

草鱼芳香烃受体 $ahr1a$ 基因克隆、表达及进化分析

邬恺正, 王俊亚, 范丁月, 李仕然, 徐兢, 王梓璇, 邹钧

Identification, phylogeny and expression analysis of an aromatic hydrocarbon receptor homologue in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

WU Kaizheng, WANG Junya, FAN Dingyue, LI Shiran, XU Jing, WANG Zixuan, ZOU Jun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20211103626>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

尼罗罗非鱼 $TIRAP$ 基因克隆、组织表达及其在无乳链球菌、脂多糖和聚肌胞苷酸刺激下的免疫应答

Cloning and expression of *TIRAP* gene and immune response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*, lipopolysaccharides and polyinosinic polycytidylic acid stress

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 857 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-318>

三角帆蚌中 $WNT4$ 基因克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of *WNT4* gene in the *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 801 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191202894>

凡纳滨对虾繁育相关基因 $Allatostatin-AR$ 的克隆与表达分析

Cloning and expression of breeding- & development-related gene *Allatostatin-A receptor* from *Litopenaeus vannamei*

上海海洋大学学报. 2023, 32(1): 20 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503463>

斑马鱼肿瘤坏死因子($tnf\alpha$)及其受体($tnfrsf1a$)应答细菌和病毒感染的表达

Expression analysis of zebrafish tumor necrosis factor ($tnf\alpha$) and its receptor ($tnfrsf1a$) in response to bacterial and viral infections

上海海洋大学学报. 2020, 29(2): 171 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190302560>

斑马鱼白细胞介素34对细菌和病毒感染的转录应答

Transcriptomic response of zebrafish Interleukin-34 to bacterial and viral infection

上海海洋大学学报. 2022, 31(5): 1078 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210303359>

文章编号: 1674-5566(2023)01-0040-13

DOI:10.12024/jsou.20211103626

草鱼芳香烃受体 *ahr1a* 基因克隆、表达及进化分析

邬恺正, 王俊亚, 范丁月, 李仕然, 徐 兢, 王梓璇, 邹 钧

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘 要: 芳香烃受体(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)作为配体激活的转录因子在 T 细胞、单核细胞和树突状细胞(Dendritic cells, DCs)的功能调节方面扮演重要角色,炎症相关细胞因子的产生与 AhR 信号通路也密切相关。为阐明草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) *ahr1a* 基因在炎症发生过程中的作用,本研究克隆获得了草鱼 *ahr1a* 基因 cDNA 序列,全长 2 893 bp,其编码区共 2 544 bp,编码 847 个氨基酸。结构域预测发现草鱼 AhR1a 蛋白含有螺旋-环-螺旋(Helix-loop-helix, HLH)超家族中 bHLH-PAS(Period-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator single minded, Pre-Arnt-Sim)亚家族的典型结构域。氨基酸序列分析表明,草鱼 AhR1a 与黄河鲤(*Cyprinus carpio*)的相似性与一致性最高。系统进化树结果发现草鱼 *ahr1a* 基因与金鱼(*Carassius auratus*)、黄河鲤和斑马鱼(*Danio rerio*)的同源基因聚在一支。草鱼 *ahr1a* 基因在多个组织(肠、鳃、肾、肝、头肾、胸腺、脾、皮肤、脑)中均有表达,其中肠和鳃表达量最高。草鱼感染柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)后, *ahr1a* 在脾(24, 48 h)和头肾(12, 24 h)中的表达水平显著下降。腹腔注射草鱼呼肠孤病毒(Reovirus of grass carp, GCRV)后,脾和头肾中 *ahr1a* 表达水平无明显变化。体外实验结果显示,脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)和 IL-1 β 重组蛋白下调草鱼原代头肾白细胞中 *ahr1a* 的表达。综上所述,本研究克隆分析了草鱼 *ahr1a* 基因并初步证实其参与炎症反应的调控。

关键词: 草鱼; 芳香烃受体; 基因克隆; 免疫反应

中图分类号: S 917.4 **文献标志码:** A

芳香烃受体(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)是配体激活的核转录因子,属于螺旋-环-螺旋(Helix-loop-helix, HLH)超家族中 bHLH-PAS(Period-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator Single Minded, Pre-Arnt-Sim)亚家族成员^[1],在动物体内具有广泛的生物学和毒理学效应^[2-3]。PAS-bHLH 蛋白是控制适应性免疫反应中的转录调节因子,还参与应答神经发生、血管化、昼夜节律、新陈代谢和对缺氧的应急反应^[4]。研究^[5-8]表明, AhR 与其他信号通路的蛋白质相互作用,其中包括核因子- κ B(NF- κ B)、信号传导及转录激活蛋白(STATs)、原癌基因(c-Maf)或 β -连环蛋白(β -catenin)等,参与信号通路的调控。一些 AhR 的配体已得到鉴定,如环境污染物 TCDD(2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)和内源性芳香烃受体激动剂(6-Formylindolo^[3,2-b]

carbazole, FICZ)被证实是 AhR 的高亲和力配体。

AhR 起源于 6 亿多年前,无脊椎动物 AhR 缺乏与卤代和非卤代芳香烃的高亲和力,仅在器官发育中发挥作用,这也是脊椎和无脊椎动物之间 AhR 的根本区别^[9]。在动物进化过程中, *ahr* 基因在早期脊椎动物进化和特定脊椎动物谱系不断复制,导致每个物种存在 1~5 个 *ahr* 基因^[10]。哺乳动物只有 1 个 *ahr* 基因,而大多数鱼类有多个 *ahr* 基因,这可能是由于软骨鱼类和硬骨鱼类在谱系分化之前串联基因复制导致出现 2 个 *ahr* 分支,即 *ahr1* 和 *ahr2*^[11]。此外,由于真骨鱼类特有的全基因组复制事件,真骨鱼类存在更多拷贝,如 *ahr1a*、*ahr2a* 和 *ahr1b*、*ahr2b*^[12]。系统进化分析表明,鱼类 *ahr1* 是哺乳动物中 *ahr* 的同源基因。目前 *ahr* 已在斑马鱼(*Danio rerio*)^[13]、底鳉(*Fundulus heteroclitus*)^[14]、真鲷(*Pagrus*

收稿日期: 2021-11-22 修回日期: 2022-02-27

基金项目: 国家自然科学基金(32030112)

作者简介: 邬恺正(1997—),男,硕士研究生,研究方向为鱼类免疫与病害防控。E-mail: m190100314@st.shou.edu.cn

通信作者: 邹 钧, E-mail: jzou@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University(CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

major)^[15]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[16]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[17]、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[18] 和大西洋小鳕 (*Microgadus tomcod*)^[19] 中报道。

T 细胞是适应性免疫系统的重要组成部分。初始 T 细胞在抗原呈递细胞 (Antigen presenting cells, APCs) 及其共刺激信号激活后进行分化。有研究^[20-22]表明, AhR 配体能够促进 Th17 细胞的生成和诱导性 Treg 细胞、自然 Treg 细胞和调节性 Treg1 细胞的增殖。AhR 促使 Th17 细胞分泌 IL-22^[21]。在诱导的自身免疫模型中,持续暴露于容易降解的 AhR 配体 (TCDD 或 FICZ) 可以缓解疾病的恶化^[23]。AhR 参与调控朗格汉斯细胞成熟和功能^[24]。*ahr* 在大多数上皮细胞中高量表达^[25],对皮肤角质形成细胞的紫外线 (UV) B 应激反应^[26],以及肠道、皮肤、肺和生殖器上皮细胞抵御有害化学物质至关重要。目前有关鱼类 AhR 的研究都聚焦在 AhR2 的功能和 TCDD 毒性的机制上^[27],而对 AhR1 功能的研究尚不深入。最初研究^[11]认为 AhR1a 不具有功能。在斑马鱼中,TCDD 诱导的毒性和激活 *Cyp1a* 活性似乎不需要 AhR1a 参与^[27]。最近研究^[28]发现,敲降 *ahr1a* 会降低斑马鱼 *Cyp1a* 在胚胎发育过程中的表达。研究^[29]表明,斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 受到致病性沙门氏气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 感染后, *ahr1* 在脾脏、肠道和巨噬细胞中被一种未知配体激活,同时,在脾、肠和巨噬细胞中 *ahr1a* 和 *ahr1b* 表达量显著升高,而 *ahr2* 仅在肠中升高,提示 *ahr1a* 和 *ahr1b* 主要参与免疫应答反应。此外, AhR 抑制剂 3',4'-DMF 和沉默 *ahr1a* 或 *ahr1b* 表达会抑制由 SRW-OG1 感染诱导的 *il-1 β* 和 *il-8* 的升高。这些结果表明: AhR1a 在免疫中可能具有重要作用,但具体机制尚不清楚。

草鱼是我国重要的淡水养殖经济鱼类,鉴定其免疫相关基因对草鱼的健康养殖具有重要意义。本研究克隆了草鱼 *ahr1a* 并分析其在健康草鱼组织中的表达,以及脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)、柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*)、草鱼呼肠孤病毒 (Reovirus of grass carp, GCRV)、IL-1 β 重组蛋白对草鱼 *ahr1a* 的影响,为进一步研究硬骨鱼类 AhR1a 免疫相关功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用健康草鱼 (120 \pm 10) g 购自上海海洋大学滨海养殖基地。实验前在 (25 \pm 3) $^{\circ}$ C 环境下暂养 2 周。实验操作前用间氨基苯甲酸己脂甲磺酸盐 MS-222 (100 mg/mL, Sigma-Aldrich) 对实验草鱼进行麻醉。所有实验严格遵守上海市有关动物工作管理法规,并获得上海海洋大学实验动物伦理委员会的审核批准 (SHOU-DW-2021-027)。

1.2 菌株和毒株

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自 Promega 公司。G4 株柱状黄杆菌由中国科学院水生生物研究所谢海霞老师提供。II 型草鱼呼肠孤病毒 (GCRV-II) 由中国科学院武汉病毒研究所方勤研究员提供。

1.3 草鱼总 RNA 提取以及成鱼组织中的表达分析

用 MS-222 对草鱼进行麻醉,剪断鳃后脊椎骨,乙醇擦拭鱼体表面后,切开鳃弓放血,用无菌剪刀沿着尾鳍解剖鱼体,将肠、鳃、肾脏、肝脏、头肾、胸腺、脾脏、皮肤、脑组织分别放入预先准备的 2 mL 无 RNA 酶离心管中。用 TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) 提取总 RNA,具体方法参照 JIA 等^[30]。严格按照 Hifair[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书制备 qPCR 模板,利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测草鱼 *ahr1a* 基因在各个组织中的表达情况。

1.4 草鱼 *ahr1a* 克隆以及序列分析

用 Hifair II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (翌圣) 合成 cDNA,具体方法参照 JIA 等^[30]。从草鱼基因组数据库 (<http://www.ncgr.ac.cn/grasscarp/>) 检索到 *ahr1a* 基因部分序列,用表 1 所列引物以合成的 cDNA 第一链为模板进行该基因保守片段的扩增。扩增体系为 50 μ L: PrimeSTAR[®] Max 25 μ L (TaKaRa), ddH₂O 22 μ L, 上下游引物 (F/R) 各 1 μ L, cDNA 1 μ L; PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,利用 Gel Extraction Kit (OMEGA) 对特异性条带进行胶回收。回收产物连接至 pMDTM-19-Vector

(TaKaRa)并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经 PCR 筛选获得阳性菌落,菌液直接测序(苏州金唯智生物科技有限公司)。根据获得的保守片段设计特异性引物(表 1)快速扩增 cDNA (RACE)5'和 3'端未知序列。最后,用单对引物扩增全长编码序列,具体方法参照 JIA 等^[30]。通过 NCBI 数据库中的 ORF Finder 进行开放阅读框的预测,以及 BLAST 程序进行序列的同源性搜索和比对。利用 ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质相对分子质量和等电点,利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测结构域;序列比对利用 Clustal X 软件,*ahr1a* 同源基因数据均来自于 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);相似性与一致性比较利用网站 https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ 进行计算,斑马鱼、斑点雀鲷 (*Lepisosteus oculatus*)、小斑猫鲨 (*Scyliorhinus canicular*) 和人 (*Homo sapiens*) 的基因组数据均来源于 NCBI;进化树构建利用 MEGA X 软件。

1.5 细菌和病毒感染实验

肾和脾是鱼类的重要中枢免疫组织^[31],含有多种类型、大小不一的免疫细胞,因此将草鱼脾和肾组织作为实验对象。

将 32 条健康的草鱼随机分为两组,每组 16 条,实验组腹腔注射 100 μ L 柱状黄杆菌(1×10^8 CFU/mL),对照组腹腔注射等量的 PBS,第 12、24、48、72 小时从每组鱼的脾肾组织中提取总 RNA,并反转成 cDNA 模板备用。

将 32 条健康草鱼随机分为两组,每组 16 条,实验组注射 200 μ L GCRV-II 病毒(病毒滴度为 1×10^7 TCID₅₀/mL),对照组腹腔注射等量 DMEM 培养基,第 1、3、7、14 天从每组鱼的脾肾组织中提取总 RNA,并反转成 cDNA 模板备用。具体方法参照 JIA 等^[30]。

1.6 IL-1 β 重组蛋白的表达及纯化

从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)获取草鱼 IL-1 β 的序列(登录号: JX014320.1),利用特异性引物(表 1)扩增草鱼 IL-1 β (从 F¹³⁰-K²⁷⁰)预测成熟肽,用限制性核酸内切酶(*Nco* I 和 *Bam*HI)分别酶切表达载体质粒和目的片段,将目的片段连接至 pET-21d 载体。将连接后的产物转

化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,挑取含目的片段的单阳性菌落,测序验证后进行质粒提取,将重组表达质粒转化至大肠杆菌 Rosseta (DE3)中,挑取单克隆菌落接种至 50 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,然后转入 5 L LB 培养基中,培养约 2 h 至 OD₆₀₀ 值达到 0.6~0.8 时加入 1 mmol/L IPTG,并将培养温度调整至 16 $^{\circ}$ C 培养 6 h。4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体,再加入 PBS 重悬,用 800 bar 高压破碎 5 min,收集细菌破碎产物,4 $^{\circ}$ C 条件下 8 000 r/min 离心 10 min,收集上清。用 PBS 平衡亲和柱(Ni-NTA 柱),将收集的破碎菌体上清加入亲和柱,之后再加入不同浓度(30 mmol/L、60 mmol/L 和 500 mmol/L)咪唑洗脱并收集洗脱液,洗脱后用 10 mL ddH₂O 清洗亲和柱,最后用 20% 乙醇封柱,具体步骤参考 LI 等^[31]。

1.7 LPS 和重组 IL-1 β 刺激草鱼头肾原代细胞实验

参照 1.3 节取头肾组织,置入含 1% 双抗的 PBS 中清洗。将头肾组织转移至 70 μ mol/L 的尼龙滤网上,研磨组织并不断滴加 Pushing Buffer(L15 + 2% FBS + 0.1% 肝素)。将细胞悬液转移至 51% Percoll,在 4 $^{\circ}$ C、加速度为 1、减速制动为 0 条件下 400g 离心 30 min。吸取白色中间层细胞放入含有 Pushing Buffer(L15 + 0.1% FBS + 0.1% 肝素)的离心管中。4 $^{\circ}$ C,400g 离心 10 min,弃上清,重复 1 次。将细胞重悬于 DMEM/RPMI 培养基中,计数后将 1×10^7 细胞转于 6 孔板中,置于 28 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中稳定 4 h,加入 50 μ g/mL LPS 或 500 ng/mL IL-1 β 重组蛋白,对照组分别加入等体积 PBS(LPS 对照组)或等体积 100 $^{\circ}$ C 变性 5 min 的重组蛋白(IL-1 β 对照组)。12 h 后,收集悬浮细胞和贴壁细胞进行总 RNA 的提取以及 cDNA 的制备,具体方法参照 1.3 节。

1.8 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件对 RT-qPCR 生成的数据进行统计分析。用延伸因子 1 α (Elongation factor, *ef1 α*)作为内参,计算靶基因的相当表达水平。采用单因素方差分析,进行 LSD 后检验。 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别表示实验组与对照组差异显著和差异极显著^[32],并用 GraphPad Prism 5 作图。

表 1 基因引物信息
Tab. 1 Information of gene primers

引物 Primers	顺序(5'-3') Equence(5'-3')	用途 Application
F	TCGCAAACGGAAGAAACC	片段验证
R	TTGGTCCAACACCTACTCTTTT	片段验证
<i>ahr1a</i> -F1	TGACGTGGCAGACCTTACAG	3'-RACE
<i>ahr1a</i> -F2	CACCAGGTTCCAGACGACGAG	3'-RACE
<i>ahr1a</i> -F3	ACATGCAGCAGGTTCTTCCC	3'-RACE
<i>ahr1a</i> -R1	CTCTGGTGGCAACTGCTCTG	5'-RACE
<i>ahr1a</i> -R2	TGTGCCATTGGAGGTGACCA	5'-RACE
<i>ahr1a</i> -R3	ATTGAGCCGGTCCCGATGTC	5'-RACE
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3'-RACE
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	3'-RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3'-RACE
APG	CCAGACTCGTGGCTGATGCA(G) ₁₆	5'-RACE
AP	CCAGACTCGTGGCTGATGCA	5'-RACE
<i>ahr1a</i> -F	AGCACCGAGTAAAGCCACCC	序列验证
<i>ahr1a</i> -R	CCACACAGCTGACGATCATG	序列验证
<i>ahr1a</i> -qF	GACGCCTCCTCTGGATCTGA	RT-qPCR
<i>ahr1a</i> -qR	CATATCACCATCCAGGCCCTTG	RT-qPCR
<i>efl</i> α-qF	CAGCACAAACATGGGCTGGTTC	RT-qPCR
<i>efl</i> α-qR	ACGGGTACAGTTCCAATACCTCCA	RT-qPCR
<i>il-1</i> βF	ATGAAGACCAGCAAGACCTTGCAGTGTCCATT	质粒构建
<i>il-1</i> βR	TCAATGATGATGATGATGCTGTCTCCAGTGTGAAGTCTGT	质粒构建

2 结果

2.1 草鱼 *ahr1a* 基因克隆及序列分析

通过分析草鱼基因组获得草鱼 *ahr1a* 基因编码序列,并对此序列测序验证。草鱼 *ahr1a* 基因 cDNA 全长为 2 893 bp(图 1),包括 5'非编码区(Untranslated region, UTR)292 bp、3'非编码区 57 bp 和开放阅读框(Open reading frame, ORF)2 544 bp,编码 847 个氨基酸。3'-UTR 有典型的多聚腺苷酸加尾信号“AATAAA”基序和 Poly A 重复序列。对 AhR1a 蛋白结构域进行分析(图 2),发现其具有 HLH 超家族中 bHLH-PAS 亚家族典型的结构域,即 bHLH(N²⁷-N⁸¹)、PAS-A(P¹⁰⁰-N¹⁶⁶)和 PAS-B(L²⁵⁹-R³²⁹)。草鱼 AhR1a 的预测分子量为 95.0 ku,理论等电点为 6.14。

2.2 草鱼 AhR1a 同源比较与系统进化分析

草鱼 AhR1a 的氨基酸序列与其他物种的相似性和一致性比对结果显示(表 2),草鱼 AhR1a 与黄河鲤(*Cyprinus carpio*)相似性与一致性最高,分别为 81.5% 和 74.7%,与其他物种的 AhR1a(AhR)相似性和一致性也达到了 45.4% 和 38.8%。

利用 Clustal X 软件和 MEGA X 软件构建系统进化树(图 3)。结果表明:AhR1a 氨基酸 N 端区段(即 PAS-bHLH 功能域)较为保守,而 C 端序列则同源性较低。系统发育进化分析显示,草鱼 AhR1a 与黄河鲤、金鱼(*Carassius auratus*)、斑马鱼、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑的 AhR1a 聚在一起,自展值高达 100%,与其他物种之间也符合传统分类学的进化关系。

2.3 草鱼 *ahr1a* 基因结构与共线性分析

根据草鱼 *ahr1a* 基因 cDNA 与 DNA 比对后绘制 *ahr1a* 基因结构图(图 4)。结果显示,草鱼 *ahr1a* 含有 11 个外显子和 10 个内含子,与斑点雀鳢、小斑猫鲨和人的 *ahr1a* 基因结构一致,而斑马鱼仅含有 10 个外显子和 9 个内含子。

共线性分析发现(图 5),草鱼 *ahr1a* 基因和 *hdac9b* 和 *ankrd28b* 共定位在 Scaffold CI01000016 上,与斑马鱼 Chro 16 中的基因座同源,然而,雀鳢和小斑猫鲨中 *ahr1a* 基因的上游仅发现 *hdac9* 同源基因,下游并未找到同源基因,人和草鱼 *ahr1a* 基因的共线性不保守,在其上下游未找到同源基因。

```

1      TATTCAGCCGGTCCCGATGTCGCTTAGCTAATGTTAGATTGACAGACAGCTTGTAAATTGAGCTTAGCAATGACAGGGATATGTTTATCCGCTCTGTCAACCCTGGGCTTTAACTGTG
121    GACTAAAAACAGTGAATGCTTCAGTTTAAAGAGCACTGCCGGTAACTATTAGTTTCTAAGTTGTTTATTTGGGTAGAACGCTAACCTTAGCCCAAGGCAGCTTAAGGTTAGCTG
241    TAGCACCGAGTAAAGCCACCAACTAACCCAGAAATCTGTTTCTGTGGGAATTTAGAGCACCAAGTAATCGTTATGCAAGTCGCAACCGGAAGAAACCTGTCGCCGAAAGTGAGAAGCAGTC
1      M S T S N R Y A S R K R K K P V P K S E K Q S
361    TGTCACATCGAACCCATCTAAACGACATCGGGACCGGCTGAATGGAGAGTTAGACAGGTTGGCCAGCCAGCTCCCTTCCCTCAAGAGGTCATATCAAGCTGGACAACTACCATACT
24    V T S N P S K R H R D R L N G E L D R L A S Q L P F P Q E V I S K L D K L T I L
481    GAGGCTAAGTGTGAGCTACCTCGCGCCAAAAGTCACTTCAATGTGACCTGAACTCAAAGAACTCCAGCAACTAGCAAAATAACATAAACACACAAACAGGAGCTCCAGAGGGAGA
64    R L S V S Y L R A K S H F N V T L N S K N S S Q L A N N T K P H K Q E L P E G D
601    CTTTTGCTACAGGTTATAAATGGCTTTGTGTGGTTCACCTCCAATGGCACAATCTTCTATGCTTCTCCACCATTGAGGACTACTGGGGTTCATCAGTCGGATCTCATCCATCA
104    F L L Q V I N G F V L V V T S N G T I F Y A S S T I E D Y L G F H Q S D L I H Q
721    GAGTGTTCAGAGCTCATTACACTGAAGACCGGGCTGAGTTTCAAGACAGCTCCAGCGGGCTCAACCCAGCTGCACTTAGACACCGGACAGTAGTGAAGCTCCCATGATTC
144    S V Y E L I H T E D R A E F Q K Q L H W A L N P S C T L D T G Q L V Q A S H D S
841    ACCACTGCCTCAGAGTACTACCTCCAGCAGCTGCCACAGAGAACTCCACTTCTGGAGCGAAATTTGTTGCGCGTTAAGATGCTCATGCAACCTCATCTGGCTTTCTTGC
184    P L P Q T Y Y I P E Q L P P E N S T F T L E R N F V C R L R C L M D N S S G F L A
961    CATGAATTTTCAGGGCGTTGAAGTCTGTATGGCAGAATGAGAGGAGAGAGTGGCAAACCCATCCCTCCTCAGCTGGCCCTGTTGCCCTGGTCAGCCCTCGACCGCCCTTC
224    M N F Q G R L K F L Y G Q N E R R A D G K P I P P Q L A L F A L V S P L Q P P S
1 081  CATAGTGGAAATCCGCACCAAGAGCTCATATTTAAAACCAAGCATAACTGGAATCTCACTCCCAACCGCATGTGATGCAAAAGGGAAGATGTTTCTCGGCTACACAGAGCCAGAACTGTG
264    I V E I R T K S F I F K T K H K L D F T P T A C D A K G K I V L G Y T E A E L C
1 201  TTACCGCGCTCAGGCTATCAGTTTCCATCCAGCTGACATGCTGCTGCTGAGAGCCACATCGCGATGATGAGGACGGGTGAAAGTGGGTTGACTGTTTTAGACTGTTGATCA
304    Y R G S G Y Q F I H A A D M L Y C A E S H M R M M R T G E S G L T V F R L L T K
1 321  ACAGAACCTCTGGATTGGATACAGTCCAATGCCAGACTGTCTACAAAAATGGGCAACAGATTGCATCATTGCCTCTCAGAGAGTTATCAGGACAGGAGGGTGAGGAAACCTGGG
344    Q N L W I W I Q S N A R L V Y K N G Q P D C I I A S Q R V I T D E E G E E N L G
1 441  AAAGCGTGTATGATGCTTCCCTCAGTTTACTACAGGAGAGGCTTCTCTATCAGCAGAACTCCAGATCTCTGGGTAACACTACAGCTTCTGATCTACTGCTCCAGCAACAA
384    K R A M M L P F S F T T G E A V L Y D T N L P R S L G N T T A S D N L N L P R S L G N T T A S D N L N L P R S L G N T T A S D N L N
1 561  TACCAACTCAGAACCACTGGAAGTGTAGACCCGACTCCCTGCTGGGCTCCATGCTGAAGCAGGACAGTCAATATATGTGTCTCAGATGAGCGCTCAGTGTGCTGACAGGCGCTT
424    T Q L R T T G T V D P D S L L G S M L K Q D E S I Y V C S A D E R S V S V Q G L
1 681  AGGGAATGAGGATCTCAGTGGGATCTTCAAGTAACTGGCAAGGAAGTGTCTTCCACCTCTGAAAGCTCTCCGTCAAAACAAGAACCAATATTGGCTCTGGAGGAGACGAACTG
464    G N E D L S G I F S S N W Q G S V L S P S E S S P F K Q E P I I G S G G D D N C
1 801  TGAATACTGAACTTTAGGGAGTTAGGCATCAGCCAGAAAGCTGAAGTCTCTACAACAAGCAAGCACTTTTCTCAGGATTGACCTTGATGGTGGGAATGACGTGGCAGACCTTAC
504    E I L N F M G S L G I S P E D L K F L Q D E L F L R I D L D G R N D V A D L T
1 921  AGATGGCATCTGTCTATGTCAACAGTCTCTCAGGGCGAAGCAGGACTGTATAGTGTGATGTCAGGACAAATGTGAAGGAGAAGTGTCTTGTGGGAAGCCTATGACAGATCTTACCCC
544    D G I L S Y V Q Q S L R A K T D C I G D V Q D N V K E K C L V G K P M Q I F T P
2 041  TCCACAGCAAGCTCCTATGTTAATCCACAGGAATCATGTGATCTCTCTCATTAGTACCTCAGGAAACAGAGTACTTTACAATAGAAAATCCACAACACTTACACGAATACAACC
584    P Q Q A P M L I P Q E S C D P L S L V P Q E Q Q M T F T I E N P Q H F T R I Q P
2 161  TCACACTGAAGTGCAGCTACTGCAGATCTCCAAAACATCTCAAGGACAGCAACACAAATGTCTCAACCAATAAAGAGACAGGAATCACACAATCAAACCTTACACATTACAAT
624    H T E L Q A T A D D L Q N I P Q G Q H T M S Q P N K E T G I T Q F K L S H I T I
2 281  CCAAAAACACCAGGTTGACAGCAGGACCAACATCACAGTCTCATACTTCCACTCTCCATCAGCAGGTATGAAAAACTCAGAAATGCTCAGGTTTGTGGGAACCTCACTGAAGC
664    Q K H Q V Q T T S Q Q S Q C S Y L P P L H Q Q V C K T L R N A Q V C G N L T E A
2 401  TCTAGCCAGTACATGACGAGGTTTCTCCCTCTTCCAGCCAGAGCTCCAACAGCTGATGCTTTTACTGGAGACGCCACTCTGGATCTAAAGACCCCTTTCAGAAATCATCTAAG
704    L A S D M Q Q V L P L F Q P E L Q Q P G C F Y L E T P P L D L K H P F R N H L S
2 521  CACTGTGTCCATCAGCTCCAGCAGCTCTTCACTTATATCACTGCAAGTAAACACAGAGTTGAGAGAGTCACTGCTCAGGAACTGAGAGGCTGCTCAAGGGCTGATGGGATG
744    T V S I S S Q Q L S S P Y I T A S N T G L R E F T A Q E L E E L L K G L D G D M
2 641  GGAGAGAAAGACACTCAGCAGGACAAAAGAGTAGGTGTTGGACCAAGCTTGGATCAACAGCTTACATAGGCCAGTTTCAGAATGGAGGCCACACAACTATGCAATGGAGGCACA
784    E R K R H S G Q D K R V G V G P S L D Q Q A Y I G Q F Q N G G H T N Y A M E A H
2 761  TCTGGCACAACATCTGACCGCCGCAAGAACAAGACCCATCCAAACCTGTCTTTAGGAGGATACTTTGACCACACAGCTGACGATCATGAGAAATAAAGCAAAAAAAAAAAAA
824    L A Q H P D Q R Q N K N R P H P N L S L G G Y F *
2 881  AAAAAAAAAAAAAA

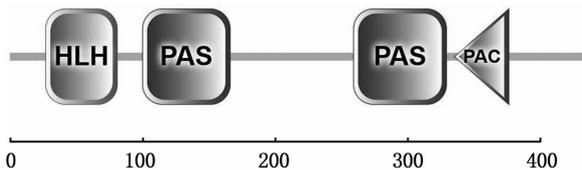
```

下划线为翻译起始和终止密码子, 双下划线为多聚腺苷酸信号基序(AATAAA)。

Underlined are the translation initiation and stop codons. Double - underlined is poly(A) adenylation signal site.

图 1 草鱼 *ahr1a* 基因的 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA sequence and predicted amino acid sequence of *ahr1a* in grass carp



HLH. 螺旋-环-螺旋结构; PAS. 周期芳基烃受体核转运子; PAC. 临近 PAS 基序 C 端的基序。

HLH. helix - loop - helix; PAS. Period - Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator Single Minded, Pre - Arnt - Sim; PAC. Motif C - terminal to PAS motif.

图 2 草鱼 AhR1a 结构域预测

Fig. 2 Predicted structural domains of grass carp AhR1a

2.4 组织表达

为检测 *ahr1a* 基因在草鱼各个组织中的表达情况, 本研究对其在肠、鳃、肾脏、肝脏、头肾、胸腺、脾脏、皮肤和脑中的表达进行 RT-qPCR 分析。结果(图 6)显示, 草鱼 *ahr1a* 在所检测的组织中均有表达, 其中, 肠和鳃中表达量最高, 其余组织中 *ahr1a* 表达量相近。

表2 草鱼 AhR1a 与其他物种 AhR1a 或 AhR 基于氨基酸序列比对的相似性(左下)和一致性(右上)
Tab.2 Similarity (bottom left) and identity (top right) based on amino acid sequence alignment of grass carp AhR1a and AhR1a or AhR of other animals

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>		60.8	74.7	38.8	47.1	40.8	41.5	44.1	42.3	42.3
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	70.5		60.9	37.2	42.4	37.1	38.2	39.8	36.3	43.4
黄河鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	81.5	71.3		39.4	45.8	40.3	39.3	41.9	42.5	42.2
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	45.8	45.4	47.4		38.2	31.7	36.1	36.0	35.0	36.4
斑点雀鳊 <i>Lepisosteus oculatus</i>	58.5	53.8	57.4	45.2		50.3	51.8	55.6	49.4	51.9
小斑猫鲨 <i>Scyliorhinus canicula</i>	52.8	48.8	51.7	38.3	61.6		45.9	50.3	43.6	44.8
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	53.8	51.3	51.5	44.3	63.9	59.4		61.0	53.5	54.8
鸡 <i>Gallus gallus</i>	57.0	52.2	54.3	44.9	68.6	61.3	75.3		60.3	61.8
小鼠 <i>Mus musculus</i>	55.2	49.5	55.2	43.0	60.9	54.5	67.1	71.5		69.4
人 <i>Homo sapiens</i>	54.7	56.8	53.3	45.7	62.7	56.0	66.9	72.5	79.2	

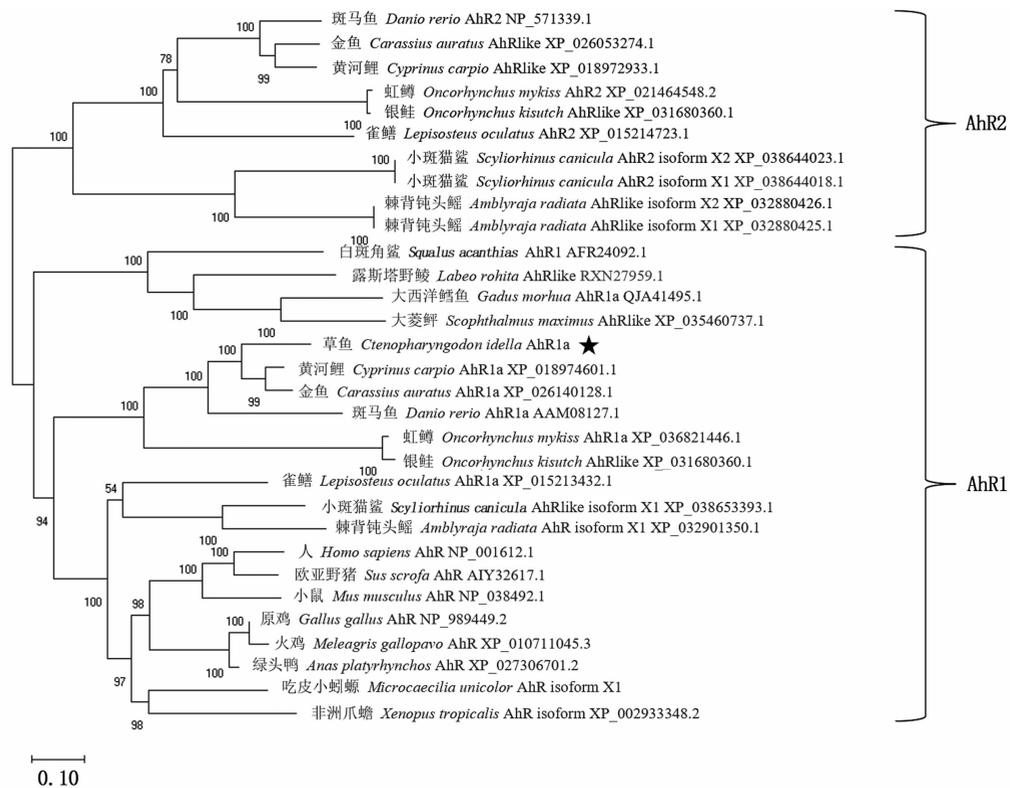


图3 草鱼与其他脊椎动物 AhR 系统进化树分析

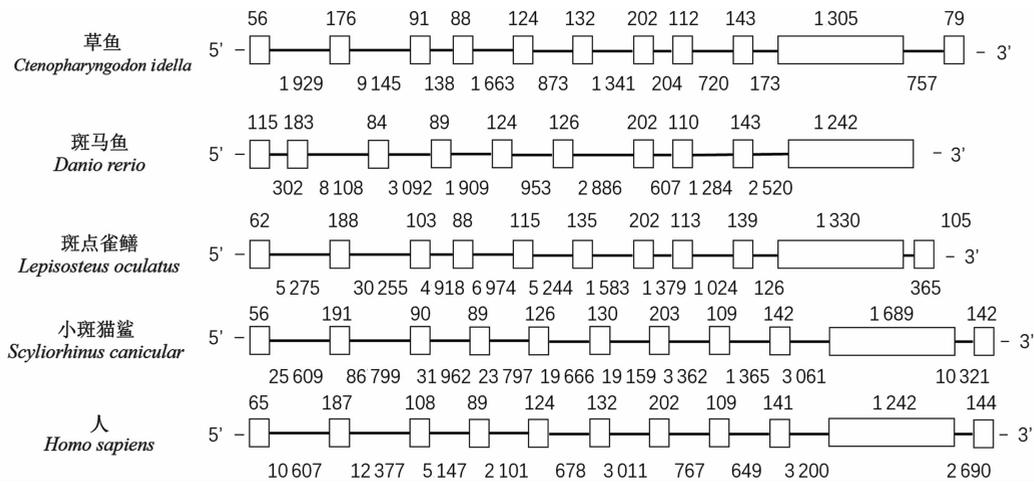
Fig.3 Phylogenetic tree analysis of grass carp and other vertebrate AhR molecules

2.5 柱状黄杆菌感染后草鱼 *ahr1a* 的表达

利用腹腔注射柱状黄杆菌感染草鱼,对照组注射 PBS,在 12、24、48、72 h 后检测 *ahr1a* 在头肾和脾脏中的表达情况(图 7)。与对照组相比:在头肾中,注射柱状黄杆菌 12 和 24 h 后 *ahr1a* 表达量呈现下调,在 48 h 后恢复到本底水平;在脾脏中,*ahr1a* 在 24 和 48 h 表达量显著下降,72 h 表达量与对照组相比无明显变化。

2.6 GCRV- II 对草鱼 *ahr1a* 表达的影响

GCRV- II 是草鱼出血病的流行致病毒株。为研究 *ahr1a* 在病毒感染过程中的表达,本研究利用腹腔注射方式对草鱼进行 GCRV- II 攻毒实验。结果显示(图 8),GCRV- II 感染后第 7 天 *ahr1a* 基因在头肾中上调表达但与对照组无显著差异,在第 14 天呈现显著下调;脾脏中 *ahr1a* 表达水平除了在第 7 天略有上调,其余时间点并无明显变化。



图中白色方框表示外显子,横线表示内含子,外显子和内含子的大小用 bp 表示。内含子和外显子大小与图中方框或横线的长度不成比例。

In the figure, the white squares boxes exons, the horizontal lines represent introns, and the size of exons and introns is represented by bp. That the size of intron and exon is not proportional to the length of the box or horizontal line in the figure.

图 4 *ahr1a/ahr* 基因结构

Fig. 4 Structure of *ahr1a/ahr* genes

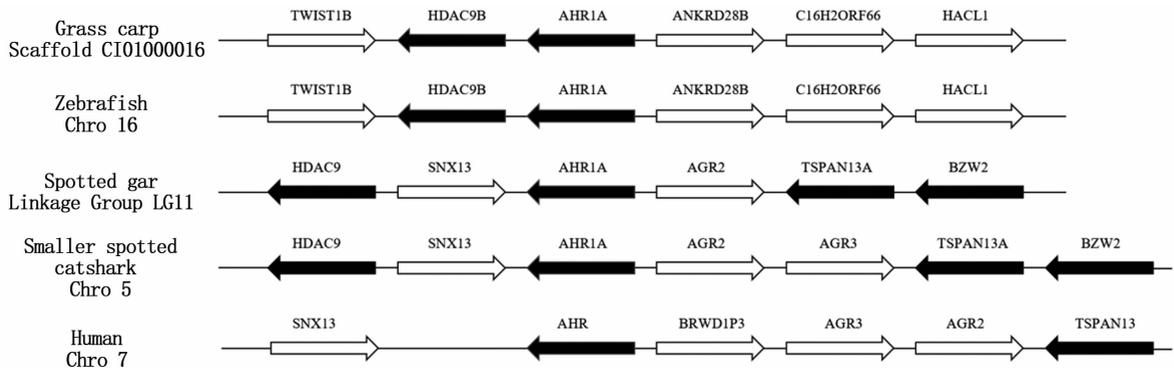


图 5 *ahr1a/ahr* 基因共线性分析

Fig. 5 Synteny analysis of *ahr1a/ahr* genes

2.7 LPS 刺激草鱼原代头肾白细胞中 *ahr1a* 的表达

为明确细菌病原相关分子模式 (Pathogen associated molecular pattern, PAMP) 对草鱼 *ahr1a* 的表达影响,采用 Percoll 从草鱼头肾中分离白细胞,用 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 刺激原代头肾白细胞 1、6、12、24 h(图 9)。RT-qPCR 结果表明,*ahr1a* 表达水平在 LPS 刺激 6 h 后明显下降,12、24 h 恢复到对照组水平。

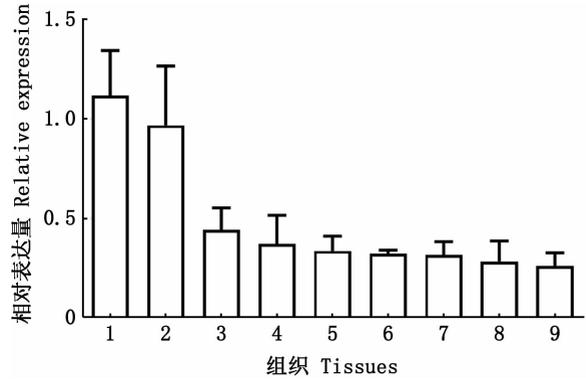
2.8 IL-1 β 刺激草鱼原代头肾白细胞后 *ahr1a* 表达水平

IL-1 β 是主要促炎症细胞因子,为了探究 IL-1 β 对 *ahr1a* 表达水平的影响,本研究在大肠杆菌中表达并纯化了 IL-1 β 成熟肽 (F¹³⁰-K²⁷⁰) 重组蛋白(图 10),SDS-PAGE 显示,考马斯亮蓝染色检测到单一条带,表明 IL-1 β 重组蛋白纯度高,其相对分子质量约为 15 ku,跟理论值 15.49 ku 吻合。用 IL-1 β 重组蛋白(500 ng/mL) 刺激草鱼原代头

肾白细胞 6 和 12 h,用 RT-qPCR 分析 *il-1β*、*il-8*、*ahr1a* 表达情况。结果(图 11)表明,*il-1β* 和 *il-8* 表达水平显著上调,表明 IL-1β 重组蛋白具有生物活性,而且下调 *ahr1a* 表达。

3 讨论

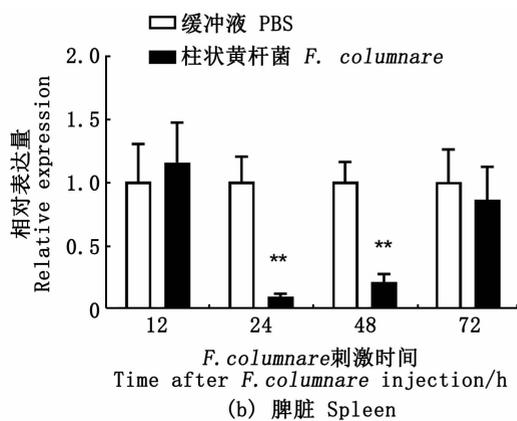
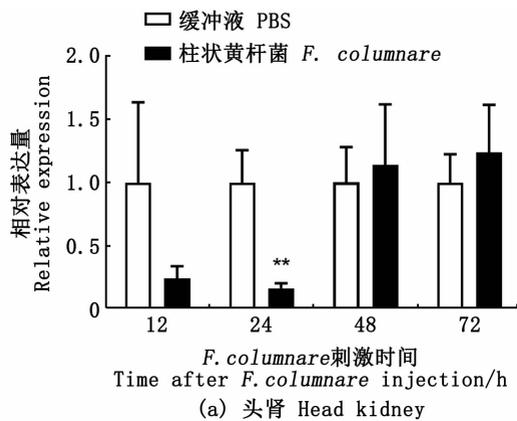
鱼类对各种芳香烃化合物等有机环境污染物质特别敏感,长期暴露于芳香烃化合物中会严重影响机体功能并最终导致死亡^[33]。因此,芳香烃受体对鱼类个体生长、发育和免疫系统的稳态维持发挥至关重要的作用。



1. 肠; 2. 鳃; 3. 肾脏; 4. 肝脏; 5. 头肾; 6. 胸腺; 7. 脾脏; 8. 皮肤; 9. 脑。
1. Intestine; 2. Gill; 3. Kidney; 4. Liver; 5. Head kidney; 6. Thymus; 7. Spleen; 8. Skin; 9. Brain.

图 6 草鱼 *ahr1a* 的组织表达 (n=4)

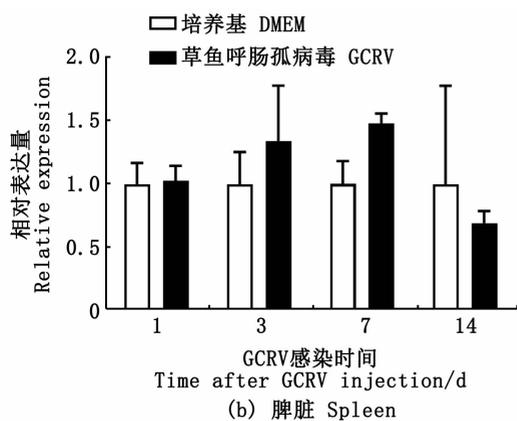
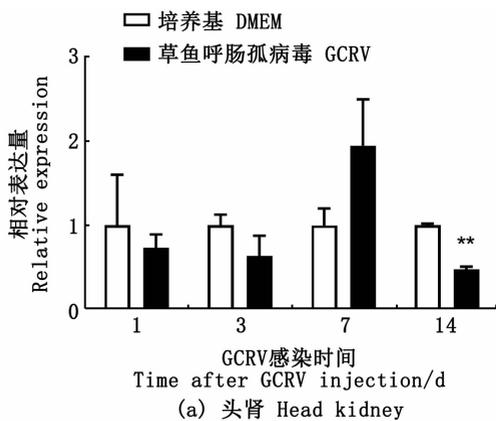
Fig.6 Expression of grass carp *ahr1a* in tissues (n=4)



* * . $P < 0.01, n = 4$ 。

图 7 草鱼在感染柱状黄杆菌后头肾和脾脏中 *ahr1a* 基因 mRNA 表达

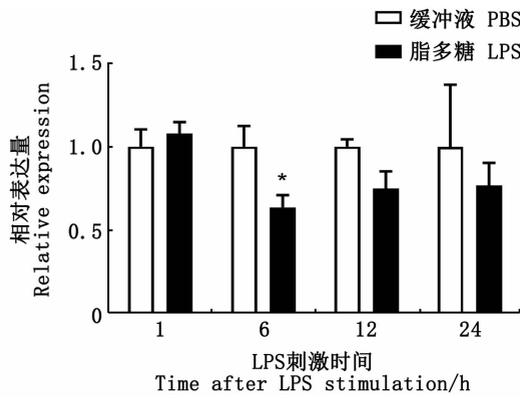
Fig.7 mRNA expression of *ahr1a* in grass carp head kidney and spleen after infection with *F. columnare*



* * . $P < 0.01, n = 4$ 。

图 8 草鱼在感染 GCRV-II 后头肾和脾脏中 *ahr1a* mRNA 的表达

Fig.8 mRNA expression of *ahr1a* in grass carp head kidney and spleen after infection with GCRV-II



*. $P < 0.05$.

图9 LPS 刺激草鱼头肾原代白细胞后 *ahr1a* mRNA 表达 ($n = 4$)
Fig.9 mRNA expression of grass carp *ahr1a* in the primary head kidney leukocytes after LPS stimulation ($n = 4$)

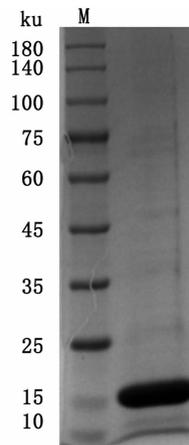
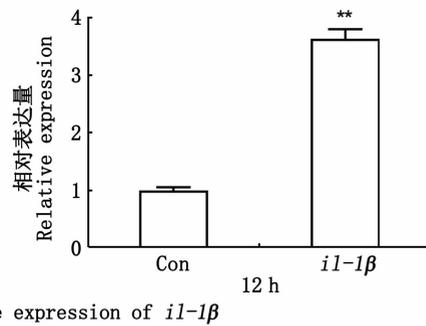
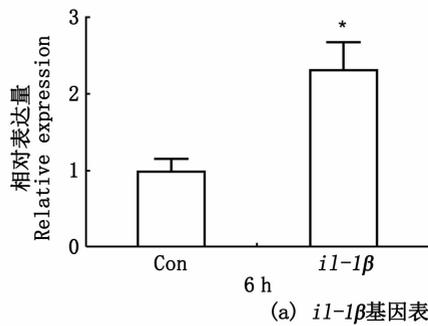
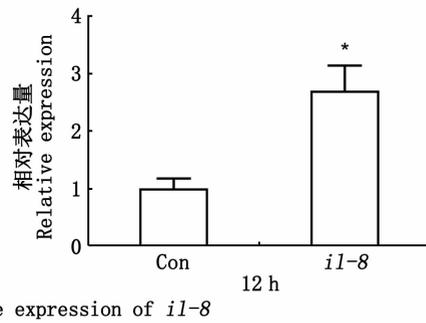
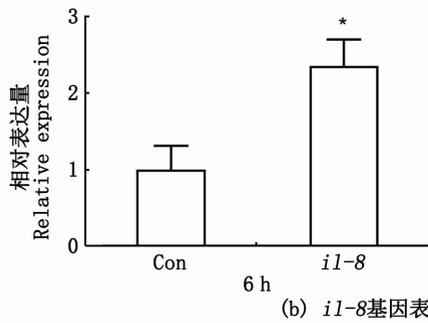


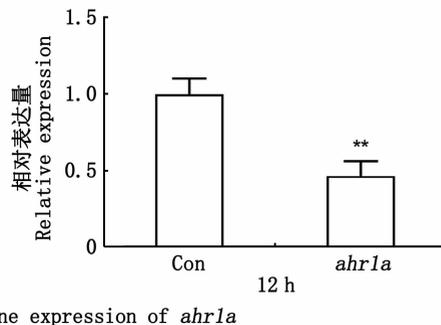
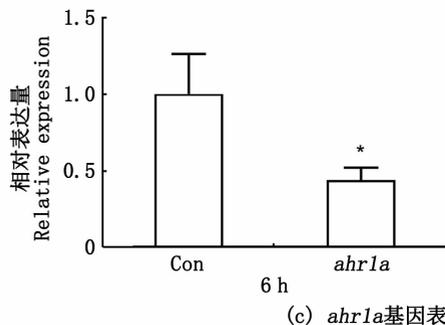
图10 草鱼 IL-1β 重组蛋白 SDS-PAGE 图
Fig.10 SDS-PAGE of grass carp recombinant IL-1β



(a) *il-1β* 基因表达 Gene expression of *il-1β*



(b) *il-8* 基因表达 Gene expression of *il-8*



(c) *ahr1a* 基因表达 Gene expression of *ahr1a*

Con. 高温变性的 IL-1β 重组蛋白; *. $P < 0.05$, *. *. $P < 0.01$, $n = 4$ 。

Con. Heat-denatured recombinant IL-1β; *. $P < 0.05$, *. *. $P < 0.01$, $n = 4$ 。

图11 草鱼 IL-1β 重组蛋白刺激草鱼原代头肾白细胞后 *il-1β*、*il-8* 和 *ahr1a* mRNA 表达
Fig.11 mRNA expression of grass carp *il-1β*、*il-8* and *ahr1a* in the primary head kidney leukocytes after stimulation with recombinant IL-1β

对玲珑星鲨 (*Mustelus canis*)^[34]、底鳎^[14]、斑马鱼^[35]的研究表明,鱼类存在两种不同的 *ahr* 基因谱系 (*ahr1* 和 *ahr2*)。哺乳动物含有 1 个 *ahr* 基因,与鱼类 *ahr1* 进化关系较近。本研究克隆并分析了草鱼 *ahr1a* 基因,发现其蛋白序列包含哺乳动物中 AhR 同源物的特征基序,包括典型的螺旋-环-螺旋 (bHLH) 和 PER-ARNT-SIM (PAS) 结构域,其 C 端与其他物种的 AhR 相比具有极低的序列相似性。此外,草鱼 AhR1a 不具有哺乳动物中特有的 1 个 AhR 转录活性所必须的反式激活结构域,这与先前对鱼类 AhR 的研究^[36] 结果一致。系统进化树分析表明,草鱼 AhR1a 与黄河鲤、金鱼 AhR1a 聚为一支,表明 AhR1a 在鲤科鱼类中具有较高的保守性。草鱼 *ahr1a* 基因含有 11 个外显子和 10 个内含子,而斑马鱼仅含有 10 个外显子和 9 个内含子,提示 *ahr* 基因家族的外显子数量并不固定,可能由两个原因造成:一是 AhR 之间氨基酸序列 C 末端保守性极低;二是真骨鱼类经历特有的第 3 次全基因组复制事件^[37-38],因此 *ahr* 基因家族的基因结构存在差异也就不足为奇了。共线性分析表明,斑马鱼和草鱼 *ahr1a* 基因座十分相似,而全骨鱼类中的典型物种斑点雀鲷基因座更偏向于哺乳类。

鱼类中 *ahr1* 和 *ahr2* 基因在各种组织中呈差异表达,例如,在斜带石斑鱼^[29] 中,*ahr1* 在脾脏、肠和巨噬细胞中大量表达,而 *ahr2* 表达仅局限于肠道,暗示不同的 *ahr* 家族成员在不同的组织中可能发挥不同的作用。本研究对健康草鱼 9 种组织中 *ahr1a* 的表达进行了 RT-qPCR 分析。结果显示,草鱼 *ahr1a* 在肠、鳃、肾脏中表达量最高 (图 6)。因此可以推测,*ahr1a* 可能与鱼类免疫系统发生具有潜在关联,参与免疫细胞的增殖和分化。柱状黄杆菌是黄杆菌科中一种常见的鱼类致病菌^[39]。草鱼呼肠孤病毒能够引发草鱼病毒性出血病,是危害最大的草鱼传染性病毒病原^[40]。本研究用柱状黄杆菌感染草鱼,发现在细菌感染后,头肾 (6、12 h) 和脾脏 (24、48 h) 中的 *ahr1a* 表达均出现下调 (图 7),提示 AhR 参与宿主应答细菌的早期免疫反应,尤其是细菌介导的炎症反应。有研究^[21] 表明 AhR 是 Th17 细胞分泌 IL-22 所必需的,AhR 通过与许多胞内转录因子 (如 NF- κ B、STATs 等) 进行互作^[5],激活下游信号通路,诱导 IL-22 的合成和分泌。此外,AhR

的激活亦会抑制过度炎症反应^[23],减少过度炎症反应诱发的机体损伤。本研究发现,GCRV-Ⅱ感染后头肾中和脾脏中的 *ahr1a* 表达没有明显变化 (除感染 14 d 头肾中下调),*ahr1a* 是否参与宿主应答病毒感染的免疫反应仍不明确。

有研究^[41] 推测,AhR 可能是细菌病原体的模式识别受体。LPS 为革兰氏阴性菌分泌的内毒素,是典型的细菌病原体相关分子模式,能够激活促炎基因的表达^[42]。用 LPS 刺激草鱼原代头肾白细胞,发现 6 和 12 h 后 *ahr1a* 呈下调表达 (图 9),此外,IL-1 β 重组蛋白也下调 *ahr1a* 表达 (图 11),LPS 和 IL-1 β 均能激活促炎因子的表达^[43],这暗示 *ahr1a* 在白细胞中的表达受到细菌 PAMP 和促炎细胞因子的抑制。然而,在斜带石斑鱼中,沉默 *ahr1a* 会显著降低细菌感染诱导的 *il-1 β* 和 *il-8* 表达水平^[29],这可能是与炎症反应的强度相关。AhR1a 调控鱼类炎症反应的作用机制尚待进一步研究。

综上所述,本研究克隆分析了草鱼 *ahr1a* 基因并对其 mRNA 表达情况进行了研究。结果显示,草鱼 AhR1a 具有保守的功能结构域。*ahr1a* 在健康草鱼中成常量表达,在细菌感染后表达下调,病毒感染后变化不明显。细胞因子 IL-1 β 抑制草鱼头肾原代细胞中 *ahr1a* 的表达,暗示其参与炎症反应的调控,但其具体调控机制尚不明确。研究结果为进一步明晰硬骨鱼类 *ahr1a* 的功能提供了一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 殷樱,贾功伟. 芳香烃受体在细胞免疫调节中的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(11): 1002-1004, 1008. YIN Y, JIA G W. The aryl hydrocarbon receptor in cellular immunoregulation [J]. Immunological Journal, 2012, 28(11): 1002-1004, 1008.
- [2] ABEL J, HAARMANN-STEMMANN T. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology[J]. Biological Chemistry, 2010, 391(11): 1235-1248.
- [3] SAFE S, LEE S O, JIN U H. Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target[J]. Toxicological Sciences, 2013, 135(1): 1-16.
- [4] ESSER C, RANNUG A, STOCKINGER B. The aryl hydrocarbon receptor in immunity[J]. Trends in Immunology, 2009, 30(9): 447-454.
- [5] KIM D W, GAZOURIAN L, QUADRI S A, et al. The RelA NF- κ B subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary

- cells[J]. *Oncogene*, 2000, 19(48): 5498-5506.
- [6] KIMURA A, NAKA T, NOHARA K, et al. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(28): 9721-9726.
- [7] VOGEL C F A, SCIULLO E, PARK S, et al. Dioxin increases C/EBP β transcription by activating cAMP/protein kinase A[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(10): 8886-8894.
- [8] PROCHÁZKOVÁ J, KABÁTKOVÁ M, BRYJA V, et al. The interplay of the aryl hydrocarbon receptor and β -catenin alters both AhR-dependent transcription and Wnt/ β -catenin signaling in liver progenitors[J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 122(2): 349-360.
- [9] HAHN M E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2002, 141(1/2): 131-160.
- [10] HAHN M E, KARCHNER S I, MERSON R R. Diversity as opportunity: insights from 600 million years of AHR evolution[J]. *Current Opinion in Toxicology*, 2017, 2: 58-71.
- [11] KARCHNER S I, FRANKS D G, HAHN M E. AHR1B, a new functional aryl hydrocarbon receptor in zebrafish; tandem arrangement of *ahr1b* and *ahr2* genes[J]. *Biochemical Journal*, 2005, 392: 153-161.
- [12] GLASAUER S M K, NEUHAUSS S C F. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences[J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 2014, 289(6): 1045-1060.
- [13] HAHN M E, KARCHNER S I. Evolutionary conservation of the vertebrate Ah (dioxin) receptor: amplification and sequencing of the PAS domain of a teleost Ah receptor cDNA[J]. *Biochemical Journal*, 1995, 310(2): 383-387.
- [14] KARCHNER S I, POWELL W H, HAHN M E. Identification and functional characterization of two highly divergent aryl hydrocarbon receptors (AHR1 and AHR2) in the teleost *Fundulus heteroclitus*; Evidence for a novel subfamily of ligand-binding basic helix loop helix-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) factors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(47): 33814-33824.
- [15] YAMAUCHI M, KIM E Y, IWATA H, et al. Molecular characterization of the aryl hydrocarbon receptors (AHR1 and AHR2) from red seabream (*Pagrus major*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2005, 141(2): 177-187.
- [16] HANSSON M C, HAHN M E. Functional properties of the four Atlantic salmon (*Salmo salar*) aryl hydrocarbon receptor type 2 (AHR2) isoforms[J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 86(2): 121-130.
- [17] HANNO K, ODA S, MITANI H. Effects of dioxin isomers on induction of AhRs and CYP1A1 in early developmental stage embryos of medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Chemosphere*, 2010, 78(7): 830-839.
- [18] KARCHNER S, HAHN M. Pufferfish (*Fugu rubripes*) aryl hydrocarbon receptors: unusually high diversity in a compact genome[J]. *Marine Environmental Research*, 2004, 58: 139-140.
- [19] ROY N K, WIRGIN I. Characterization of the aromatic hydrocarbon receptor gene and its expression in Atlantic tomcod[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1997, 344(2): 373-386.
- [20] VELDHOEN M, HIROTA K, CHRISTENSEN J, et al. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2009, 206(1): 43-49.
- [21] VELDHOEN M, HIROTA K, WESTENDORF A M, et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins[J]. *Nature*, 2008, 453(7191): 106-109.
- [22] QUINTANA F J, BASSO A S, IGLESIAS A H, et al. Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor[J]. *Nature*, 2008, 453(7191): 65-71.
- [23] DUARTE J H, DI MEGLIO P, HIROTA K, et al. Differential influences of the aryl hydrocarbon receptor on Th17 mediated responses *in vitro* and *in vivo*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79819.
- [24] JUX B, KADOW S, ESSER C. Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice[J]. *Journal of Immunology*, 2009, 182(11): 6709-6717.
- [25] ESSER C, RANNUG A. The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology[J]. *Pharmacological Reviews*, 2015, 67(2): 259-279.
- [26] FRAUENSTEIN K, SYDLIK U, TIGGES J, et al. Evidence for a novel anti-apoptotic pathway in human keratinocytes involving the aryl hydrocarbon receptor, E2F1, and checkpoint kinase 1 [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2013, 20(10): 1425-1434.
- [27] SOUDER J P, GORELICK D A. Ahr2, but not ahr1a or ahr1b, is required for craniofacial and fin development and TCDD-dependent cardiotoxicity in zebrafish [J]. *Toxicological Sciences*, 2019, 170(1): 25-44.
- [28] CHLEBOWSKI A C, GARCIA G R, LA DU J K, et al. Mechanistic investigations into the developmental toxicity of nitrated and heterocyclic PAHs[J]. *Toxicological Sciences*, 2017, 157(1): 246-259.
- [29] HUANG L X, QI W L, ZUO Y F, et al. The immune response of a warm water fish orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) infected with a typical cold water bacterial pathogen *Aeromonas salmonicida* is AhR dependent [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 113: 103779.
- [30] JIA Z, WANG J Y, CHEN K Y, et al. Identification and

- expression analysis of group II C-type lectin domain containing receptors in grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Gene*, 2021, 789: 145668.
- [31] LI X, YUAN S Y, SUN Z S, et al. Gene identification and functional analysis of peptidoglycan recognition protein from the spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 1014-1024.
- [32] WANG W, WANG J Y, LEI L N, et al. Characterisation of IL-15 and IL-2R β in grass carp: IL-15 upregulates cytokines and transcription factors of type I immune response and NK cell activation [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 107: 104-117.
- [33] HANSSON M C, WITZELL H, PERSSON K, et al. Characterization of two distinct aryl hydrocarbon receptor (*AhR2*) genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and evidence for multiple *AhR2* gene lineages in salmonid fish [J]. *Gene*, 2003, 303: 197-206.
- [34] HAHN M E, KARCHNER S I, SHAPIRO M A, et al. Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (*AHR1* and *AHR2*) and the PAS family [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(25): 13743-13748.
- [35] TANGUAY R L, ABNET C C, HEIDEMAN W, et al. Cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1999, 1444(1): 35-48.
- [36] SHANKAR P, DASGUPTA S, HAHN M E, et al. A review of the functional roles of the zebrafish aryl hydrocarbon receptors [J]. *Toxicological Sciences*, 2020, 178(2): 215-238.
- [37] HAHN M E, KARCHNER S I, EVANS B R, et al. Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mammalian vertebrates: insights from comparative genomics [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 2006, 305(9): 693-706.
- [38] SONG J Y, CASANOVA-NAKAYAMA A, M? LLER A M, et al. Aryl hydrocarbon receptor signaling is functional in immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6323.
- [39] DONG Y W, FENG L, JIANG W D, et al. Dietary threonine deficiency depressed the disease resistance, immune and physical barriers in the gills of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) under infection of *Flavobacterium columnare* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 161-173.
- [40] 盛佳璐, 宗乾坤, 喻飞, 等. 利用原核及真核表达系统体外表达草鱼 II 型呼肠孤病毒外突 VP56 蛋白的研究 [J]. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(4): 469-476.
- SHENG J L, ZONG Q K, YU F, et al. Prokaryotic and eukaryotic expression analysis of outer capsid VP56 protein encoded by type II reovirus of grass carp [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(4): 469-476.
- [41] MOURA-ALVES P, FAË K, HOUTHUYS E, et al. *AhR* sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence [J]. *Nature*, 2014, 512(7515): 387-392.
- [42] 田佳音, 陈康勇, 张畅, 等. 斑马鱼肿瘤坏死因子 (*tnf α*) 及其受体 (*tnfrsf1a*) 应答细菌和病毒感染的表达 [J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(2): 171-179.
- TIAN J Y, CHEN K Y, ZHANG C, et al. Expression analysis of zebrafish tumor necrosis factor (*tnf α*) and its receptor (*tnfrsf1a*) in response to bacterial and viral infections [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(2): 171-179.
- [43] 姚昀, 刘克海, 胡晓倩. 紫檀芪影响脂多糖诱导巨噬细胞炎症因子的变化 [J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(1): 29-36.
- YAO Y, LIU K H, HU X Q. Effects of pterostilbene on lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine expression in macrophages [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(1): 29-36.

Identification, phylogeny and expression analysis of an aromatic hydrocarbon receptor homologue in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

WU Kaizheng, WANG Junya, FAN Dingyue, LI Shiran, XU Jing, WANG Zixuan, ZOU Jun
(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor and plays an important regulatory role in immune response. The AhR is central to the functions of T cells, monocytes and dendritic cells (DCs) and the production of inflammatory cytokines. To understand the roles of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) *ahr1a* gene, we cloned the cDNA of the *ahr1a* gene in grass carp. The *ahr1a* cDNA of *C. idella* is 2 893 bp in length, encoding a protein of 847 aa. It was predicted that grass carp AhR1a protein contains a typical domain of the bHLH-PAS (Period-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator Single Minded, Pre-Arnt-Sim) subfamily which belongs to the helix-loop-helix (HLX) superfamily. Sequence analysis showed that the amino acid similarity and identity between grass carp AhR1a and common carp (*Cyprinus carpio*) were the highest. Phylogenetic tree analysis showed that the AhR1a of *C. idella* was clustered in a clade with homologous amino acid of goldfish (*Carassius auratus*), common carp and zebrafish (*Danio rerio*), all of which belong to the cyprinid family. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis found that *ahr1a* was constitutively expressed in multiple tissues including intestine, gills, kidney, liver, head kidney, thymus, spleen, skin and brain, with the highest expression detected in the intestine and gills. Infection with *Flavobacterium columnare* resulted in significant decreases of the *ahr1a* expression in the spleen (24,48 h) and head kidney (12,24 h). In contrast, infection of grass carp reovirus (Reovirus of grass carp, GCRV) did not alter the expression levels of *ahr1a* in the spleen and head kidney. In the primary head kidney leukocytes, lipopolysaccharide (LPS) and recombinant IL-1 β downregulated the expression of *ahr1a*. In conclusion, the grass carp *ahr1a* gene was analyzed in this study. The results suggest that the *ahr1a* of *C. idella* may be involved in regulating inflammatory response.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *ahr1a*; gene clone; immune response