

doi: 10.7541/2023.2022.0234

虹鳟补体活化调节因子CD46的分子特征及功能

梁佳欣 马自有 李文硕 王 鹏 田 丁 刘安琪 张永安 张旭杰

(华中农业大学水产学院, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 为进一步研究硬骨鱼类中补体活化调节因子的分子特征和功能, 研究克隆了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的CD46基因, 对其分子特征进行了系统分析, 结果显示: 虹鳟CD46基因由10个外显子和9个内含子组成, cDNA序列全长2812 bp, 编码317个氨基酸, 蛋白序列由1个信号肽、4个SCR结构域、1个跨膜区和1个胞内区组成, 预测分子量为33.9 kD。基因组共线性分析显示, 虹鳟CD46基因位于16号染色体, 其基因座在脊椎动物中具有保守的共线性。组织和白细胞亚群表达分析显示, 虹鳟CD46基因在各种组织和白细胞亚群中均有表达。为了进一步阐明虹鳟CD46的免疫功能, 研究原核表达纯化了标签蛋白GST和融合蛋白GST-CD46。溶血活性实验表明, 与GST相比, GST-CD46能够显著抑制虹鳟血清对兔红细胞的溶血活性, 且呈现剂量依赖效应, 表明虹鳟CD46是补体活化的调节因子。此外, 研究用HEK293T细胞过表达了GFP和GFP-CD46。细胞损伤实验显示, 与GFP相比, GFP-CD46能够显著抑制虹鳟血清对HEK293T细胞的损伤, 进一步表明虹鳟CD46是补体活化的调节因子, 能够保护细胞免受补体系统的损伤。总之, 研究不仅增加了对虹鳟CD46的分子特征和功能的认知, 还为深入研究此分子的免疫功能及其在抗病免疫中的应用提供了理论基础。

关键词: CD46; 补体; 调节因子; 虹鳟

中图分类号: Q344⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)08-1269-09



补体系统是动物体内一种古老的先天防御系统, 最早可追溯到腔肠动物, 比如珊瑚(*Coral*)^[1]。关于补体系统的研究目前主要集中在哺乳动物, 然而, 与哺乳动物一样, 硬骨鱼类也具有完整的补体系统, 包括补体模式识别分子、蛋白酶、受体和调节因子等^[2]。补体系统通过三种途径来激活, 包括经典途径、旁路途径和凝集素途径, 从而实现免疫效应^[3]。然而, 如果补体系统过度活化, 则会使宿主细胞受损, 从而导致自身免疫病^[4]。因此, 为了防止补体系统过度活化, 机体内存在许多补体调节因子以调控补体系统活化过程^[3, 5]。到目前为止, 对硬骨鱼类补体系统的研究主要集中在补体系统的活化, 而对补体系统活化的调控研究则少之又少。

CD46, 又名膜辅助蛋白(Membrane cofactor protein, MCP), 是补体活化调节因子(Regulator of complement activation, RCA)家族的成员^[6]。作为机体重要的补体活化调节因子, CD46分布于几乎所有

细胞, 包括T淋巴细胞、B淋巴细胞、粒细胞、单核细胞和内皮细胞等^[7]。人的CD46分子由4个SCR (Short consensus repeat)结构域, 1个富含丝氨酸/苏氨酸/脯氨酸的区域(STP), 1个跨膜区和1个胞内区构成^[8]。CD46能充当补体因子I(Factor I, FI)的辅助因子, 水解结合在宿主细胞上的C3b和C4b, 从而阻碍膜攻击复合物(Membrane attack complex, MAC)的形成, 阻止补体系统对机体细胞的损伤^[9]。除了补体活化调节功能, CD46还具有多种其他生物学功能, 如CD46能影响T细胞的增殖与分化, CD46可通过与T细胞受体(T cell receptor, TCR)结合, 触发关键信号分子的磷酸化^[10, 11], 从而影响T细胞的增殖^[10, 12]。在一些病原相关研究中, CD46被证明能作为某些病原的受体, 影响病原的感染进程, 如麻疹病毒能与宿主细胞表面的CD46结合, 以逃避宿主免疫系统的攻击^[9]。在大鼠(*Rattus Norvegicus*)、小鼠(*Mus Musculus*)^[13]和豚鼠(*Cavia Porcellus*)^[14]

收稿日期: 2022-05-31; **修订日期:** 2022-08-24

基金项目: 国家自然科学基金(31602184); 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2018YFD0900505)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31602184); the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900505)]

作者简介: 梁佳欣(2001—), 女, 本科生; 主要从事鱼类免疫学研究。E-mail: jiaxinliang@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 张旭杰(1986—), 男, 副教授; 主要从事鱼类免疫学及病害防控研究。E-mail: xujiezhang@mail.hzau.edu.cn

中的研究发现,其 $CD46$ 基因优先在睾丸中表达,这样的独特表达现象表明,这些物种中的 $CD46$ 不仅能作为补体调节因子发挥作用,还可能在受精或生殖中具有特殊的功能。总之, $CD46$ 对于机体的正常运行有着重要的生物学意义。

尽管人们对四足动物尤其是哺乳动物的 $CD46$ 进行了广泛的研究^[15],然而对硬骨鱼类 $CD46$ 的研究起步很晚且尚有很多未解之谜。目前仅在鲤(*Cyprinus carpi*)、半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)和香鱼(*Plecoglossus altivelis*)中对 $CD46$ 展开了一定的研究,发现鲤 $CD46$ -like基因在组织中广泛表达,且 $CD46$ -like分子对补体系统的活化具有调控功能^[16];发现半滑舌鲷 $CD46$ 分子通过与FI相互作用从而对补体系统的活化进行调控,保护宿主细胞免受补体的损伤^[17];发现香鱼 $CD46$ 存在3种异构体,3种异构体都含有4个SCR结构域,都能防止外周血单核细胞免受补体的损伤^[18]。那么, $CD46$ 在其他鱼类中,尤其是在冷水鱼类中是否具有保守的分子特征和免疫功能?为了解答此科学问题,本研究以我国养殖范围最广,养殖量最大的冷水鱼虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[19]作为研究对象,克隆了虹鳟的 $CD46$ 基因,对虹鳟 $CD46$ 的分子特征进行了系统分析,并对其补体活化调节功能进行了研究。相关结果为深入研究虹鳟 $CD46$ 的免疫功能及其在抗病免疫中的应用提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

虹鳟购自都江堰新联养殖场,鱼体健康,体重(150±20) g。实验前已在华中农业大学水产学院水产养殖基地的养殖系统内饲养2周,养殖系统拥有恒温控水系统。

1.2 引物设计与合成

根据GenBank上已提交的虹鳟 $CD46$ 基因的cDNA序列(登录号: AJ620464.1),利用Primer 5.0软件设计了所需引物,其中下划线为限制性核酸内切酶的酶切位点,引物由武汉擎科生物技术有限公司合成。引物序列见表1。

1.3 虹鳟 $CD46$ 的生物信息学分析

虹鳟 $CD46$ 的信号肽、功能域和跨膜区分别由在线软件SignalP 5.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)、SMART (<http://smart.embl.de/>)和TMHMM Server 2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)预测。虹鳟 $CD46$ 的外显子(Exon)、内含子(Intron)和非翻译区(Untranslated region, UTR)由cDNA和基因序列

表1 PCR扩增引物

Tab. 1 Primers used for PCR amplification

引物Primers	序列Sequence (5'—3')	用途Application
<i>pGEX-CD46-F</i>	CGCGGATCCCAAGAATGCTC CAAACCCATAG	原核表达
<i>pGEX-CD46-R</i>	CCGCTCGAGCTATTTCATG TGTGGTTGTTGGC	
<i>CD46-qF</i>	CTGTTACCTGTGACACTGGC TA	荧光定量PCR
<i>CD46-qR</i>	CTCAACAACAGGAGCAGGA CAT	
<i>EF1a-qF</i>	CAAGGATATCCGTCGTGGCA	荧光定量PCR
<i>EF1a-qR</i>	ACAGCGAAACGACCAAGAG	
<i>pEGFP-CD46-F</i>	CCCAAGCTTCGATGCTGCCT TCTAAAT	真核表达
<i>pEGFP-CD46-R</i>	CGCGGATCCAGGCAAGTAA GACGACC	

的比对确定。虹鳟和代表动物 $CD46$ 的基因座通过BLAST程序比对cDNA和基因组序列确定。氨基酸的多序列比对由程序ClustalX(version 3.0)完成。系统发育分析采用邻接法(NJ)由软件MEGA 6.06完成。

所用序列的GenBank登录号如下: Human $CD46$ (S51940.1); Human C4BPA (NM_000715.4); Human F13B (NM_001994.3); Human CR1 (NM_000651.6); Human FH (NM_000143.4); Human CR2 (NM_001006658.3); Human DAF (NM_000574.5); Chicken CRES (NM_001033642.2); Chicken CREM (NM_204387.3); Mouse C4BPA (NM_007576.3); Mouse $CD46$ (NM_010778.4); Mouse CRRY (NM_013499.2); Mouse F13B (NM_031164.2); Mouse FH (NP_034018.2); Mouse DAF (NR_175896.1); Mouse CR2 (NM_001368765.1); Rat CRRY (NM_019301.2); Rat $CD46$ (NM_019190.1); Rat C4BPA (NM_012516.2); Rat CR2 (NM_001105989.2); Rat F13B (NM_001105956.1); Rat FH (NM_017005.2); Rat DAF (XM_008769498.3); Chicken CREG (NM_001033643.1); Chicken CR1 (XM_015280699.4); Chicken DAF (NG_007465.1); Chicken FH (NM_001006382.2); Tongue sole $CD46$ (XM_008315445.3); Western clawed frog ARC (XM_004918927.3); Western clawed frog ARC2 (NM_001162857.1); Western clawed frog ARC3 (NM_001127127.1); Western clawed frog FH (XM_002935816.5); Zebrafish FH (NM_200963.1); Channel catfish CRC1 (XP_047016397.1); Channel catfish CRC2 (XP_017318243.1); Rainbow trout $CD46$ (AJ620466.1); Rainbow trout FH (XM_036972049.1); Common carp $CD46$, (AB723858); Ayu $CD46$, (MN944399)。

1.4 pGEX- $CD46$ 原核表达载体的构建

使用pGEX- $CD46$ -F和pGEX- $CD46$ -R为引物对,

按照以下程序扩增编码虹鳟CD46的胞外区(信号肽除外)的cDNA序列: 95℃预变性6min; 95℃变性30s, 60℃退火30s, 72℃延伸1min, 共38个循环; 72℃延伸7min。将扩增后的PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳分离, 目的片段用胶回收试剂盒(MAGEN)回收、纯化。将CD46的PCR产物和pGEX-6p-1质粒用限制性核酸内切酶Hind III和Xho I进行双酶切1h, 然后用琼脂糖凝胶电泳分离并回收酶切产物。采用T₄ DNA连接酶(TaKaRa)将酶切产物在22℃连接50min, 转化感受态细胞DH5 α , 筛选阳性克隆并送武汉擎科生物技术有限公司测序。

1.5 pEGFP-CD46真核表达载体的构建

使用pEGFP-CD46-F和pEGFP-CD46-R为引物对, 按照以下程序扩增编码虹鳟CD46的cDNA序列: 95℃预变性6min; 95℃变性30s, 60℃退火30s, 72℃延伸1min, 共38个循环; 72℃延伸7min。将扩增后的PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳分离, 目的片段使用胶回收试剂盒(MAGEN)回收、纯化。将CD46的PCR产物和pEGFP-N1质粒用限制性核酸内切酶BamH I和Hind III进行双酶切1h, 然后用琼脂糖凝胶电泳分离并回收酶切产物。采用T₄ DNA连接酶(TaKaRa)将酶切产物在22℃连接50min, 转化感受态细胞DH5 α , 筛选阳性克隆并送武汉擎科生物技术有限公司测序。

1.6 GST-CD46重组蛋白的表达和纯化

将测序正确的重组表达质粒pGEX-CD46转化至大肠杆菌Rosetta感受态细胞(YouBio)中, 挑选阳性克隆, 接种到含氨苄的LB培养基中, 在37℃扩大培养, 随后加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG, 在28℃诱导3h。收集并破碎菌液后, 分别收集上清液和沉淀进行SDS-PAGE分析。电泳结果显示重组蛋白在上清液和包涵体中均有表达, 且在上清液中表达量更多(数据未显示), 因此本研究选择纯化上清液中的GST-CD46重组蛋白。首先向上清液中加入适量纯化树脂(Glutathione Sepharose 4B resin; Amersham Biosciences), 4℃旋转孵育2h, 随后用PBS充分洗涤杂蛋白, 最后用洗脱液洗脱下目的蛋白并收集, SDS-PAGE检测纯化蛋白的纯度。蛋白样品放入-80℃中保存备用。

1.7 虹鳟组织中CD46基因的表达分析

虹鳟组织样品的取样、RNA的提取和cDNA的合成 取6尾健康虹鳟, 麻醉后依次取脾脏、头肾、肠、皮肤、鳃、肝、肌肉、心脏和脑组织。TRIzol(Invitrogen)中匀浆各组织, 按照说明书提取并检测总RNA, 使用Prime Script RT试剂盒(TaKaRa)将RNA反转录为cDNA, -20℃保存备用。

荧光定量PCR检测CD46基因的表达 以合成的cDNA为模板, EF-1 α 为内参基因, 使用表1中的引物进行荧光定量PCR扩增。反应在荧光定量PCR仪(Bio-Rad)中进行, 反应体系参照SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa)说明书, 反应程序如下: 95℃, 3min; 95℃, 10s; 60℃, 30s; 45个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算虹鳟CD46基因在各组织中的表达量, 并使用Graphpad Prism 6.0软件作图。

1.8 虹鳟白细胞亚群中CD46基因的表达分析

头肾白细胞(Head kidney leukocytes, HKLs)的分离及细胞亚群的分选 麻醉实验用虹鳟, 取头肾组织, 解离为细胞悬液, 用40 μ m孔径的细胞滤网过滤细胞, 采用51%/34%的不连续Percoll(GE Healthcare)密度梯度分离头肾白细胞。在4℃条件下, 用小鼠抗虹鳟IgM和小鼠抗虹鳟IgT单克隆抗体(各1 μ g/mL)对HKLs进行双重染色30min, 二抗分别使用APC山羊抗小鼠IgG1(Jackson Scientific)和PE山羊抗小鼠IgG2b(Jackson Scientific)。孵育并洗涤完毕后, 用流式细胞仪(BD FACS Aria[™] III; BD Biosciences)分选出IgM⁺B细胞(IgM⁺B)、IgT⁺B细胞(IgT⁺B)、IgM⁻IgT⁻淋巴细胞(Double negative lymphocytes, DN Lym)和髓样细胞(Myeloid cells, Mye)。使用RNeasy mini试剂盒(Qiagen)提取分选细胞的总RNA, 使用Prime Script RT试剂盒(TaKaRa)将RNA反转录为cDNA。

荧光定量PCR检测CD46基因的表达 通过荧光定量PCR检测IgM⁺B细胞、IgT⁺B细胞、IgM⁻IgT⁻淋巴细胞及髓样细胞中CD46基因的表达量, 方法同1.7。

1.9 溶血活性实验研究虹鳟CD46对补体活化的调控功能

麻醉实验用虹鳟, 尾静脉采血, 血液在4℃下静置4h后3000 $\times$ g离心20min, 吸取上层血清。将1%的兔红细胞(鸿泉生物)于400 $\times$ g离心后用20 nmol/L硫酸镁1:50重悬, 重悬后的兔红细胞与虹鳟血清1:1混合, 设置4组实验: 加入PBS的正常血清(Normal serum)与兔红细胞混合、加入GST的正常血清与兔红细胞混合、加入GST-CD46的正常血清与兔红细胞混合、热灭活血清(Inactivated serum)与兔红细胞混合。其中血清在50℃水浴30min进行灭活, GST设置终浓度为80 μ g/mL, GST-CD46设置终浓度梯度为40、80和160 μ g/mL。将混合液在22℃水浴30min, 400 $\times$ g离心, 取上清液, 用酶标仪(EPOCH2, Bio-Tek)在405 nm处检测吸光值。

1.10 细胞损伤实验研究虹鳟CD46对补体活化的调控功能

细胞转染 用胰酶消化HEK293T细胞并离

心, 使用DMEM培养基重悬细胞并计数, 均匀地加入12孔细胞培养板中, 待细胞生长至70%—80%时, 将2 μ g的pEGFP-N1和pEGFP-CD46质粒分别在Opti-MEM培养基(Invitrogen)中与TransIntro™ EL Transfection Reagent (TransGen Biotech)混匀, 室温孵育20min, 再将混合液转入对应的细胞孔中孵育, 6h后换为含有5%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基继续培养。

流式细胞术检测细胞损伤 将转染24h后的HEK293T细胞重悬, 调整浓度为 1×10^6 细胞/mL。在22℃下, 将稀释一倍的虹鳟血清与HEK293T细胞1:1孵育60min, 将未经血清处理的HEK293T细胞用作空白对照, 将血清处理的空白HEK293T细胞用作阴性对照。孵育完成后使用碘化丙啶(PI; Biosharp)

染色15min, 通过流式细胞术分析细胞的损伤情况, 并使用FlowJo 10软件进行数据分析。

2 结果

2.1 虹鳟CD46的分子特征

虹鳟CD46基因由10个外显子和9个内含子组成, 其cDNA序列全长2812 bp, 编码317个氨基酸(图1)。CD46的蛋白序列由1个信号肽、4个SCR结构域、1个跨膜区和1个胞内区组成, 预测分子量为33.9 kD。基因组共线性分析显示(图2), 虹鳟CD46基因位于16号染色体, 其基因座在脊椎动物中具有保守的共线性。多序列比对显示, 脊椎动物CD46的结构域较为保守, 然而, 与人CD46相比, 虹鳟CD46的STP区域要短得多, 区域内丝氨酸/苏氨酸/脯氨酸

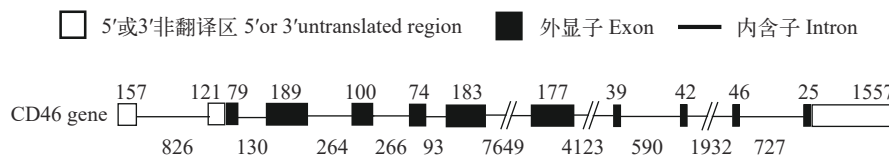


图1 虹鳟CD46基因的基因结构

Fig. 1 The gene structure of rainbow trout CD46

数字代表核苷酸的数量

Numbers represent the number of nucleotides

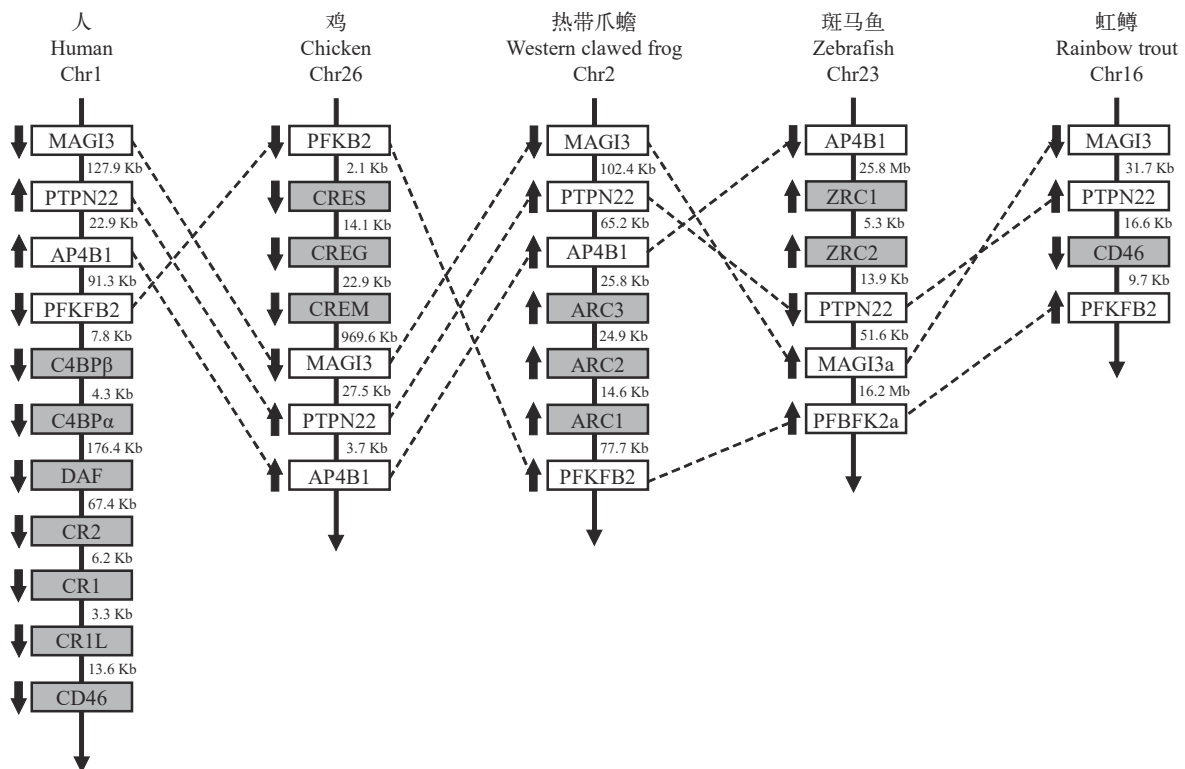


图2 虹鳟CD46基因与其他脊椎动物CD46基因的基因组共线性分析

Fig. 2 Synteny analyses of rainbow trout CD46 gene with other vertebrate CD46 genes

箭头表示基因转录方向; Chr. 染色体

Arrows indicate gene transcription orientations; Chr. chromosome

的含量只有31.2%, 而这一数值在人CD46中为58.7%。系统发育分析显示, 虹鳟CD46与香鱼、鲤和半滑舌鳎的CD46紧密聚类(图3)。序列一致性

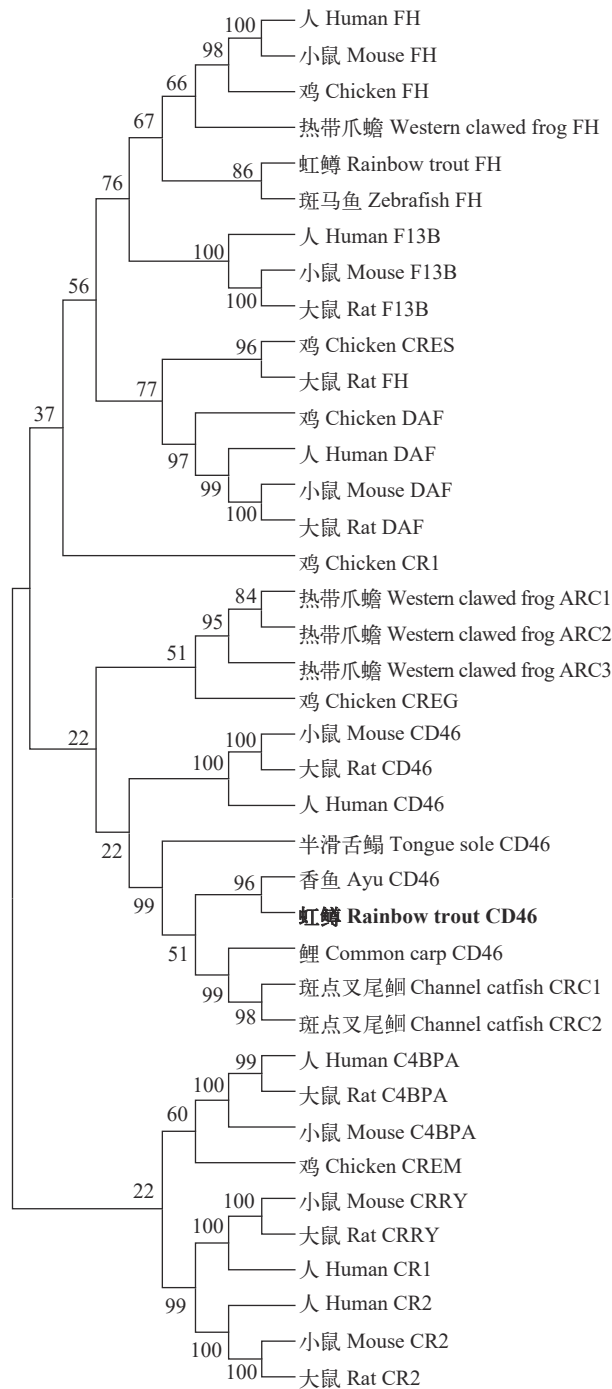


图3 虹鳟CD46与其他脊椎动物补体调节因子的系统发育关系
Fig. 3 Phylogenetic relationship between rainbow trout CD46 and representative vertebrate complement activation regulators
使用MEGA 6.06软件构建系统发育树; 其中虹鳟CD46用黑色加粗显示

Phylogenetic tree was generated using MEGA 6.06 software; rainbow trout CD46 is in boldface; the GenBank accession numbers of the used sequences are shown above

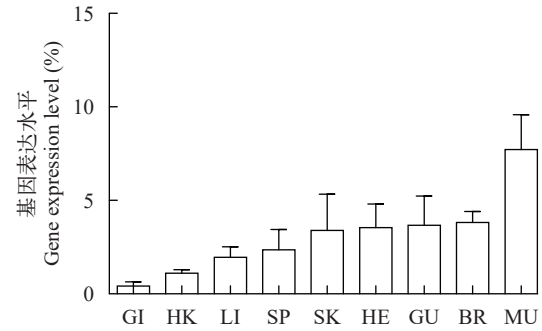


图4 虹鳟CD46基因的组织表达模式

Fig. 4 Tissue expression pattern of CD46 gene in rainbow trout
GI. 鳃; HK. 头肾; LI. 肝脏; SP. 脾脏; SK. 皮肤; HE. 心脏; GU. 肠; BR. 脑; MU. 肌肉; 数据代表6条鱼的平均值±SEM
GI. gill; HK. head kidney; LI. liver; SP. spleen; SK. skin; HE. heart; GU. gut; BR. brain; MU. muscle. The data represent the mean±SEM of 6 fish

分析显示, 虹鳟CD46与香鱼CD46的一致性最高, 达42.7%, 与人CD46的一致性最低, 为23%(具体数据未列出)。

2.2 虹鳟CD46基因在各组织中均有表达

通过荧光定量PCR检测分析了CD46基因在虹鳟各组织中的表达水平。实验结果显示, 虹鳟CD46在脾脏、头肾、肠、皮肤、鳃、肝、肌肉、心脏和脑组织中均有表达, 且在肌肉中表达量最高, 在鳃中表达量最低(图4)。

2.3 虹鳟CD46基因在白细胞各亚群中均有表达

本研究用流式细胞仪从虹鳟头肾组织中分选了IgM⁺B细胞(IgM⁺B)、IgT⁺B细胞(IgT⁺B)、IgM⁺IgT⁺淋巴细胞(DN Lym)和髓样细胞(Mye), 荧光定量PCR检测分析了CD46基因在各白细胞亚群中的表达情况, 结果显示CD46基因在4类白细胞亚群中均有表达(图5)。

2.4 重组蛋白GST-CD46的SDS-PAGE检测

用SDS-PAGE检测纯化后的标签蛋白GST和融合蛋白GST-CD46, 结果显示, 纯化出的GST和GST-CD46的分子大小与预测分子量一致, 且纯度都非常高, 没有明显的杂带(图6), 可以用于下游的功能实验。

2.5 CD46抑制虹鳟血清的溶血活性

为了明确虹鳟CD46对补体系统活化的调控功能, 本研究用兔红细胞作为指示细胞, 对此功能进行了研究。结果显示, 与正常虹鳟血清相比, 灭活后血清的溶血活性显著降低, 表明虹鳟血清能导致兔红细胞的破裂。与对照GST相比, GST-CD46显著抑制了虹鳟血清对兔红细胞的溶血活性, 且呈现出明显的剂量依赖效应。GST-CD46的浓度从40增

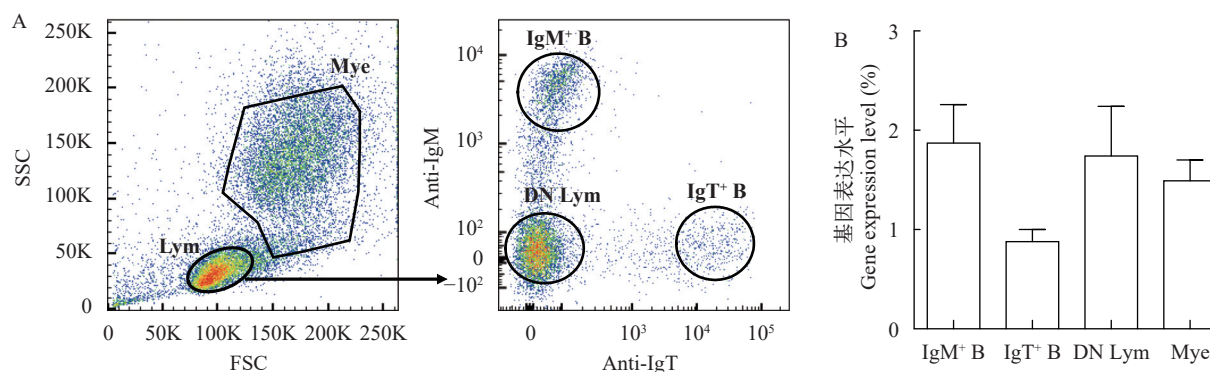


图5 虹鳟CD46基因在头肾白细胞亚群中的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *CD46* gene in subpopulations of rainbow trout head kidney leukocytes

A. 虹鳟头肾白细胞亚群的流式分选; B. 通过荧光定量PCR检测虹鳟CD46基因在IgM⁺ B细胞、IgT⁺ B细胞、DN淋巴细胞以及髓样细胞中的表达水平; 数据代表4条鱼的平均值±SEM

A. Flow cytometric sorting of subpopulations of rainbow trout head kidney leukocytes; B. The expression levels of *CD46* gene in rainbow trout IgM⁺ B cells, IgT⁺ B cells, DN lymphocytes and myeloid cells are analyzed by quantitative real-time PCR. The data represent the mean±SEM of 4 fish

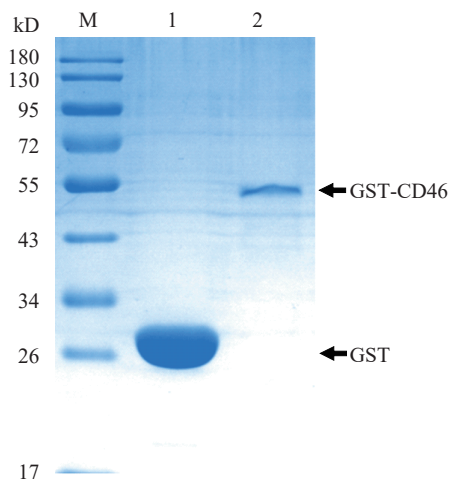


图6 SDS-PAGE分析纯化的蛋白GST和GST-CD46

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified proteins GST and GST-CD46

M. marker; 泳道1. GST蛋白; 泳道2. GST-CD46蛋白

M. marker; Lane 1. GST protein; Lane 2. GST-CD46 protein

加至80 μg/mL时, 其补体抑制活性增加, 而从80增加至160 μg/mL时, 其补体抑制活性下降, 表明GST-CD46的最高活性浓度为80 μg/mL左右(图7)。

2.6 CD46抑制虹鳟血清对细胞的损伤

本研究构建了真核表达载体pEGFP-CD46, 并分别用pEGFP-N1空白质粒和pEGFP-CD46质粒转染了HEK293T细胞, 将稀释后的虹鳟血清与转染后的HEK293T细胞孵育, 孵育完成后使用PI染色, 通过流式细胞术检测了虹鳟血清对细胞的损伤情况。实验结果表明(图8), 转染了pEGFP-CD46质粒的HEK293T细胞的PI阳性率显著低于转染了pEGFP-N1空白质粒的HEK293T细胞, 表明虹鳟CD46能

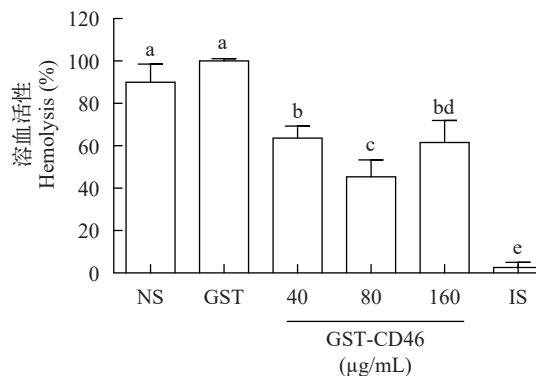


图7 CD46抑制虹鳟血清的溶血活性

Fig. 7 CD46 inhibited the hemolytic activity of rainbow trout serum

将虹鳟的正常血清、灭活血清、加入GST(80 μg/mL)的正常血清和加入不同浓度GST-CD46的正常血清分别与兔红细胞孵育30min, 测定血清的溶血活性。NS. Normal serum; IS. Inactivated serum; 数据是3个独立实验的平均值±SEM; 不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Normal rainbow trout serum, inactivated serum, normal serum with GST (80 μg/mL), normal serum with different concentrations of GST-CD46 are incubated with rabbit erythrocytes for 30min respectively, then the hemolytic activity of the serum is determined. NS. normal serum; IS. inactivated serum. The data are the mean±SEM of 3 independent experiments, Different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

有效的保护细胞免受血清补体的攻击。

3 讨论

CD46是具有多种生物学功能的重要分子, 已有许多物种的CD46被研究报道。人的CD46基因有14个外显子, 蛋白质由1个信号肽、4个SCR结构

域、1个富含丝氨酸/苏氨酸/脯氨酸的STP区、1个跨膜区和1个胞内区组成^[20-22]。在硬骨鱼类中, 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、半滑舌鲷和大西洋鲑(*Salmo salar*)的CD46基因均由7个外显子构成^[23]。本研究发现虹鳟CD46基因有10个外显子, 在基因结构上与其他已报道的硬骨鱼类的CD46基因存在差异。在蛋白质结构上, 虹鳟CD46与大多数已报道物种的CD46一样都具有1个信号肽、4个SCR结构域、1个跨膜区和1个胞内区。值得注意的是, 与人和香鱼的CD46相比, 虹鳟CD46的STP区域非常短, 区域内丝氨酸/苏氨酸/脯氨酸的含量也低很多。目前CD46的STP区域的功能还未明确, 但本研究的结果表明, 虹鳟的短STP区并未影响虹鳟CD46的补体调控功能。

在哺乳动物中, 几乎所有细胞都表达CD46^[22]。本研究检测了虹鳟脾脏、头肾、肠、皮肤、鳃、肝、肌肉、心脏和脑组织中CD46的表达量, 结果显示, 虹鳟CD46在所有受试组织中均有表达, 其中肌肉中表达量最高, 鳃中表达量最低。关于鱼类CD46的组织表达, 已有研究仅在鲤中通过RT-PCR检测了CD46的组织表达, 结果显示其在心脏中表

达量很高, 但未检测其在肌肉中的表达^[16], 本研究的结果暗示鱼类CD46分子可能在保护肌肉组织免受补体损伤方面起着重要的作用。同时, 本研究还检测了虹鳟头肾白细胞亚群中CD46的表达, 结果显示CD46在各白细胞亚群(IgM⁺ B细胞、IgT⁺ B细胞、IgM⁻ IgT⁻ 淋巴细胞和髓样细胞)中也均有表达。因此, 在进化过程中CD46的组织分布模式是保守的, 暗示CD46对机体各组织和细胞具有重要的保护功能。

补体系统在动物机体免疫中起着重要的作用, 被激活后可以发挥裂解靶细胞、促吞噬、引起炎症、清除免疫复合物以及调控生殖等作用^[23]。补体调节因子可以平衡补体的激活与抑制从而既有效的杀灭外来病原体, 又可防止过度免疫对自身的伤害^[20]。在半滑舌鲷和香鱼^[17, 18]中都证明了CD46分子能有效的降低血清的溶血活性, 对补体系统的激活起到调控作用。然而, 冷水鱼类的CD46是否也具有补体活化的调控功能仍然未知。本研究发现, 虹鳟CD46分子能显著降低虹鳟血清对兔红细胞的溶血活性, 此外, 用HEK293T细胞过表达虹鳟CD46能够显著抑制虹鳟血清对HEK293T细胞的损

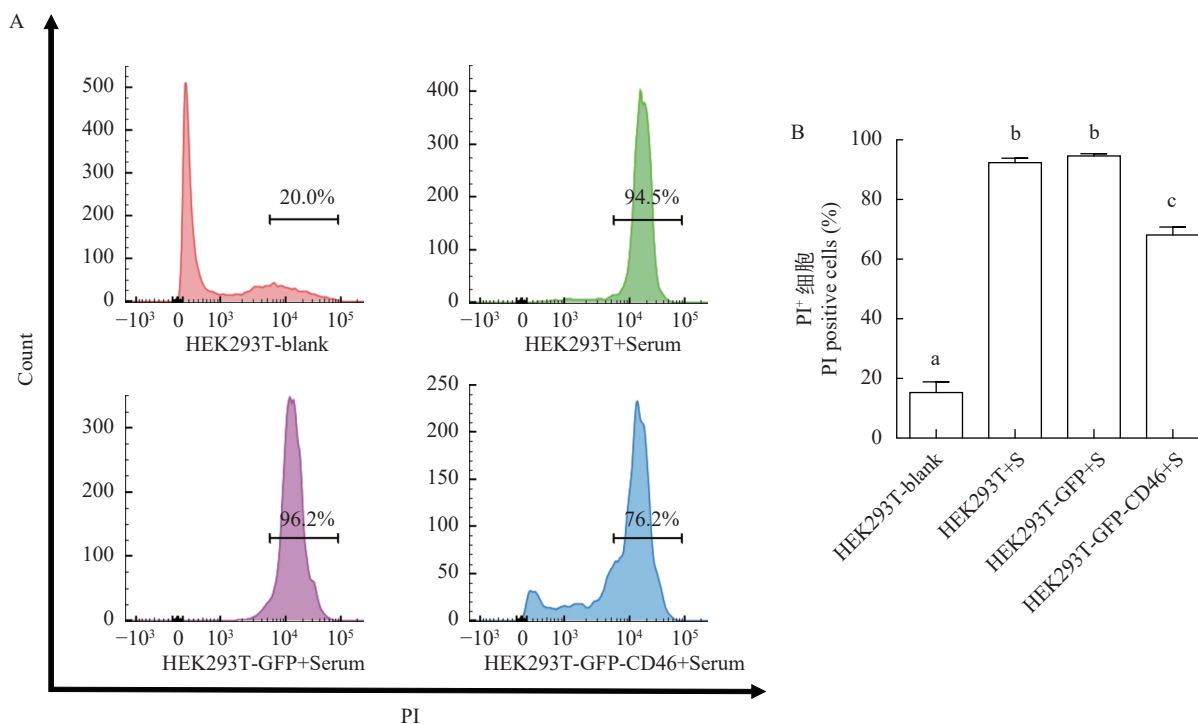


图8 CD46抑制虹鳟血清对HEK293T细胞的损伤

Fig. 8 CD46 inhibited the damage of rainbow trout serum to HEK293T cells

用pEGFP-N1和pEGFP-CD46质粒分别转染HEK293T细胞, 转染24h后, 加入稀释的虹鳟血清孵育60min, 然后加入PI染色, 使用流式细胞术检测细胞的损伤情况; S. serum; 数据是3个独立实验的平均值±SEM; 不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

The pEGFP-N1 and pEGFP-CD46 plasmids are transferred into HEK293T cells, respectively. After 24h, the transfected cells are incubated with diluted rainbow trout serum for 60min. Then, PI is added and flow cytometry is used to detect the damage of cells. S. serum. The data are the mean±SEM of 3 independent experiments. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

伤, 这些结果表明冷水鱼类的CD46也具有保守的补体活化调控功能。C3分子是补体系统的核心成分, 在哺乳动物中, 补体系统活化的经典途径和凝集素途径需要C4b参与组装为C3转化酶, 而旁路途径需要C3b参与组装为C3转化酶, C3转化酶进而切割C3产生C3b, C3b进一步组装为C5转化酶, C5转化酶切割C5分子为C5b, C5b最终与C6、C7、C8和C9分子组装为膜攻击复合物, 裂解病原体^[24]。为了防止补体系统过度活化从而损伤自体细胞, 细胞表面的CD46能充当丝氨酸蛋白酶FI的辅助因子, 从而促进FI对C3b和C4b的降解, 最终抑制补体系统的活化和对自体细胞的损伤^[24]。已有研究证实, 半滑舌鳎的CD46能与FI结合, 对补体系统的激活起调控作用^[17], 因此, 本研究推测虹鳟CD46也可能是与FI结合, 从而调控补体系统的活化。

总之, 本研究发现, 虹鳟CD46具有广泛的组织和细胞分布, 具有重要的补体活化调控功能, 此外, 与已报道的硬骨鱼类CD46相比, 虹鳟CD46的分子结构还存在一些独特性, 比如含有10个外显子, STP区域与半滑舌鳎一样非常短。这些发现不仅增加了对硬骨鱼类CD46的认知, 还为深入研究此分子的免疫功能及其在抗病免疫中的应用提供了理论基础。

参考文献:

- [1] Zhu L, Nie L, Zhu G, *et al.* Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, **39**(1-2): 39-62.
- [2] Liao Z W, Wan Q Y, Yuan G L, *et al.* The systematic identification and mRNA expression profiles post viral or bacterial challenge of complement system in grass carp *Ctenopharyngodon Idella* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(86): 107-115.
- [3] Romo M R, Pérez-Martínez D, Ferrer C C. Innate immunity in vertebrates: an overview [J]. *Immunology*, 2016, **148**(2): 125-139.
- [4] Lubbers R, Van Essen M F, Van Kooten C, *et al.* Production of complement components by cells of the immune system [J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2017, **188**(2): 183-194.
- [5] Reis E S, Mastellos D C, Hajishengallis G, *et al.* New insights into the immune functions of complement [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2019, **19**(8): 503-516.
- [6] Liszewski M K, Kemper C. Complement in motion: the evolution of CD46 from a complement regulator to an orchestrator of normal cell physiology [J]. *Journal of Immunology*, 2019, **203**(1): 3-5.
- [7] Liszewski M K, Atkinson J P. Complement regulator CD46: genetic variants and disease associations [J]. *Human Genomics*, 2015, **9**(1): 1-13.
- [8] Riley R C, Kemper C, Leung M, *et al.* Characterization of human membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, **62**(4): 534-546.
- [9] Liszewski M K, Atkinson J P. Membrane cofactor protein (MCP; CD46): deficiency states and pathogen connections [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2021(72): 126-134.
- [10] Heeger P S, Kemper C. Novel roles of complement in T effector cell regulation [J]. *Immunobiology*, 2012, **217**(2): 216-224.
- [11] Cardone J, Le Fric G, Vantourout P, *et al.* Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells [J]. *Nature Immunology*, 2010, **11**(9): 862-871.
- [12] Sanchez A, Feito M J, Rojo J M. CD46-mediated costimulation induces a Th1-biased response and enhances early TCR/CD3 signaling in human CD4⁺ T lymphocytes [J]. *European Journal of Immunology*, 2004, **34**(9): 2439-2448.
- [13] Frolíková M, Stopková R, Antalíková J, *et al.* Role of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 in reproduction [J]. *Folia Zoologica*, 2012, **61**(1): 84-94.
- [14] Fabryová K, Simon M. Function of the cell surface molecules (CD molecules) in the reproduction processes [J]. *General Physiology and Biophysics*, 2009, **28**(1): 1-7.
- [15] Oshiumi H, Suzuki Y, Matsumoto M, *et al.* Regulator of complement activation (RCA) gene cluster in *Xenopus tropicalis* [J]. *Immunogenetics*, 2009, **61**(5): 371-384.
- [16] Tsujikura M, Nagasawa T, Ichiki S, *et al.* A CD46-like molecule functional in teleost fish represents an ancestral form of membrane-bound regulators of complement activation [J]. *Journal of Immunology*, 2015, **194**(1): 262-272.
- [17] Li M F, Sui Z H, Sun L. A teleost CD46 is involved in the regulation of complement activation and pathogen infection [J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 1-13.
- [18] Ma W J, Shi Y H, Chen J. Ayu (*Plecoglossus altivelis*) CD46 isoforms protect the cells from autologous complement attack [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(102): 267-275.
- [19] 2020 China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020. [中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.]
- [20] Elvington M, Liszewski M K, Atkinson J P. CD46 and oncologic interactions: Friendly fire against cancer [J]. *Antibodies*, 2020, **9**(4): 59-73.
- [21] Agrawal P, Nawadkar R, Ojha H, *et al.* Complement evasion strategies of viruses: an overview [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017(8): 1117.
- [22] Hawkins E D, Oliaro J. CD46 signaling in T cells: linking

- pathogens with polarity [J]. *FEBS Letters*, 2010, **584**(24): 4838-4844.
- [23] Mathern D R, Heeger P S. Molecules great and small: the complement system [J]. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2015, **10**(9): 1636-1650.
- [24] Zipfel P F, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, **9**(10): 729-740.

THE MOLECULAR CHARACTERISTICS AND REGULATORY FUNCTION OF COMPLEMENT ACTIVATION REGULATOR *CD46* IN RAINBOW TROUT

LIANG Jia-Xin, MA Zi-You, LI Wen-Shuo, WANG Peng, TIAN Ding, LIU An-Qi,
ZHANG Yong-An and ZHANG Xu-Jie

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Fisheries,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To further study the molecular characteristics and functions of complement activation regulators in teleost fish, we cloned the *CD46* gene of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and analyzed its molecular characteristics systematically. The results showed that the *CD46* gene of rainbow trout was composed of 10 exons and 9 introns; the cDNA sequence of *CD46* was 2812 bp and encoded 317 amino acids; the protein sequence of *CD46* was composed of 1 signal peptide, 4 SCR domains, 1 transmembrane region and 1 intracellular region; and the predicted molecular weight of CD46 was 33.9 kD. Synteny analyses showed that the rainbow trout *CD46* gene was located on chromosome 16, and its gene locus had conserved synteny in vertebrates. The expression analyses showed that the rainbow trout *CD46* gene was expressed in various tissues and leukocyte subpopulations. To further clarify the immune function of rainbow trout CD46, the GST protein and the fusion protein GST-CD46 were prokaryotically expressed and purified. The experiment of hemolytic activity showed that, compared with GST, GST-CD46 could significantly inhibit the hemolytic activity of rainbow trout serum to rabbit erythrocytes in a dose-dependent manner, indicating that rainbow trout CD46 is a regulator of complement activation. In addition, GFP or GFP-CD46 were overexpressed in HEK293T cells. The experiment of cell damage showed that, compared with GFP, GFP-CD46 could significantly inhibit the damage of rainbow trout serum to HEK293T cells, further indicating that rainbow trout CD46 is a regulator of complement activation and can protect cells from the damage of complement system. In conclusion, this study not only increased the knowledge of the molecular characteristics and regulatory function of rainbow trout CD46, but also provided a theoretical basis for the in-depth study of the immune function of this molecule and its application in disease resistance.

Key words: *CD46*; Complement; Regulator; *Oncorhynchus mykiss*