鱼 (*Carassius auratus*)^[8]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[2]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[9]、美洲红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*)^[10]、塞内加尔鲷 (*Solea senegalensis*)^[11]、波纹绒须石首鱼 (*Micropogonias undulatus*)^[12] 及狼鲈 (*Dicentrarchus labrax* L.)^[13] 等中得到克隆鉴定, 并参与多种生物学过程. LPS、重组 IL-1 β 和鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 可诱导狼鲈的头肾白细胞中的 COX-2 基因上调转录表达^[13]; LPS、重组 IL-1 β 和天蚕抗菌肽 B 可上调虹鳟 COX-2 α 在性腺细胞 RTG-2 中的转录表达^[7], 表明 COX-2 参与炎症反应. 此外, 在佛波酯 PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) / A23187 作用下, 美洲红点鲑 COX-2 在皮肤中转录表达量显著上调^[10]. 而 PMA/A23187 诱导鱼类合成前列腺素 PGF 及 PGE, 后者参与排卵的生理过程^[11], 因而认为 PMA/A23187 可通过诱导 COX-2 上调表达, 促进类固醇的合成, 进而促进卵母细胞的成熟和排卵^[13]. 海水养殖的底鳉 (*Fundulus heteroclitus*) 鳃中 COX-2 的表达量比淡水养殖时高出 3 倍, 并且在淡水—海水和海水—淡水急性转移时 COX-2 的表达量迅速发生改变, 表明 COX-2 可调节氯化钠分泌^[14]. 在二恶英的诱导下, 斑马鱼脑中 COX-2 的表达增加, 进而促进了血栓素形成, 导致中脑的静脉循环衰竭^[15].

鳗鲡 (*Anguilla* spp) 是世界主要水产养殖种类之一, 也是中国重要的经济鱼类, 近十年来, 鳗鲡养殖发展迅速, 根据《2014 年中国渔业年鉴》统计, 2013 年中国鳗鲡产量达到 2.06×10^5 t, 有着巨大的经济效益. 然而, 目前对其免疫反应机理的研究仍然匮乏, 因此, 期望通过研究中国主要养殖种类日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 的 COX-2 基因及其表达规律, 揭示其在免疫过程中的作用, 这对于深入了解鱼类抗病机制, 对养殖鱼类病害防治的免疫学基础具有十分重要的意义.

1 材料和方法

1.1 实验材料及样品的采集

日本鳗鲡体重 (200 ± 53) g, 购自福建省厦门市集美大学水产养殖基地, 养殖水温 (28 ± 2) °C、溶解氧 (6.27 ± 0.23) mg/L、亚硝酸盐氮 (1.60 ± 0.39) mg/L 及氨氮 (17.99 ± 7.82) mg/L. 迟缓爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*) 为本实验室保存菌种.

用含丁香酚的冰水麻醉日本鳗鲡后, 断尾, 采集血液于经肝素钠预处理过的离心管中, 混匀, 2919 r/min 离心 20 min, 收集下层细胞; 随后, 解剖鳗鲡, 采集肝脏、肠、皮肤、胃、头肾、中肾、鳔、脾脏和鳃等组织/器官, 分别于液氮中冷冻. 保存于 -80 °C.

免疫原刺激试验采用腹腔注射法. 实验分为: 脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 刺激组 (Sig-

ma, 美国, 货号: L2880), 注射剂量 0.1 g/kg; 多聚胞苷酸 (polyinosinic – polycytidylic acid, Poly I: C) 刺激组 (Sigma, 美国, 货号: GE27 – 4732 – 01), 注射剂量 0.1 g/kg; 迟缓爱德华氏菌刺激组, 注射剂量为 10⁵ cfu/g; 阴性对照组为磷酸盐缓冲液 (PBS). 注射后分别于 8, 16, 24, 72 h 采样, 每组每个时间点各采集日本鳗鲡 6 尾.

1.2 *AjCOX-2* 基因克隆

RNA 提取: 加 1 mL Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国) 和 5 颗直径 3 mm 玻璃微珠至约 100 mg 日本鳗鲡各组织样品中, 匀浆 (3000 r/min, 20 s, Retsch MS100 (日本)) 后, 按照 Trizol 试剂盒说明书 (Invitrogen, 美国) 提取总 RNA. 用琼脂糖凝胶电泳法检测总 RNA 的完整性, 用分光光度计 (Thermo, NanoDrop 2000, 美国) 检测总 RNA 的浓度及纯度.

RACE 扩增及全长 cDNA 序列验证: 取日本鳗鲡脾脏总 RNA (约 2 μg) 进行反转录 (SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit, Clontech, 美国), 制备 RACE 模板. 根据日本鳗鲡脾脏 cDNA 文库中 *COX-2* 的 EST 序列, 用 Premier 6.0 软件设计特异性引物 (见表 1), 进行 RACE (SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit, Clontech) 和巢式 PCR 扩增, 获得日本鳗鲡 *COX-2* (*Anguilla japonica COX-2*, 简称 *AjCOX-2*) cDNA 的 3' 和 5' 末端序列. 根据 5' RACE 和 3' RACE 序列, 设计引物进行 PCR 验证 *AjCOX-2* 全长 cDNA 序列. PCR 产物纯化、回收和测序等参照文献 [16] 的方法.

1.3 定量 PCR

根据 *AjCOX-2* cDNA 序列与 *AjCOX-2* 基因组序列 (未发表数据), 设计跨内含子区域引物 (q*AjCOX-2*F 和 q*AjCOX-2*R, 见表 1), 用 Light Cycler ® 480 SYBR Green I 试剂盒 (Roche, 德国) 在 LightCycler 480 II Realtime PCR 仪 (Roche, 德国) 上进行 *AjCOX-2* 基因表达量分析, 同时, 以 *β-actin* 作为内参基因. 每块 96 孔 PCR 反应板设有系列已知拷贝数的含 *AjCOX-2* 或内参基因的质粒样品, 与 cDNA 样品一起扩增, 以获得标准曲线及扩增效率. 取 4 μg 总 RNA, 用 GoScrip™ Reverse Transcription System (Promega, 美国) 进行反转录, 产物用 TE buffer 稀释, qPCR 反应体系及相关参数参考文献 [16], 并绘制产物的熔解曲线以验证扩增的特异性.

表 1 引物序列
Tab. 1 List of primer sequences

引物名称 Primer	序列 (5'—3') Sequence (5'—3')	退火温度 Annealing temperature	用途 Applicant
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT GGTATCAACGCAGAGT	RACE	
NUPM	ACTCTGCGTTGATACCACTGCTT		
<i>AjCOX-2</i> F1	ACCAGGACAGGATACTACGGAGAGAACT	<i>AjCOX-2</i> F1 + UPM 60 ℃	5' RACE
<i>AjCOX-2</i> F2	CCTACGGTGAAGCAAGTGCAGGTGGA	<i>AjCOX-2</i> F2 + UPM 60 ℃	
<i>AjCOX-2</i> R1	AACTCGGAGGCAATGCGTTCCTGG	<i>AjCOX-2</i> R1 + UPM 64 ℃	3' RACE
<i>AjCOX-2</i> R2	CCGCATTGTAGTTGGTGGGCTATC	<i>AjCOX-2</i> F2 + UPM 62 ℃	
<i>AjCOX-2</i> fl-F	CCTTCTCTGCTGTCCGTTTC	<i>AjCOX-2</i> fl-F + <i>AjCOX-2</i> fl-R	Sequence
<i>AjCOX-2</i> fl-R	TGTTGGTTGTGTCCGCTGTA	62 ℃	confirm
q <i>AjCOX-2</i> F*	<u>GACATCTCGGTCACATTACATTG</u>	q <i>AjCOX-2</i> F + q <i>AjCOX-2</i> R	
q <i>AjCOX-2</i> R*	<u>GACAGGTCAACTTACGCCATG</u>	60 ℃	Real-time
<i>β-actin</i> F	TCACCACCACAGCCGAAAGG	<i>β-actin</i> F + <i>β-actin</i> R	PCR
<i>β-actin</i> R	CGCAGGATTCCATTCCCAGGA	62 ℃	
M13F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	M13F + M13R	Sequencing
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	62 ℃	

说明: q*AjCOX-2*F 及 q*AjCOX-2*R 跨内含子; 下划线的核苷酸序列是在一个外显子, 其余部分位于另一个外显子.
Notes: * Nucleotides in bold and underline are in one exon and others are in another exon.

数据处理:以 β -actin表达量为基准,对样品进行标准化处理.不同组织/器官的AjCOX-2基因表达水平是以标准化样品中靶基因的绝对表达量乘以1000来表示.免疫源刺激后基因的表达水平研究,是以同一时间点刺激组样品中靶基因的绝对表达量除以生理对照组样品中靶基因的绝对表达量来表示.

1.4 序列生物信息学分析

在NCBI网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行序列基础分析.利用ExPASy工具(<http://web.expasy.org/translate/>)翻译氨基酸序列;SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析信号肽;NetPhos Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)分析糖基化位点;PROSITE(<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>)分析蛋白质的功能域;SIAS(<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>)比较氨基酸序列一致性及同源性;使用MEGA 5.0软件的邻接法(N-J法)构建基于氨基酸序列的系统进化树.氨基酸序列数据源于Ensembl网站(<http://asia.ensembl.org/index.html>).

1.5 数据统计分析

数据结果使用Excel软件计算,采用单因素变量方差分析法(ANOVA)分析免疫原刺激样品间AjCOX-2表达量差异,利用Dunnett t-Test (2-sided)进行多重比对.所有数据均用平均值 \pm 标准误差(SEM)的方式表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著.利用GraphPad Prism v5.0软件作图.

2 结果

2.1 AjCOX-2基因的序列分析

根据AjCOX-2的EST序列,进行RACE和巢式PCR扩增,获得5' RACE产物906 bp、3' RACE产物1801 bp及中间产物443 bp,经序列拼接后得到AjCOX-2的全长cDNA序列,并用引物AjCOX-2fl-F和AjCOX-2fl-R验证其开放阅读框.结果显示: AjCOX-2 cDNA全长2463 bp, GenBank登录号为KP888157,其中5' UTR为120 bp,开放阅读框为1821 bp编码一个607肽,3' UTR为523 bp. 3' UTR中包含保守的终止信号(AATAAA)、PolyA序列,及6个与RNA不稳定性相关的ATTTA位点.生物信息学分析结果: AjCOX-2前体肽相对分子质量为69 320, pI为7.06, N-末端21个氨基酸残基为信号肽(见图1).此外,还含有脊椎动物COX-2前体肽保守的12个半胱氨酸残基(其中C25—C36、C26—C149、C30—C46、C48—C58和C559—C566分别形成五对二硫键)、3个环氧化酶活性位点(Y375, H378和S520)、2个过氧化物酶活性位点(Q203和H207)、4个糖基化位点(N-57、-134、-406、-585)、2个血红素结合域(212—KALGH-216和291—WLREHNRVCD-304),以及C-端的内质网滞留信号(604—TSEL-607)(见图1).

2.2 AjCOX-2基因的氨基酸序列多重比对及系统进化树构建

选取哺乳类、鸟类、两栖类和硬骨鱼类代表物种COX-2同源物与本研究AjCOX-2的全长氨基酸序列进行多重比对.结果显示, AjCOX-2与其他物种COX-2的氨基酸序列一致性和相似性分别为0.678~0.777及0.7781~0.8515,其中与美洲红点鲑COX-2a的一致性和相似性均最高,有趣的是,与其一致性最低的是两栖类爪蟾,而与其相似性最低的却是人类(见表2).脊椎动物COX-2前体肽都含有信号肽序列,其中高等脊椎动物(两栖类、鸡以及哺乳动物)的信号肽长度小于20个氨基酸残基,而硬骨鱼均大于20.在脊椎动物COX-2蛋白质序列中含有1到多个糖基化位点,其中糖基化位点N-53(相对于人类COX-2氨基酸的位置)普遍存在于所选的物种中.

多数硬骨鱼的COX-2有两个亚型,即COX-2a和COX-2b,选取的代表性的硬骨鱼类COX-2a和COX-2b进行多重比对,结果显示, COX-2a和COX-2b的蛋白质都含有6个保守的结构域,从N-末端至C-末端分别为信号肽、二聚化作用结构域1、膜结合结构域、二聚化作用结构域2、催化作用域,以及C-端的内质网滞留信号^[17].二聚化作用结构域1中的7个半胱氨酸残基位置高度保守,预测可形成3对二硫键(C21—C31、C26—C41、C43—C52),另一个半胱氨酸(C22)与催化作用域中

的一个半胱氨酸 (C145) 形成二硫键 (见图 2)。在催化作用域内, 存在 3 个环氧化酶的活性位点 (Y375, H378, S520)、2 个过氧化物酶活性位点 (Q203 和 H207) 及 2 个血红素结合域。此外, *COX-2a* 和 *COX-2b* 前体肽分子的不同之处: *COX-2a* 前体肽中第一个血红素结合域为 “XXLGH”, 而在 *COX-2b* 中为 “XGXXH”; *COX-2a* 中内质网滞留信号为 “S (S/T) EL”, 而在 *COX-2b* 中则为 “T (S/T) EL”。

用 MEAG 5.0 软件的 N-J 法对上述 16 条 *COX-2* 全长氨基酸序列构建进化树, 如图 3 所示, 以人类 *COX-1* 全长氨基酸序列作为外参比。结果显示, 在 *COX-2* 支中, 两栖类、鸟类和哺乳类聚为一小支, 鱼类聚为另一小支, 其中 *COX-2a* 聚为一簇, *COX-2b* 聚为另一簇, *AjCOX-2* 与硬骨鱼的 *COX-2a* 聚在一簇。结果表明, *COX-2* 的蛋白质符合传统的进化模式, 进化树与物种之间的进化关系基本对应。

表 2 *AjCOX-2* 与代表性脊椎动物的 *COX-2* 基因编码蛋白的比对

Fig. 2 Between proteins encoded by *AjCOX-2* and *COX-2* gene in representative vertebrates

物种 Species	类型 Type	登录号 Accession number	一致性 Identity	相似性 Similarity	信号肽长度 The length of signal protein	糖基化位点 Glycosylation site	参考文献 Reference
人 <i>Homo sapiens</i>	2	AAA58433.1	0.6982	0.7781	17	N-53, N-130	[3]
鼠 <i>Mus musculus</i>	2	AAH52900.1	0.6916	0.7797	18	N-53, N-130	[3]
鸡 <i>Gallus gallus</i>	2	P27607	0.7243	0.7993	18	N-53, N-90 N-130, N-396	[3]
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	2	NP_001086946.1	0.6737	0.7862	19	N-54, N-131, N-397	[3]
美洲红点鲑 <i>Salvelinus fontinalis</i>	2a	AF158374	0.7797	0.8515	21	N-56, N-133	[2]
底鳉 <i>Fundulus heteroclitus</i>	2b	AAS21313.2	0.7520	0.8254	24	N-58, N-95, N-135, N-401, N-598	[2]
墨西哥脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	2a	ENSAMXP0000000 5635	0.7406	0.8172	21	N-2, N-58, N-95, N-135	[3]
	2b	ENSAMXT0000000 5635	0.7471	0.8221	23	N-56, N-93, N-133, N-596	[3]
虹鳉 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	2a	NP_001117820.1	0.7732	0.8482	21	N-56, N-57,	[7]
	2b	CAB46017.1	0.7618	0.8287	21	N-134, N-579	[7]
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	2b	ENSXMAP0000000 2436	0.7487	0.8238	22	N-57, N-94, N-134, N-400, N-597	[3]
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	2b	ENSORLP0000000 11863	0.7422	0.8058	21	N-58, N-135	[2]
大西洋鳕 <i>Gadus morhua</i>	2b	ENSGMOP0000000 11635	0.7455	0.8238	21	N-2, N-56, N-93, N-133, N-597	[3]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	2a	AAK33031.1	0.7308	0.8058	21	N-56, N-133, N-553	[2]
	2b	NP_001020675.1	0.7585	0.8336	20	N-55, N-92, N-132, N-594	[2]

说明: GenBank 数据库登录号为 KP888157。* 表示终止密码子。氨基酸序列中, 双下划线线残基表示信号肽; 保守半胱氨酸残基用 C 表示; 黑体带阴影表示环氧化酶活性位点; 带框阴影的残基表示过氧化物酶活性位点; 单下划线线残基表示糖基化位点; 黑底白字表示血红素结合域; 斜体加粗表示内质网滞留信号。核酸序列中, ATTTA 为 RNA 不稳定信号。

Notes: The GenBank accession number for *AjCOX-2* is KP888157. The stop codon is underlined as XX; the 12 conservative cysteine residues are boxed. The active sites for cyclooxygenase and peroxidase are marked as **Q** and **Y** respectively; the N-glycosylation sites are underlined as XX; the two haem-binding domains are indicated as XX; the endoplasmic reticulum retention signal is marked by italics. In nucleic acid sequence, the RNA unstable signal is underlined as ATTTA.

图1 AiCOX-2 基因的 cDNA 及其氨基酸序列

Fig.1 The cDNA sequence and its predicted amino acid sequence of *AjCOX-2*

[illegible]

2.3 *AjCOX-2* 在正常养殖的日本鳗鲡中不同组织/器官的表达

用引物 q*AjCOX-2*F 和 q*AjCOX-2*R 扩增日本鳗鲡 cDNA 得到长度为 346 bp 片段,产物的熔解曲线呈单一对称的峰图,说明无特异性扩增,扩增效率为 1.857 ~ 1.915,同时以日本鳗鲡基因组为模板,无法获得有效扩增.以引物 β -actinF 和 β -actinR 扩增得到长度为 178 bp 的 β -actin 片段,其产物的熔解曲线也呈单一对称的峰图,扩增效率为 1.903 ~ 1.927.

利用上述建立的 qPCR 检测方法,分别单独检测了 6 尾正常养殖日本鳗鲡的鳃、鳃、皮肤、肾脏、脾脏、心脏、肠、胃、性腺、肝及血液等 12 个组织/器官中 *AjCOX-2* 的转录表达量,结果显示, *AjCOX-2* mRNA 在所检测组织/器官中均有不同程度的转录表达(见图 4),其中表达量较高的依次为鳃、鳃和皮肤,显著高于其他各组织器官 ($P < 0.05$),但是,该三者间差异不显著 ($P > 0.05$);其次是肾脏(头肾和中肾)、心脏、脾脏和肠,其表达量显著高于其他被检测样品(性腺、血细胞、胃和肝) ($P < 0.05$).

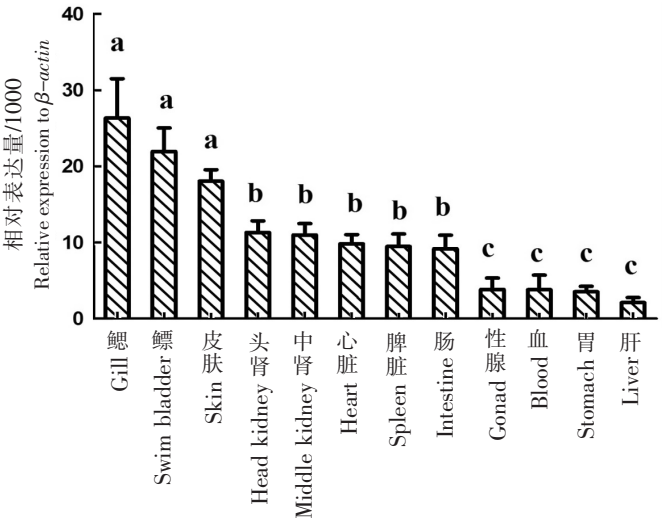
2.4 LPS、*E. tarda* 及 Poly I:C 刺激后 *AjCOX-2* 基因表达变化

AjCOX-2 在日本鳗鲡不同组织/器官中不同程度地表达,并且在鳃、鳃及皮肤中大量表达.因此,本文进一步检测了 LPS、Poly I:C、*E. tarda* 活体刺激后,该基因在鳃、鳃和皮肤中的转录表达变化情况,结果显示:

1) LPS 刺激.在皮肤中,LPS 刺激后,短期内(8 h) *AjCOX-2* 的转录表达量极显著升高,是对照组的 7.3 倍 ($P < 0.01$),至 16 h 已下降,但是仍显著高于对照组 ($P < 0.05$) (见图 5a);在鳃中,LPS 刺激后 8 h, *AjCOX-2* 转录表达也显著上调 ($P < 0.05$) (见图 5b);然而,在鳃中,受 LPS 刺激后,前 72 h, *AjCOX-2* 的表达量不但没有上调反而显著下调,显著低于对照组 ($P < 0.05$).

2) *E. tarda* 人工感染.不同于 LPS 刺激结果,迟缓爱德华氏菌刺激后,皮肤中 *AjCOX-2* 基因的表达无显著变化 ($P > 0.05$).在鳃中,刺激后 8 h, *AjCOX-2* 的表达量极显著增加 ($P < 0.01$),是对照组的 6.08 倍;16 h 时,无显著差异;而在 24 h 和 72 h 时显著高于对照组 ($P < 0.05$),但是上升的幅度不大,分别为 2.31 和 2.19 倍.在鳃中,刺激后 8 h 无显著变化;在 16 h 时, *AjCOX-2* 的表达量极显著上调 ($P < 0.01$);24 h 时,不显著下降;而在 72 h 时却极显著下调 ($P < 0.001$),仅为对照组的 0.43 倍(见图 5b).

3) Poly I:C 刺激.在刺激后 8 h 时, *AjCOX-2* 在鳃、皮肤及鳃中均显著或极显著上调 ($P < 0.05$);在刺激后 16 h 时,在鳃和皮肤中 *AjCOX-2* 的表达仍呈极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$) 上调,随后下降;在刺激后 72 h, *AjCOX-2* 在鳃中的表达量极显著下调 ($P < 0.001$) (见图 5c).

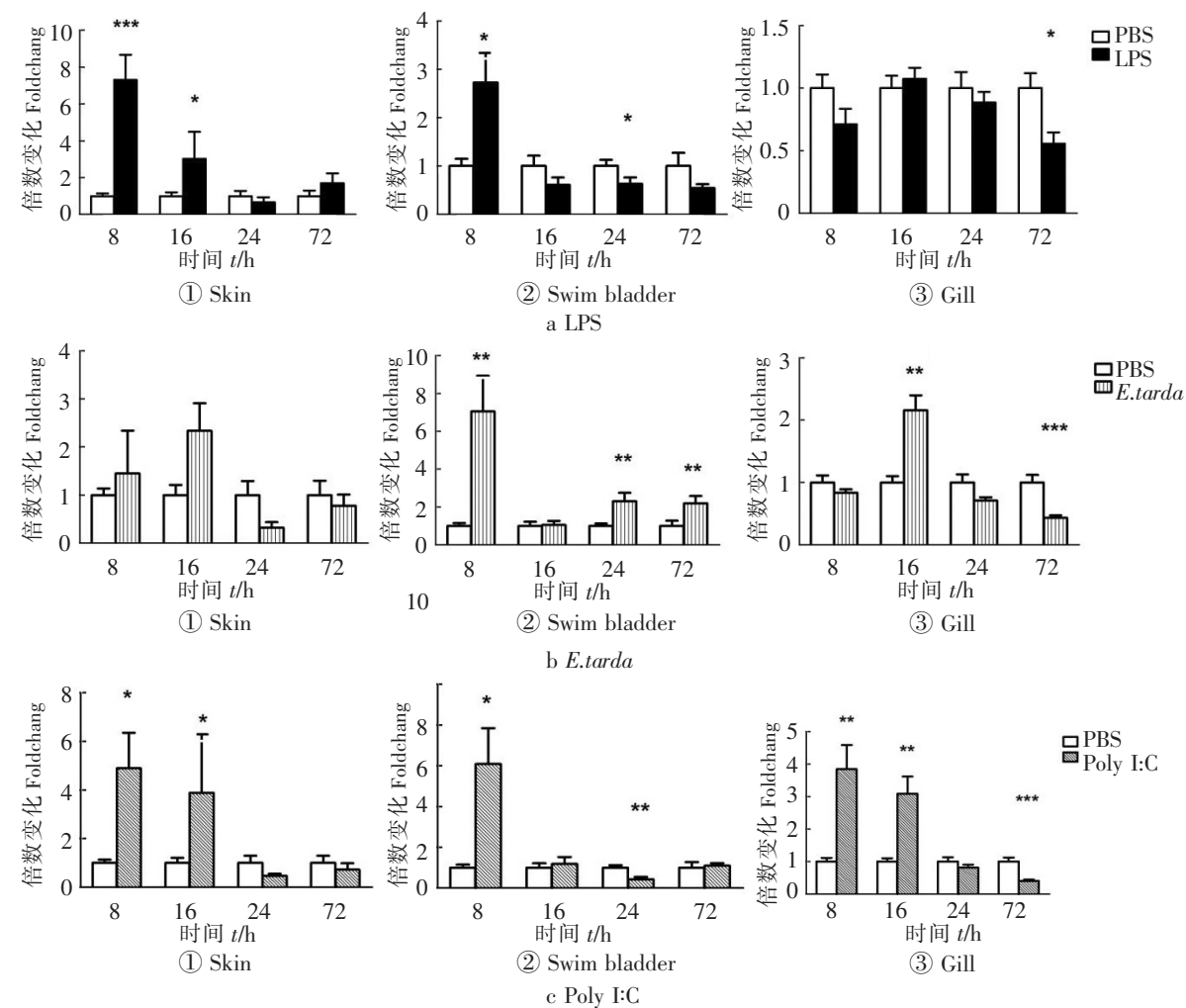


说明:用实时 PCR 法检测了 6 尾日本鳗鲡(12 个组织/尾)中 *AjCOX-2* mRNA 的表达水平.以 β -actin 作为内参比基因,结果用平均值 \pm 标准误差表示 ($n = 6$).条形图上方的不同字母表示的是不同组织之间的表达显著性差异($P < 0.05$).

Notes:The transcription expression of *AjCOX-2* in the twelve different tissues from six individual Japanese eel was determined by real-time PCR. Transcription levels were first calculated using a serial dilution of references in the same PCR run and expressed as 1000 times relative to that of β -actin. Data are shown as means \pm SEM. The expression levels between different tissue are statistically significant ($P < 0.05$) where letters over the bars are different.

图 4 *AjCOX-2* 在日本鳗鲡多组织中的表达谱

Fig.4 Expression profile of *AjCOX-2* in multiple tissues of *Anguilla japonica*



说明:日本鳗鲡腹腔内注射 LPS (0.1g/kg),*E. tarda* (10^5 cfu/g),Poly I:C (0.1g/kg),或它们的溶剂 PBS.在注射 8, 16, 24, 72 h 后分别随机选取 6 尾日本鳗鲡,分别采集鳃、皮肤和鳔用于基因的表达分析.表达的调节是通过计算刺激组鳗鲡的平均表达水平与同一时间的对照组的比值来表示.数据用 6 尾日本鳗鲡的平均数 \pm SEM 表示, $n=6$;通过 t 检验计算同一时间对照组与刺激组之间的 P 值,* 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$ 和 *** 表示 $P<0.001$,并标注于条形图上方.

Notes: Individual Japanese eel was intraperitoneal injected with LPS (0.1 g/kg),*E. tarda* (10^5 cfu/g),Poly I:C (0.1 g/kg),or PBS as vehicle.Six Japanese eels were randomly selected at 8,16,24, 72 h post-injection and gill, skin and swim bladder of each individual eel were collected for analysis the gene expression. The modulated expression was expressed as fold change calculated as the mean expression levels of stimulated eels divided by that of the time matched controls. Data are shown as means \pm SEM from six individual eels. P values were generated by t -tests between stimulated and time-matched control samples are shown above the bars. * $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$.

图 5 *AjCOX-2* 受 LPS、*E. tarda* 和 Poly I:C 诱导表达模式

Fig.5 Modulation of expression of *AjCOX-2* in skin,swim bladder and gill after intraperitoneal injection with LPS,*E. tarda* and Poly I:C

3 讨论

COX-2 是一种具有环氧化酶和过氧化酶活性的酶,参与发热、维持妊娠、调节离子运输、炎症反应、水平衡和止血等多种生物过程^[2]. 本研究克隆了日本鳗鲡的 *COX-2* (*AjCOX-2*) 全长 cDNA 序列,解析其分子特征并研究了其表达模式.

3.1 *AjCOX-2* 属于硬骨鱼 *COX-2a* 基因

哺乳类、鸟类和两栖类等高等脊椎动物体内仅存在一个 *COX-2* 基因,而在低等脊椎动物如硬骨鱼中,可能由于进化过程中选择性染色体区域的叠加作用,出现两个 *COX-2* 基因,即 *COX-2a* 与

COX-2b^[7]. 系统进化分析发现,本研究的 *AjCOX-2* 与其他硬骨鱼的 *COX-2a* 聚在同一簇,支持率为 100%;氨基酸序列多重比对的结果也支持 *AjCOX-2* 应归属于 *COX-2a*,其与美洲红点鲑 *COX-2a* 及虹鳟 *COX-2a* 的一致性及相似性都最高;此外, *AjCOX-2* 的第一个血红素结合域和 C 端的内质网滞留信号分别为 KALGH 与 TSEL,符合硬骨鱼 *COX-2a* 的“XXLGH”与“S (S/T) EL”,而明显不同于 *COX-2b* 的基序. 综上, *AjCOX-2* 应属于硬骨鱼 *COX-2a*.

3.2 *AjCOX-2* 基因的表达具有组织特异性

硬骨鱼 *COX-2* 基因的转录表达具有组织特异性. 在正常养殖的日本鳗鲡中, *AjCOX-2* 主要在鳃中高水平表达,该结果与其他硬骨鱼 *COX-2* 基因的转录表达结果基本一致. 比如,在塞内加尔鲷, *COX-2* 在睾丸、输卵管和鳃中高水平转录表达^[11];底鳉 *COX-2* 在鳃和肾脏中大量转录表达^[14];斑马鱼 *COX-2a* 在鳃、肠及睾丸中的高水平转录表达量,而 *COX-2b* 在鳃,心脏和卵巢中大量表达^[2]. 此外,有研究报道, *COX-2* 在硬骨鱼的卵巢/睾丸中高水平转录表达^[2,10-11]. 而本研究 *AjCOX-2* 在性腺中的转录表达量较低,原因可能是,前人报道的性腺高水平表达鱼类皆为性成熟的成鱼^[18-20],而本研究中所选择的日本鳗鲡虽然达到商品规格,但其性腺远未成熟. 然而, *AjCOX-2* 在性腺表达量水平较低是否真与鳗鲡的性腺不成熟有关,有待进一步研究. 此外,本研究发现 *AjCOX-2* 在鳃和皮肤中高水平转录表达,然而,有关 *COX-2* 基因在硬骨鱼的鳃中转录表达的研究报道甚少,因此,本研究发现的 *COX-2* 基因在鱼类鳃中高水平表达的现象,是日本鳗鲡特有,还是普遍存在于其他硬骨鱼中,有待进一步研究确认.

此外,本文还发现 *COX-2* 基因在日本鳗鲡的玻璃鳗阶段具有极高的转录表达水平,其表达量甚至是本研究日本鳗鲡黑仔鳗的鳃(转录水平最高的器官)的 1.5 倍(未发表数据). 分析原因,可能与玻璃鳗是从半咸水的河口中捕捞到的有关. 有研究发现海水养殖的鳟 *COX-2* 在鳃中的表达量比淡水养殖时高出了 3 倍,并且在淡水—海水和海水—淡水急性转移中会快速短暂地改变 *COX-2* 的表达量^[14]. *AjCOX-2* 是否参与氯化钠的调节,及其调控模式有待进一步研究.

3.3 外源刺激物调节 *AjCOX-2* 基因的转录表达

有研究发现,受 LPS 刺激后 6 h,金鱼头肾细胞中 *COX-2* 转录表达水平极显著上调;受 LPS 刺激后 6 h 虹鳟 *COX-2a* 在性腺细胞 RTG-2 中的 mRNA 表达也显著上调^[7];在 LPS 和重组 IL-1 β 诱导后 24 h 狼鲈 *COX-2* 在其头肾白细胞 mRNA 中的表达上调并达到最大值^[13];在鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染后 2 周, *COX-2* 基因在狼鲈的头肾白细胞中的表达达到了最大值,诱导后 3 周表达量下调^[13]. 这些结果与本研究相似, LPS 刺激后 8 h, *AjCOX-2* 在皮肤和鳃中的转录表达显著上调 ($P < 0.05$); Poly I:C 刺激后 8 h, *AjCOX-2* 在皮肤、鳃和鳃中均显著上调表达 ($P < 0.05$); *E. tarda* 刺激后 8 h, *AjCOX-2* 在鳃中的表达也极显著上调 ($P < 0.01$). 本研究表明, *AjCOX-2* 是对外来病原刺激的早期响应基因,参与机体抗外来刺激物的先天免疫应答.

[参 考 文 献]

- [1] KOLJAK R, JARVING I, KURG R, et al. The basis of prostaglandin synthesis in coral: molecular cloning and expression of a cyclooxygenase from the Arctic soft coral *Gersemia fruticosa* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(10): 7033-7040.
- [2] ISHIKAWA T O, GRIFFIN K J, BANERJEE U, et al. The zebrafish genome contains two inducible, functional cyclooxygenase-2 genes [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 352(1): 181-187.
- [3] KAWAMURA M, INAOKA H, OBATA S, et al. Why do a wide variety of animals retain multiple isoforms of cyclooxygenase? [J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 2014, 109-111: 14-22.
- [4] CHANDRASEKHARAN N, DAI H, ROOS K L T, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(21): 13926-13931.

- [5] GUPTA K, SELINSKY B S. Bacterial and algal orthologs of prostaglandin H2 synthase: novel insights into the evolution of an integral membrane protein [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2015, 1848(1): 83-94.
- [6] HAVIRD J C, MIYAMOTO M M, CHOE K P, et al. Gene duplications and losses within the cyclooxygenase family of teleosts and other chordates [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 25(11): 2349-2359.
- [7] ISHIKAWA T O, HERSCHMAN H R. Two inducible, functional cyclooxygenase-2 genes are present in the rainbow trout genome [J]. *Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 102(6): 1486-1492.
- [8] ZOU J, NEUMANN N, HOLLAND J, et al. Fish macrophages express a cyclooxygenase-2 homologue after activation [J]. *Biochemical Journal*, 1999, 340: 153-159.
- [9] DONG W, MATSUMURA F, KULLMAN S W. TCDD induced pericardial edema and relative COX-2 expression in medaka (*Oryzias latipes*) embryos [J]. *Toxicological Sciences*, 2010, 118(1): 213-223.
- [10] ROBERTS S B, LANGENAU D M, GOETZ F W. Cloning and characterization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 from the brook trout ovary [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2000, 160(1/2): 89-97.
- [11] NORAMBUENA F, MACKENZIE S, BELL J G, et al. Prostaglandin (F and E, 2-and 3-series) production and cyclooxygenase (COX-2) gene expression of wild and cultured broodstock of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 177(2): 256-262.
- [12] PATIÑO R, YOSHIKAWA G, BOLAMBA D, et al. Role of arachidonic acid and protein kinase C during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic croaker [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(2): 516-523.
- [13] BUONOCORE F, RANDELLI E, CASANI D, et al. cDNA cloning and expression analysis of a cyclooxygenase-2 from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after vaccination [J]. *Aquaculture*, 2005, 245(1/4): 301-310.
- [14] CHOE K P, HAVIRD J, ROSE R, et al. COX-2 in a euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*: primary sequence, distribution, localization, and potential function in gills during salinity acclimation [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(9): 1696-1708.
- [15] TERAOKA H, OKUNO Y, NIJOUKUBO D, et al. Involvement of COX-2 - thromboxane pathway in TCDD-induced pericardial edema in developing zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 154(1): 19-26.
- [16] 段利朋, 黄贝, 周立红 等. 拟穴青蟹两种新 C-型凝集素基因的克隆与表达分析 [J]. *水生生物学报*, 2015, 39(2): 315-324.
- [17] SIMMONS D L, BOTTING R M, HLA T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition [J]. *Pharmacological Reviews*, 2004, 56(3): 387-437.
- [18] SORENSEN P, GOETZ F. Pheromonal and reproductive function of F prostaglandins and their metabolites in teleost fish [J]. *Journal of Lipid Mediators*, 1992, 6(1/3): 385-393.
- [19] STACEY N, PANDEY S. Effects of indomethacin and prostaglandins on ovulation of goldfish [J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 1975, 9(4): 597-607.
- [20] SORBERA L A, ASTURIANO J F, CARRILLO M, et al. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(1): 382-389.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 张子平)