



论文

文昌鱼免疫防御相关组织、细胞及基因研究

林浴霜^{①†}, 陈冬艳^{②†}, 张伟^{①†}, 蔡召平^①, 陈忠科^①, 张宁^①, 毛炳宇^{③*}, 张红卫^{①*}

① 山东大学生命科学院, 实验畸形学教育部重点实验室, 山东省动物细胞与发育生物学重点实验室, 济南 250100;

② 南开大学医学院, 天津 300071;

③ 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: mao@mail.kiz.ac.cn; zhw@sdu.edu.cn

收稿日期: 2011-09-10; 接受日期: 2011-09-28

国家自然科学基金(批准号: 30570967, 30671072, 30700434)、山东省自然科学基金(批准号: Y2007D20)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2007CB815800, 2007CB947100)资助项目

摘要 文昌鱼不仅对于进化学的研究至关重要, 在比较免疫学研究中也是一种重要的模式生物. 研究文昌鱼免疫相关组织、细胞和基因对了解脊椎动物免疫防御系统的进化十分重要. 本文利用电子显微镜对文昌鱼免疫相关组织和细胞的超微结构进行了研究. 同时, 本文还采用原位杂交方法对文昌鱼中与脊椎动物免疫相关基因同源的基因 *TLR1*, *CIQ*, *ECSIT*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 的表达模式进行了研究. 结果显示, 在文昌鱼免疫防御过程中, 其表皮、腮和肠道上皮可能起重要作用; 在体腔和淋巴腔中存在的巨噬细胞可能是文昌鱼体内起重要免疫功能的细胞; *TLR1*, *CIQ*, *ECSIT*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 的表达模式说明这些基因可能在免疫防御过程中起作用.

关键词文昌鱼
表皮
消化道
巨噬细胞
免疫
进化

文昌鱼属于头索动物, 在进化地位上处于无脊椎动物和脊椎动物之间. 因此, 对于包括比较免疫学研究在内的许多生命科学领域中的研究而言, 文昌鱼都是一种极其重要的实验动物. 但目前, 对文昌鱼在比较免疫学领域的研究还有待进一步展开.

文昌鱼拥有脊索、背神经管、肌节以及咽腮区的鳃裂等脊椎动物的基本结构. 像其他脊索动物一样, 文昌鱼的身体表面覆盖着皮肤, 皮肤可以保护文昌鱼免受外界微生物的侵害, 并且在先天免疫防御中起重要作用. 文昌鱼的皮肤通常称为表皮, 由单层柱状上皮或假复状上皮以及覆盖其外的角质表皮构成. 已经通过电子显微镜技术发现文昌鱼 24 h 幼虫上皮

细胞具有内吞作用^[1]. 文昌鱼的另外一个主要的免疫器官是口后部连接的消化管(包括咽腮区和肠), 文昌鱼的肠上皮在文昌鱼抵御 LPS 刺激方面起着重要作用^[2].

文昌鱼体内有很多包含体腔和所谓淋巴腔的腔. 体腔被器官分隔为咽上体腔、脊索下体腔、腮体腔、肠体腔、围生殖腺体腔、内柱体腔、腹褶体腔等. 有研究^[3]认为, 淋巴腔与体腔不相通. 透射和扫描电子显微镜证实, 文昌鱼体内的重要免疫防御相关细胞包括体腔和淋巴腔中的巨噬细胞以及血管中少量的粒细胞^[4].

先前一直认为, 文昌鱼缺少获得性免疫系统. 但

是, Cannon 等人^[5]通过分子生物学手段发现了多个可变区域包含角质素结合蛋白(variable region-containing chitin binding proteins, VCBPs), 该蛋白家族代表了文昌鱼获得性免疫受体的核心结构. 同时由于佛罗里达文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)基因序列工作的进展, 一系列与脊索动物免疫防御相关基因的同源基因在文昌鱼中被发现^[6~10]. 虽然该领域有一些相关报道发表, 但为更好地了解脊椎动物免疫识别和免疫防御系统的起源, 需要对文昌鱼进行进一步的研究. TLRs 是一种重要的引发先天免疫反应的分子; ECSIT (evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways)是在 Toll/IL-1 信号转导途径中进化保守的一个中间分子; C1Q(complement component 1, q subcomponent)是在经典补体通路中的一种识别蛋白, 同时也是连接先天免疫和获得性免疫的一种重要分子; SoxC 家族成员 Sox4 在鼠胸腺 T 和前 B 淋巴细胞系中表达^[11]; DDAH 和 NOS(nitric oxide synthase gene)可以调节一氧化氮的合成, 而一氧化氮在脊椎动物体内是一种重要的免疫刺激分子, 同时也是一种具有复杂功能的信号分子^[12~14]. 因此, 本实验除了对文昌鱼表皮、腮上皮以及肠上皮的超微结构进行了研究外, 还对文昌鱼脊椎动物免疫相关基因 *TLR1* (toll-like receptor 1), *ECSIT*, *C1Q*, *SoxC*, *DDAHa* (dimethylarginine dimethylaminohydrolase a) 和 *NOS* 同源基因的表达进行了研究. 通过研究文昌鱼体内上述免疫相关分子和文昌鱼超微结构, 可以为更好地理解脊椎动物获得性免疫系统的进化提供依据.

1 材料与方法

1.1 文昌鱼的收集

性成熟的文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)由中国科学院海洋研究所张培军研究员和南京大学陈均远教授提供, 在实验室进行产卵受精和培养^[15]. 于不同的发育时期收集同步发育的胚胎和幼虫.

用于原位杂交的胚胎和幼虫用 4%多聚甲醛(0.1 mol/L MOPS, 1 mmol/L EGTA, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.5)常温固定 1 h, 于 70%乙醇-20℃保存.

1.2 电子显微镜样品制备与超微结构观察

用于透射电子显微镜(TEM)观察的成体和幼虫

的组织标本均切成 1~2 mm 小块, 立即置于 4%戊二醛(0.2 mol/L 二甲肿酸钠, pH 7.4)室温固定 2 h. 采用 1%锇酸后固定 1 h. 部分幼虫在滴加了胶质碳(由中国徽墨墨汁制备)的海水中培养 30 min 后取材固定. 经梯度酒精脱水后用 Epon812 包埋. 制半薄切片(1 μm 厚)观察定位, 然后制备超薄切片(0.05 μm). 超薄切片用乙酸双氧铀和柠檬酸铅双染色, 在透射电子显微镜 JEM-200CX 下观察, 检测细胞内吞碳颗粒的情况并拍照.

1.3 文昌鱼 *TLR1*, *ECSIT*, *C1Q*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 基因的克隆

为了获得原位杂交探针, 根据 NCBI 或 JGI 中的序列设计引物如下: *TLR1*(DQ400125: F: 5'-CACAGCATCGCAACAATCCC-3', R: 5'-CGCAGCCTCCTCCAGAACAG-3'); *ECSIT*(XM_002595374: F: 5'-GAGGCCATGTGGAGTTTATCTA-3', R: 5'-GGGGAAC-CAGTACAGGATACG-3'); *C1Q*(XM_002586916: F: 5'-TACAGGTCCACAAGGCCCA-3', R: 5'-AGAAGA-AACCCGGTGAAG-3'); *DDAHa*(DQ860841: F: 5'-ACTGGTGGAGGTTTGTATGTC-3', R: 5'-CCGCAAG-GAACTCGGAATGT-3'); *NOS*(AF396968: F: 5'-AGGAGGACGCCTGGTTGGTA-3', R: 5'-CGGGTGCCT-CATGTGAAGTAA-3')和 *SoxC*(FJ176301: F: 5'-CGTTTATGGTCTGGTCTCAGATC-3', R: 5'-GCTTTCT-TCACCTTTTTTCC-3'), 利用 PCR 得到相应序列, 克隆后制备地高辛标记探针.

1.4 原位杂交与组织切片的制备

按照说明书(Roche)制备地高辛标记的正义和反义 RNA 探针, 按照 Holland 等人^[16]的方法进行整体原位杂交. 杂交后的胚胎和幼虫首先用琼脂包埋, 然后制成腊块, 制备成 8 μm 连续组织切片. 成体文昌鱼制成 8 μm 厚的切片, 贴在载玻片(Fisher 公司)上. 经过脱腊处理; 梯度酒精复水; 置于 0.3% Triton X-100 溶液, 室温 15 min; 37℃蛋白酶 K 处理 20 min; 4℃ 4%多聚甲醛/PBS 固定 5 min; PBS 和含 0.25%乙酸酐的 0.1 mol/L 三乙醇胺溶液洗涤; 37℃预杂交液处理 2 h; 1 μg/mL 正义和反义探针于 50℃杂交过夜; 严格条件洗涤; 用碱性磷酸酶偶联的抗地高辛抗体处理切片; 最后利用 NBT/BCIP 进行显色.

1.5 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach)对文昌鱼 *TLR1*, *ECSIT*, *CIQ*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 基因表达的影响

利用注射器将悬浮有金黄色葡萄球菌的中性磷酸盐缓冲溶液(PBS)(实验组)和无菌 PBS 溶液(对照组)分别注射到文昌鱼腹腔中, 在适宜的条件下培养注射后文昌鱼 3 天, 分离文昌鱼消化道, 经无菌 PBS 反复冲洗后提取 RNA 并合成 cDNA, 利用 1.3 小节中的引物和 β -actin 引物(F: 5'-GGAAGAGAGAC-TCGGGGC-3'; R: 5'-CTCACAGAGCGTGGCTACAG-3')进行 RT-PCR, 检测 *TLR1*, *ECSIT*, *CIQ*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 的表达情况并进行量化分析。

2 结果

2.1 文昌鱼幼虫和成体表皮、腮和肠上皮以及巨噬细胞超微结构的研究

24 和 72 h 文昌鱼幼虫在含有胶质碳的海水中培养 30 min 后固定, 用透射电子显微镜观察。如图 1, 单层表皮细胞的细胞质中含有许多小泡, 这些小泡内含有不同电子致密度的物质。在位于表面细胞质膜下的一些小泡中可清晰地观察到示踪碳颗粒(图 1(A)和(B)), 细胞核位于细胞基底侧(图 1(A)和(B))。在两个相邻的表皮细胞之间可以看到典型的分隔连

接(septate junction), 但是未观察到紧密连接(图 1(C))。而且, 在细胞间隙中也发现了示踪碳颗粒(图 1(C))。这表明文昌鱼从幼虫阶段, 表皮细胞就具有内吞功能。

对于 48 和 72 h 文昌鱼幼虫分化中的腮细胞以及肠道上皮细胞的超微结构显示, 文昌鱼幼虫腮上皮细胞的主要特征是在细胞质膜上有大量朝向咽腔伸展的纤毛, 以及细胞质中存在发达的高尔基复合体(图 1(D))。新生的肠道上皮细胞呈短柱状, 其主要特征是含有大量的小泡, 这些小泡中大多含有电子致密度(electron-dense)较低的物质; 在细胞质中通常还能观察到大量的圆形或椭圆形线粒体、内质网以及游离的核糖体(图 1(E))。有趣的是, 在相邻的肠道上皮细胞间只有黏着连接(zonula adherens), 未见紧密连接或者分隔连接。文昌鱼幼虫肠道上皮中偶能观察到迁移中的细胞, 其细胞和细胞核形态不规则且可变, 显示出迁移的方向性; 细胞核内电子致密度较高且具明显的核仁(图 1(F)), 上述特征说明这些移动中的细胞很可能是单核游离细胞的前体细胞, 即粒细胞以及巨噬细胞的前体细胞。在文昌鱼幼虫或成体围生殖腺体腔内可观察到巨噬细胞, 它们具有不规则的外形和许多细胞质突。在巨噬细胞细胞质中有大量电子致密度不同的小泡、多泡体、溶酶体和吞噬小体(图 1(G))。

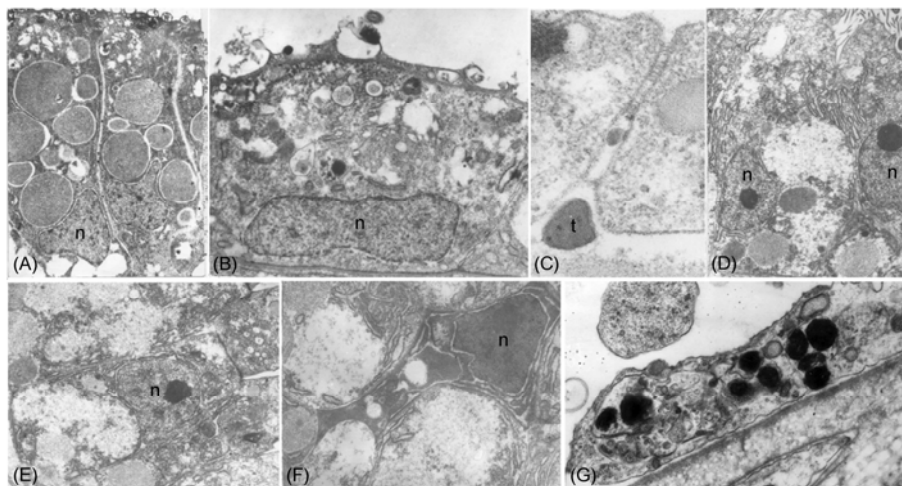


图 1 文昌鱼表皮细胞、腮细胞、肠道上皮细胞以及巨噬细胞的透射电子显微镜照片

(A)和(B) 分别显示 24 和 48 h 文昌鱼表皮细胞。很容易看到细胞表面质膜附近小泡中的示踪碳颗粒和内吞泡; (C) 36 和 48 h 幼虫期, 文昌鱼表皮细胞间隙中的示踪碳颗粒; (D) 48 h 文昌鱼幼虫腮上皮细胞; (E) 48 h 文昌鱼分化中的肠道上皮细胞; (F) 72 h 文昌鱼中肠道上皮内迁移中的细胞; (G) 围生殖腺体腔内巨噬细胞。n: 细胞核; t: 示踪碳颗粒。放大倍数: (A)×12300; (B)×155000; (C)~(E)×11000; (F)×8700; (G)×8500

2.2 文昌鱼免疫相关基因在表皮、腮上皮、肠道上皮以及巨噬细胞中的表达

分别检测了几个脊椎动物免疫防御相关基因在文昌鱼中的同源基因 *TLR1*, *SoxC*, *DDAHa*, *ECSIT*, *CIQ* 和 *NOS* 在表皮、腮上皮、肠道上皮以及巨噬细胞中的表达情况, 探讨这些基因在文昌鱼免疫防御中的作用. 文昌鱼 *TLR1*^[17], *SoxC*^[8] 和 *DDAHa*^[18] 分别与其在脊椎动物中同源基因的氨基酸序列具有高度一致性, *ECSIT*, *CIQ* 和 *NOS* 分别与它们脊椎动物中的同源基因氨基酸序列也具有 40% 以上的一致性.

文昌鱼 *TLR1* 在所有表皮细胞(图 2(A)), 肠道上皮细胞(图 2(B)), 以及腮瓣的所有纤毛上皮细胞中均

有表达(图 2(C)). 同时, *TLR1* 在位于文昌鱼体腔和淋巴腔中的巨噬细胞中也有表达(图 2(B)~(E)).

在腮部, *CIQ*, *ECSIT* 和 *SoxC* 基因的表达模式与 *TLR1* 相似, 在所有腮瓣纤毛上皮细胞、隔膜体腔(septal coelom)壁及体腔内巨噬细胞中表达(图 3(A)~(C)). *DDAHa* 和 *NOS* 在腮部细胞中有表达, 但在侧部的纤毛上皮细胞中未见表达(图 3(D)和(E)). 与 *TLR1* 相似, 所有检测的基因都在肠上皮细胞以及围肠体腔内巨噬细胞中表达(图 3(G)~(K)). 就像 *TLR1* 一样, *DDAHa* 在所有表皮细胞中均有表达, 而其他上述提到的基因主要在腹褶处上皮细胞中表达(图 3(M)~(Q)).

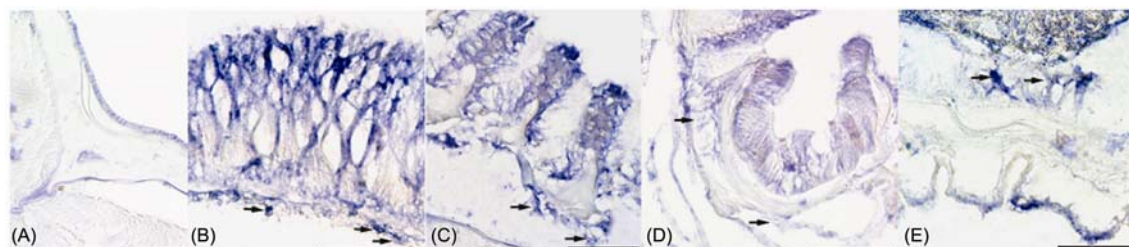


图 2 原位杂交显示文昌鱼 *TLR1* 基因在表皮、腮上皮、肠道上皮以及巨噬细胞中的表达

(A) 显示在脊索附近表皮细胞中表达的 *TLR1*; (B) 肠上皮细胞中 *TLR1* 的表达及肠体腔内巨噬细胞的表达(箭头所示); (C) 腮上皮细胞中 *TLR1* 的表达及腮体腔内巨噬细胞中的表达(箭头所示); (D) 内柱上皮细胞中 *TLR1* 的表达及在淋巴腔中巨噬细胞的表达(箭头所示); (E) 腹褶和围生殖腺体腔内巨噬细胞中的表达(箭头所示). 标尺: 50 μm

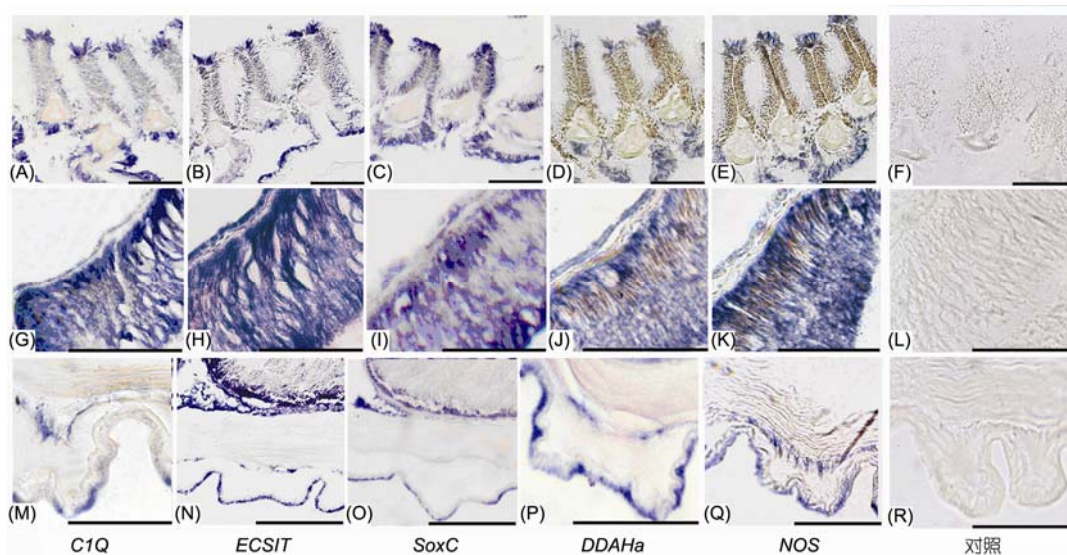


图 3 原位杂交显示文昌鱼 *CIQ*, *ECSIT*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 基因的表达

(A)~(E) 原位杂交显示文昌鱼腮上皮细胞以及腮体腔内巨噬细胞中 *CIQ*, *ECSIT*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 的表达; (G)~(K) 文昌鱼肠道上皮细胞及围肠体腔内巨噬细胞中 *CIQ*, *ECSIT*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 的表达; (M)~(Q) 文昌鱼腹褶上皮细胞及腹褶体腔内巨噬细胞中 *CIQ*, *ECSIT*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 的表达; (F), (L)和(R) 分别显示用 *DDAHa* 正义探针制作的对照组原位杂交. 标尺: (A)~(L) 50 μm; (M)~(R) 25 μm

表 1 RT-PCR 检测 *ECSIT*, *TLR*, *CIQ*, *DDAHa*, *SoxC* 和 *NOS* 表达情况^{a)}

	<i>ECSIT</i>	<i>TLR1</i>	<i>CIQ</i>	<i>DDAHa</i>	<i>NOS</i>	<i>SoxC</i>
金黄色葡萄球菌注射后基因表达变化	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑	—	↓

a) ↑ 数量表示注射黄色葡萄球菌后该基因表达上调程度; — 表示没有明显变化; ↓ 表示注射后基因表达下调

2.3 金黄色葡萄球菌对文昌鱼 *TLR1*, *ECSIT*, *CIQ*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 基因表达的影响

根据 RT-PCR 检测结果进行量化分析显示, 在受到金黄色葡萄球菌感染后, 几个与免疫防御密切相关的基因的表达与对照组相比发生了改变: *ECSIT*, *TLR1*, *CIQ* 的表达有明显提高; 而 *DDAHa* 变化很小, 只是略有升高; *NOS* 基因的表达基本没有受到影响; *SoxC* 的表达比较特殊, 感染组的表达相对于对照组有所下调。

3 讨论

皮肤的重要功能之一是防止外界病原菌的入侵。早期的研究^[19]发现, 文昌鱼表皮可以分泌凝集素以及抗菌多肽参与免疫防御。本实验室先前报道^[1]及本研究中透射电子显微镜观察的结果显示, 发育到 24 h 以后的文昌鱼表皮细胞具有典型的形态学特征, 如细胞质膜附近的内吞泡以及细胞质顶部的内吞颗粒。另外, 发现示踪碳颗粒出现在表皮细胞细胞间隙中。上述结果显示, 文昌鱼幼虫表皮细胞具有内吞能力。在表皮细胞中含电子致密度较低物质的小泡很可能是参与分泌凝集素及其他抗菌肽的分泌泡。另外, 原位杂交实验结果显示, 文昌鱼表皮细胞中 *TLR1* 的表达与人类皮肤角化细胞中 *TLRs* 的表达相似, 在角化细胞中 *TLR* 的表达与人类皮肤抵抗微生物入侵有关^[20]。本结果显示, 脊椎动物免疫防御相关基因在文昌鱼中的同源基因, 如 *CIQ*, *ECSIT*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 都在表皮中表达, 说明文昌鱼表皮可能在免疫防御过程中起重要作用。

免疫系统分为先天免疫和获得性免疫, *TLRs* 在免疫识别和诱导免疫防御过程中起重要作用。免疫细胞, 如巨噬细胞、树突状细胞及 B 淋巴细胞等都是通过 *TLRs* 识别病原微生物。微生物的入侵刺激 *TLRs*, 激活了先天免疫。在某些情况下, 通过 *TLRs* 激活抗原递呈细胞(APCs), 进而提高细胞内一氧化氮的含量, 引起获得性免疫防御^[21]。*ECSIT* 是 BMP 和 TLR

信号通路中的一个调节因子。补体系统成员之一 *CIQ* 是经典补系统中的一个识别蛋白, 可以同时参与先天免疫和获得性免疫防御。*SoxC* 参与了淋巴细胞的成熟, 在巨噬细胞存在的位置表达^[11]。*DDAHa* 和 *NOS* 参与了内源一氧化氮合成的调节^[22], 而一氧化氮同样参与了先天免疫和获得性免疫防御。当金黄色葡萄球菌感染文昌鱼后, 发现 *ECSIT*, *TLR* 和 *CIQ* 的表达明显提高, 说明这 3 个基因在文昌鱼进行免疫防御过程中有较明显的作用; 而 *DDAHa* 变化很小, 只是略有升高, 说明受到免疫刺激会影响该基因的表达; *NOS* 基因在注射组和对照组中的表达基本没有变化, 这可能是由于免疫刺激对于 *NOS* 表达的直接影响不大; *SoxC* 的表达比较有趣, 注射组的表达相对于对照组下调, 提示该基因在免疫防御过程中的作用方式可能与上述基因有明显不同。另外, 本研究观察了这些在脊椎动物中参与免疫防御的基因在文昌鱼中的同源基因的表达情况。与 *TLR1* 表达情况相似, *CIQ*, *ECSIT*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 在文昌鱼腮和肠道上皮中有表达, 说明文昌鱼除表皮外, 包括腮和肠道在内的整个消化道也是免疫防御相关组织。先前研究表明, *VCBPs* 家族蛋白基因——*VCBP1*, 在文昌鱼的消化道表达^[5]。文昌鱼 *TLR1* 同样在其肠道和腮中表达, 这暗示文昌鱼的消化道可能是主要的免疫系统相关组织。通过透射电子显微镜观察到文昌鱼幼虫分化的消化道上皮中有单核细胞、粒细胞或巨噬细胞的前体细胞。同时观察到脊椎动物免疫防御相关基因 *TLR1*, *CIQ*, *ECSIT*, *SoxC*, *DDAHa* 和 *NOS* 的文昌鱼同源基因在巨噬细胞中表达, 表明在文昌鱼中巨噬细胞可能是起关键免疫作用的细胞。

在文昌鱼中, 许多淋巴相关基因, 如 *Ikaros-like* 和 *Bam32*(B lymphocyte adaptor molecule of 32 kD)^[23] 在腹褶和肠道上皮中表达(表 2)。另外一些基因也在免疫相关组织(表皮和整个消化道)及免疫相关细胞(巨噬细胞)中表达, 这暗示所有这些基因可能在文昌鱼免疫防御系统中起作用。

本研究报道了文昌鱼幼虫的表皮、腮上皮和肠道

表 2 免疫防御相关基因在文昌鱼中同源基因表达模式比较

	体腔中巨噬细胞	腹褶上皮细胞	咽部上皮细胞	肠上皮
<i>TLR</i>	+	+	+	+
<i>ECSIT</i>	+	+	+	+
<i>CIQ</i>	+	+	+	+
<i>SoxC</i>	+	+	+	+
<i>DDAHa</i>	+	+	+	+
<i>NOS</i>	+	+	+	+
<i>Thymosin $\beta 4$</i> ^[24]			+	+
<i>Ikaros-like gene</i> ^[23]			+	
<i>Bam32</i> ^[23]	+	+		
<i>VCBP</i> ^[5]				+

上皮的超微结构特征, 分析了在脊椎动物免疫系统中起作用基因的同源基因在文昌鱼中的表达模式. 结果提示, 文昌鱼表皮和消化道在免疫防御中起重要作用; 在体腔和淋巴隙中的巨噬细胞可能是文昌鱼中起免疫防御功能的关键细胞; *TLR1*, *CIQ*, *ECSIT*,

SoxC 和 *DDAHa* 的表达模式及受到免疫刺激后表达的变化情况显示, 这些基因可能在文昌鱼免疫防御系统中起作用. 这些数据可以为更好地理解文昌鱼的免疫系统以及原始获得性免疫系统的进化过程提供依据.

参考文献

1 Mao B Y, Sun X Y, Zhang H W, et al. Morphological and functional studies on the epidermal cells of amphioxus (*Branchiostoma Belcheri Tsingtauense*) at different developmental stges. Chin J Oceanol Limnol, 1997, 15: 236–241

2 Liu Z, Sun Y, Liu N, et al. Characterization, expression, and response to stress of *p8* gene in amphioxus. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27: 407–413

3 Kampmeier O F. Evolution and comparative morphology of the lymphatic system. Springfield Ill Thomas, 1969. 160–180

4 Zhang H W, Huang Z, Yamaguchi K, et al. Granulocytes and macrophages in amphioxus. Zool Sci, 1992, 9: 113–118

5 Cannon J P, Haire R N, Litman G W. Litman, identification of diversified genes that contain immunoglobulin-like variable regions in a protochordate. Nat Immunol, 2002, 3: 1200–1207

6 Dishaw L J, Ota T, Mueller M G, et al. The basis for haplotype complexity in VCBPs, an immune-type receptor in amphioxus. Immunogenetics, 2010, 62: 623–631

7 Han Y, Huang G, Zhang Q, et al. The primitive immune system of amphioxus provides insights into the ancestral structure of the vertebrate immune system. Dev Comp Immunol, 2010, 34: 791–796

8 林浴霜, 陈冬艳, 范秋声, 等. 关于青岛文昌鱼 *SoxB2* 和 *SoxC* 基因的研究: 进化保守性分析. 中国科学: 生命科学, 2009, 39: 469–478

9 Pang Q, Zhang S, Zhao B. Immune parameters in the humoral fluids of amphioxus *Branchiostoma belcheri* challenged with *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28: 232–234

10 Yuan S, Liu T, Huang S, et al. Genomic and functional uniqueness of the TNF receptor-associated factor gene family in amphioxus, the basal chordate. J Immunol, 2009, 183: 4560–4568

11 van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, et al. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. Embo J, 1993, 12: 3847–3854

12 Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. Nat Immunol, 2001, 2: 907–916

13 MacAllister R J, Parry H, Kimoto M, et al. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Br J Pharmacol, 1996, 119: 1533–1540

14 Wilcken D E, Sim A S, Wang J, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. Mol Genet Metab, 2007, 91: 309–317

15 Tung T C, Wu S C, Tung Y F. The development of isolated blastomeres of Amphioxus. Sci Sin, 1958, 7: 1280–1319

- 16 Holland L Z, Schubert M, Kozmik Z, et al. *AmphiPax3/7*, an amphioxus paired box gene: insights into chordate myogenesis, neurogenesis, and the possible evolutionary precursor of definitive vertebrate neural crest. *Evol Dev*, 1999, 1: 153–165
- 17 Yuan S, Huang S, Zhang W, et al. An amphioxus TLR with dynamic embryonic expression pattern responses to pathogens and activates NF-kappaB pathway via MyD88. *Mol Immunol*, 2009, 46: 2348–2356
- 18 Chen D, Lin Y, Zhang H. Characterization and expression of two amphioxus *DDAH* genes originating from an amphioxus-specific gene duplication. *Gene*, 2008, 410: 75–81
- 19 Bevins C L, Zasloff M. Peptides from frog skin. *Annu Rev Biochem*, 1990, 59: 395–414
- 20 Kollisch G, Kalali B N, Voelcker V, et al. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*, 2005, 114: 531–541
- 21 Majewska M, Szczepanik M. The role of Toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2006, 60: 52–63
- 22 Palm F, Onozato M L, Luo Z, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293: 3227–3245
- 23 Huang G, Xie X, Han Y, et al. The identification of lymphocyte-like cells and lymphoid-related genes in amphioxus indicates the twilight for the emergence of adaptive immune system. *PLoS One*, 2007, 2: e206
- 24 Huang X, Zhang W, Zhang H. Phylogenetic analysis and developmental expression of thymosin-beta4 gene in amphioxus. *Dev Genes Evol*, 2005, 215: 364–368