鱼类免疫因子 Prx 1 和 Prx 2 的研究进展*

郑　琦,邹子鸿,蔡　佳**,简纪常**
(广东海洋大学水产学院,广东湛江　524088)

摘要:Peroxiredoxin 1 (Prx 1)和 Peroxiredoxin 2 (Prx 2)是脊椎动物中一种保守的免疫因子,在鱼类的非特异性免疫中扮演重要角色,也叫作自然杀伤增强因子(Natural killer enhancing factor,NKEF A/B)。两类蛋白的 N 端和 C 端各含有一个活性半胱氨酸位点。Prx 1 和 Prx 2 能清除机体活性氧(ROS)如 H_2O_2,同时还参与鱼体的抗病免疫。本文对鱼类 Prx 1 和 Prx 2 的结构、抗氧化机制、生物学功能进行综述性介绍。

关键词:鱼类　免疫因子　Prx 1　Prx 2　抗氧化蛋白　结构　功能

中图分类号:S94　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1002-7378(2019)03-0172-04

0　引言

近年来,我国水产养殖业发展迅猛,水产养殖产量持续、稳步增长。但是随着水产养殖规模扩大、养殖集约化程度提高,水产养殖中疫病频发,而传统的疾病防治手段会带来养殖环境恶化、致病菌耐药性产生等副作用,严重制约了我国水产养殖业的健康可持续发展。因此开展水生动物免疫学的研究将有助于了解水生动物的抗逆与抗病机制,为制定绿色、环保、高效的疫病防治策略提供理论依据。

Peroxiredoxin (Prxs)家族是一类广泛存在于真核生物中的抗氧化蛋白,最初在酵母中发现。在多种生理或病理过程中细胞会产生多种活性氧基团(Reactive oxygen species,ROS),如 H_2O_2,羟基自由基以及超氧阴离子等[1-2]。ROS 的过量堆积会引起细胞甚至机体的死亡,并且 H_2O_2 还参与许多细胞表面受体的活化,以及作为胞内信使调节胞外信号在细胞内的传递[3]。Prxs 主要的生物学功能就是清除细胞中多余的 ROS[4]。此外,Prxs 还参与了炎症调控与肿瘤发生等多种生理与病理的过程[5]。目前已发现 6 种过氧化物还原蛋白,分别是 Prx 1～Prx 6[2]。根据结构以及作用机理 Prxs 可分为 3 个亚族,所有成员在 N 端均含有一个半胱氨酸残基,根据其在 C 端是否含有另一个半胱氨酸残基以及结构特征,分为典型 2-Cys(Prx 1～Prx 4),非典型 2-Cys(Prx 6),以及 1-Cys(Prx 5)[6]。典型 2-Cys Prxs 在自身肽链的 C 端含有第二个 Cys 残基,但是如果要组成可以行使功能的二聚体,则需要其中一个亚基与另一个亚基的

*国家自然科学基金项目(31302226,31572651)和广东海洋大学优秀硕士学位论文培育项目(201833)资助。
【作者简介】
郑　琦(1993—),男,博士研究生,主要从事水产经济动物免疫学及病害控制研究。
【**通信作者】
蔡　佳(1982—),男,副教授,主要从事水产经济动物免疫学及病害控制研究,E-mail:matrix924@foxmail.com;简纪常(1964—),男,教授,主要从事水产经济动物免疫学及病害控制研究,E-mail:jianjc@gmail.com。
【引用本文】
DOI:10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20190905.004
郑琦,邹子鸿,蔡佳,等.鱼类免疫因子 Prx 1 和 Prx 2 的研究进展[J].广西科学院学报,2019,35(3):172-175,184.
ZHENG Q,ZOU Z H,CAI J,et al. Advance in peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2 of teleost immune factors [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences,2019,35(3):172-175,184.

还原态半胱氨酸残基与之结合[6-7]。

在真核生物中存在最广泛的是典型2-Cys组,其中研究较多的为 Peroxiredoxin 1 (Prx 1)和 Peroxiredoxin 2 (Prx 2)。本文通过对鱼类的 Prx 1 和 Prx 2 的功能研究进行综述,为深入了解该类蛋白在鱼类抗病免疫中的作用与机理提供参考。

1 Prx 1 和 Prx 2 的结构特征

在还原状态下,典型的2-Cys组是二聚体组成的五聚体(十聚体),在氧化状态下为二聚体。尽管β链以头对尾排列的相互作用形成广泛的β折叠使单体与单体结合成的二聚体结构相对稳定,但十聚体结构的稳定却是依赖于二聚体与二聚体面对穿过的α-螺旋基序(主要是α2和α3)[8]。在催化反应过程中,蛋白发生构象变化,将十聚体的每个二聚体功能单元进行完全折叠,活性位点转化为局部展开的构象,以接近过氧化物和游离的半胱氨酸残基,分子间距离变远,其在完全折叠状态下为距离为14 Å,并形成二硫键[8]。而这种变化使二聚体分子能够稳定下来,并行使相关生物学功能[9]。然而,这种二聚体和十聚体之间的转变受到诸如浓度、离子强度、pH值、温度以及化学调节的影响[10-12]。负责这些运动的结构是α3之后的一段延伸C末端保守的YF区段和高度保守的GGLG基序[13],同时GGLG基序还是Prx 1、Prx 2与硫氧还蛋白组成复合物的关键位点,在已报导的物种中,尼罗罗非鱼、裸盖鱼、鮸鱼、斑点叉尾鮰、斑马鱼以及鲤鱼的Prx 1均发现这一基序的存在。此外,Prx 1与Prx 2蛋白的氨基酸序列中 Pro_{44}、Thr_{48}、Arg_{127} 高度保守,使两者在空间结构上形成环-螺旋结构,有效保护Cys的活性[14]。

2 Prx 1 和 Prx 2 的抗氧化机制

Prx 1和Prx 2属于过氧还蛋白家族,在机体调控抗氧化过程中发挥着关键作用。其抗氧化机制的核心依赖于两个活性Cys位点,Cys的突变将导致Prx 1和Prx 2的失活[4]。2-Cys的Prx以同源二聚体形式存在,其中一个亚基的N端Cys和另一个亚基的C端Cys通过脱氢作用形成二硫键,其中氢离子的转移则是依赖还原性辅酶Ⅱ,从而调节2-Cys Prx状态的转换。在一些体外研究发现缺乏还原性辅酶Ⅱ时,DTT和巯基乙醇可以作为供氢体,但是这其中不包含谷胱甘肽[15]。

Prx 1和Prx 2的抗氧化机制在人类中已经进行了比较透彻的研究,同时这两种抗氧化酶在大部分物种中都是高度保守的,于是借鉴人类中已有的研究方法对于鱼类Prx 1和Prx 2的深入研究具有重要意义。在人类中已知的、与这两种抗氧化酶互作的蛋白均含有以下氨基酸基序的一种或几种,即:CXXC,PXXP以及LXXLL。CXXC序列是硫氧还蛋白,谷氧还蛋白中发现的重要氧化还原基序,更常见于蛋白质二硫键异构酶[16]。LXXLL相较于CXXC则在功能上呈现多样性,如序列结合、释放以及转录调控[17]。PXXP则一般认为与SH3结构域互作[18]。在鱼类中,还未见与2-Cys Prx互作蛋白的相关报导,以特征基序为基础,借鉴免疫共沉淀等技术将可以更好地帮助鱼类2-Cys Prx及其相关互作蛋白的发掘以进行更深入的研究。

3 Prx 1 与 Prx 2 的生物学功能

Prx 1在鱼类多种组织中均有表达,虹鳟、斑点叉尾鮰以及大菱鲆等鱼类中Prx 1主要高表达于肝脏、肾脏、鳃以及血液淋巴细胞中[19-22],Southern Blot实验显示虹鳟Prx 1为单拷贝[19]。在多种病原如细菌、病毒与寄生虫刺激后,多种鱼类的免疫器官如头肾、脾脏中的Prx 1表达显著上调[22-24]。在脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)刺激后,斑点叉尾鮰Prx 1还发现了二次上调的趋势;在青斑河豚中,LPS刺激能诱导脾脏中Prx 1的表达,但是肾脏、脑、鳃以及皮肤中的Prx 1则有不同程度的下调[23]。在鱼虱刺激后,鲑鱼的头肾淋巴细胞、脾脏、鳃和皮肤均检测到Prx 1蛋白的表达,免疫组化结果显示以上组织中存在大量阳性信号[25],患有阿米巴鳃病的大西洋鲑中Prx 1的表达则下调,表明针对不同病原鱼类Prx 1在免疫反应中可能具有正调控与负调控两种模式。与哺乳动物Prx 1功能相似,原核表达的鱼类Prx 1能介导抗氧化反应,增强大肠杆菌中Thioredoxin(Trx)介导的 H_2O_2 还原作用[26]。重组条石鲷Prx 1蛋白则能抑制 H_2O_2 对机体造成的氧化效果,促进头肾淋巴细胞的增殖[27]。金头鲷、欧洲海鲈、大菱鲆以及鲤鱼的Prx 1也具有类似的生物学功能[21,24,28]。此外,斑马鱼Prx 1对于其血管的生成具有重要作用[29]。大腹海马的Prx 1可减少超螺旋DNA受到的氧化损伤,且还具有清除ROS以及提高细胞存活率等生物学功能[22]。Prx 1除了参与鱼类机体的免疫调节,在斑马鱼中对于其血管的生成具有重要作用[29]。

同一物种的 Prx 2 和 Prx 1 蛋白具有较高相似度,一般在 70%以上[20],也含有 2 个活性 Cys 活性位点。目前关于鱼类 Prx 2 的功能报道较少,仅对不同鱼类在病原刺激后的表达模式进行了分析。组织分布结果显示鱼类 Prx 2 大量表达于肝脏、头肾与血液[30-31]。鲤春病毒血症病毒(Spring viremiao of carp virus,SVCV)刺激后,鲤鱼 Prx 2 在外周血淋巴细胞、鳃、脾脏以及肠中显著性上调,肾和头肾中显著性下调,但 Prx 1 仅在外周血淋巴细胞中显著上调,鳃中下调[31]。嗜水气单胞菌感染后,香鱼肝脏中的 Prx 2 表达量也呈上调趋势[30]。LPS 刺激后,青斑河豚 Prx 2 的表达则仅在脾脏中上调,肝脏无明显变化,其余组织中的表达均显著性下调[23]。

上述结果显示,尽管鱼类 Prx 1 和 Prx 2 具有较高的相似度,但是两者在组织分布及病原刺激后的表达模式均不一致,表明上述两种蛋白在鱼体中可能具有不同的生物学功能,并且人类 Prx 1 和 Prx 2 除了具有抗氧化功能,还具有增强 NK 细胞杀伤活性与抗病毒等作用[14]。这些功能在鱼类中均未见报道,因此鱼类 Prx 1 和 Prx 2 两类蛋白功能还有待进一步的发掘。

4 展望

Prx 1 与 Prx 2 广泛存在于脊椎动物中,在生物免疫调控或维持机体稳态中发挥着重要作用。哺乳动物 Prx 1 与 Prx 2 主要的功能为抗氧化,清除生理或者病理过程中产生的 ROS,保护 DNA 免受氧化损伤,还能增强 NK 细胞的杀伤活性,因此这两个基因又被称为 Natural Killer Enhancing Factor(NKEF)。在研究人类 Prx 1 和 Prx 2 过程中,诸多体外实验通过添加氧化剂来验证该基因的功能,或利用抗原抗体特异性结合来封闭 Prx 1 和 Prx 2 的关键位点从而探究其功能。此外利用 Co-IP 或 GST-Pulldown 等体内外蛋白互作实验发现相关互作蛋白,将人源 Prx 1 的重组蛋白与 NK 细胞共培养后显著增强 NK 细胞对肿瘤或部分异源细胞的杀伤作用。而鱼类 Prx 1 与 Prx 2 的研究表明两类蛋白同样也参与了鱼体的抗病免疫,但是目前较多的研究方法是病原刺激后,通过 qRT-PCR 实验探究这两种基因转录水平的变化,或者探究重组蛋白与氧化剂的拮抗作用,蛋白互作及更深层次功能机制尚需进一步的解析,本文对已经报道的鱼类 Prx 1 与 Prx 2 进行了综述,将有助于深入了解鱼类 Prx 1 与 Prx 2 在鱼类抗病免疫中的作用机理,为制定水生动物疫病防控对策提供参考。

参考文献

[1] ARAKI M,NANRI H,EJIMA K,et al. Antioxidant function of the mitochondrial protein SP-22 in the cardiovascular system[J]. The Journal of Biological Chemistry,1999,274(4):2271-2278.

[2] 颜晟. 人抗氧化蛋白 Peroxiredoxin 1 和 2 的表达、纯化及功能研究[D]. 广州:华南理工大学,2012.

[3] PROSPÉRI M T,FERBUS D,KARCZINSKI I,et al. A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins [J]. Journal of Biological Chemistry,1993,268(15):11050-11056.

[4] 章波,向渝梅,白云. 抗氧化蛋白 Peroxiredoxin 家族研究进展[J]. 生理科学进展,2004(4):352-355.

[5] BOTIA B,SEYER D,RAVNI A,et al. Peroxiredoxin 2 is involved in the neuroprotective effects of PACAP in cultured cerebellar granule neurons [J]. Journal of Molecular Neuroscience:MN,2008,36(1-3):61-72.

[6] WOOD Z A,POOLE L B,KARPLUS P A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling [J]. Science (New York, N. Y.), 2003, 300 (5619):650-653.

[7] HOFMANN B,HECHT H J,FLOHE L. Peroxiredoxins [J]. Biological Chemistry,2002,383(3-4):347-364.

[8] HALL A,KARPLUS P A,POOLE L B. Typical 2-Cys peroxiredoxins — structures, mechanisms and functions [J]. The FEBS Journal,2009,276(9):2469-2477.

[9] KARPLUS P A. A primer on peroxiredoxin biochemistry [J]. Free Radical Biology & Medicine,2015,80:183-190.

[10] MATSUMURA T,OKAMOTO K,IWAHARA S,et al. Dimer-oligomer interconversion of wild-type and mutant rat 2-Cys peroxiredoxin:disulfide formation at dimer-dimer interfaces is not essential for decamerization [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283 (1):284-293.

[11] PARK J W,PISZCZEK G,RHEE S G,et al. Glutathionylation of peroxiredoxin Ⅰ induces decamer to dimers dissociation with concomitant loss of chaperone activity [J]. Biochemistry,2011,50(15):3204-3210.

[12] BARRANCO-MEDINA S,KAKORIN S,LÁZARO J J,et al. Thermodynamics of the dimer-decamer transition of reduced human and plant 2-cys peroxiredoxin [J]. Biochemistry,2008,47(27):7196-7204.

[13] BERTOLDI M. Human Peroxiredoxins 1 and 2 and their interacting protein partners: Through structure toward functions of biological complexes [J]. Protein and Peptide Letters,2016,23(1):69-77.

[14] 孙晶,薛壮,王歆睿,等.自然杀伤细胞增强因子研究进展[J].生命的化学,2014,34(2):235-240.

[15] WOO H A,CHAE H Z,HWANG S C,et al. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation [J]. Science (New York, N. Y.),2003,300(5619):653-656.

[16] FOMENKO D E,GLADYSHEV V N. Identity and functions of CxxC-derived motifs [J]. Biochemistry, 2003,42(38):11214-11225.

[17] PLEVIN M J,MILLS M M,IKURA M. The LxxLL motif:A multifunctional binding sequence in transcriptional regulation [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2005,30(2):66-69.

[18] TONG A H Y,DREES B,NARDELLI G,et al. A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules [J]. Science (New York, N. Y.),2002, 295(5553):321-324.

[19] ZHANG H,EVENHUIS J P,THORGAARD G H,et al. Cloning, characterization and genomic structure of the natural killer cell enhancement factor (NKEF)-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Developmental and Comparative Immunology,2001,25(1):25-35.

[20] LI R W,WALDBIESER G C. Genomic organisation and expression of the natural killer cell enhancing factor (NKEF) gene in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) [J]. Fish & Shellfish Immunology,2006,20(1):72-82.

[21] CHEN Y,ZHANG Y-X,FAN T-J,et al. Molecular identification and expression analysis of the natural killer cell enhancing factor (NKEF) gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquaculture,2006,261 (4):1186-1193.

[22] GODAHEWA G I,PERERA N C N,LEE J. Insights into the multifunctional role of natural killer enhancing factor-A (NKEF-A/Prx1) in big-belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*): DNA protection, insulin reduction, H_2O_2 scavenging, and immune modulation activity [J]. Gene,2018,642:324-334.

[23] DONG W R,XIANG L X,SHAO J Z. Cloning and characterisation of two natural killer enhancing factor genes (NKEF-A and NKEF-B) in pufferfish, *Tetraodon nigroviridis* [J]. Fish & Shellfish Immunology,2007,22(1/2):1-15.

[24] ESTEBAN M A,CHAVES-POZO E,ARIZCUN M,et al. Regulation of natural killer enhancing factor (NKEF) genes in teleost fish, gilthead seabream and European sea bass [J]. Molecular Immunology,2013, 55(3/4):275-282.

[25] BETHKE J,ROJAS V,BERENDSEN J,et al. Development of a new antibody for detecting natural killer enhancing factor (NKEF)-like protein in infected salmonids[J]. Journal of Fish Diseases,2012,35(5):379-388.

[26] LOO G H,SUTTON D L,SCHULLER K A. Cloning and functional characterisation of a peroxiredoxin 1 (NKEF A) cDNA from Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its expression in fish infected with *Neoparamoeba perurans* [J]. Fish & Shellfish Immunology,2012,32(6):1074-1082.

[27] KIM J W,CHOI H S,KWON M G,et al. Molecular identification and expression analysis of a natural killer cell enhancing factor (NKEF) from rock bream *Oplegnathus fasciatus* and the biological activity of its recombinant protein [J]. Results in Immunology, 2011,1(1):45-52.

[28] SHIN D H,FUJIKI K,NAKAO M,et al. Organization of the NKEF gene and its expression in the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Developmental and Comparative Immunology,2001,25(7):597-606.

[29] HUANG P C,CHIU C C,CHANG H W,et al. Prdx1-encoded peroxiredoxin is important for vascular development in zebrafish [J]. FEBS letters,2017,591(6): 889-902.

[30] CHEN J,WU H Q,NIU H,et al. Increased liver protein and mRNA expression of natural killer cell-enhancing factor B (NKEF-B) in ayu (*Plecoglossus altivelis*) after *Aeromonas hydrophila* infection [J]. Fish & Shellfish Immunology,2009,26(3):567-571.

[31] HUANG R,GAO L Y,WANG Y P,et al. Structure, organization and expression of common carp (*Cyprinus carpio* L.) NKEF-B gene [J]. Fish & Shellfish Immunology,2009,26(2):220-229.

(下转第184页 Continue on page 184)

pression plasmid pET28a-VP38 was constructed and transformed into BL21 competent cells, the expression of recombinant fusion protein was induced by IPTG and dissolved in 8 mol/L urea, the mice were immunized with recombinant protein to prepare mouse anti-VP38 polyclonal antibodies. Western blot and indirect immune-fluorescence analysis (IFA) were carried out to evaluate the antibody. The expression kinetics of VP38 at the translation level after GCRV-104 infection was investigated with the prepared antibodies. The antibody was evaluated by Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA). The eukaryotic expression vector pEGFP-N1-VP38 was constructed and transfected into grass carp GCO cells for sub-cellular localization analysis. The results showed that the recombinant VP38 protein existed as an inclusion body in the prokaryotic expression system. The prepared mouse anti-VP38 polyclonal antibody could recognize both the recombinant VP38 protein and the VP38 protein expressed by GCO cells infected with GCRV-104. VP38 was mainly distributed in the cytoplasm 72 h after GCRV-104 infection, which was consistent with the results of sub-cellular localization. VP38 was expressed in a small amount in the early stage of infection and in a large amount in the middle and late stage of infection. The mouse anti-VP38 polyclonal antibody prepared in this study has higher titer and better specificity, and provides a better technical route for constructing the immunological detection method of genotype Ⅲ grass carp reovirus.

Key words: Genotype Ⅲ grass carp reovirus, outer shell protein, expression analysis, polyclonal antibodies, immunological detection

责任编辑:陆　雁

(上接第 175 页 Continue from page 175)

Advance in Peroxiredoxin 1 and Peroxiredoxin 2 of Teleost Immune Factors

ZHENG Qi, ZOU Zihong, CAI Jia, JIAN Jichang

(College of Fishery, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong, 524088, China)

Abstract: Peroxiredoxin 1 (Prx 1) and Peroxiredoxin 2 (Prx 2) are conserved immune factors in vertebrates and play an important role in teleost innate immunity, which are also known as Natural Killer Enhancing Factor (NKEF A/B). Both types of proteins contain an active cysteine site at the N-terminus and C-terminus, respectively. Prx 1 and Prx 2 can eliminate reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 and also participate in anti-pathogeny immune responses. In this paper, the structure, antioxidant mechanism and biological function of fish Prx 1 and Prx 2 were reviewed.

Key words: fish, teleost, peroxiredoxin 1, peroxiredoxin 2, immunity, structure, function

责任编辑:符支宏

微信公众号投稿更便捷
联系电话:0771-2503923
邮箱:gxkxyxb@gxas.cn
投稿系统网址:http://gxkx.ijournal.cn/gxkxyxb/ch