

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170401002

http://www.yykxjz.cn/

马慧鑫, 王磊, 汪林庆, 周茜, 陈松林. 牙鲆精氨酸酶 II 基因的克隆以及免疫应答表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 44–52
Ma HX, Wang L, Wang LQ, Zhou Q, Chen SL. The different expression patterns of the gene Arginase II in *Paralichthys olivaceus* and the correlation between its expression and *Edwardsiella tarda* infection. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 44–52

牙鲆精氨酸酶 II 基因的克隆以及 免疫应答表达分析*

马慧鑫^{1,2} 王磊^{1,3①} 汪林庆^{1,4} 周茜^{1,3} 陈松林^{1,3}

- (1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程
功能实验室 青岛 266071; 4. 福州大学生物科学与工程学院 福州 350116)

摘要 本研究克隆得到牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)精氨酸酶 II 基因(Arginase II, *Arg- II*)全长 cDNA 序列, 并检测了 *Arg- II* 在牙鲆免疫组织和细菌感染过程中的时空表达模式。结果显示, *Arg- II* 基因 cDNA 全长 1882 bp, 包含 1050 bp 开放阅读框, 编码 349 个氨基酸(预测分子量为 38.02 kDa, 等电点为 6.42)。 *Arg- II* 基因编码的氨基酸序列具有典型的精氨酸酶结构特征, 推测与哺乳动物中的功能类似。系统进化分析显示, 鱼类 *Arg- II* 基因合成一簇, 其中, *Arg- II* 基因与鲈鱼(*Lates calcarifer*) 相关度最高(93%)。实时荧光定量结果显示, *Arg- II* 基因在健康牙鲆的肝、脾和鳃等免疫组织中有较高表达。进一步研究发现, 经迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)感染的牙鲆成鱼中, 主要免疫组织中 *Arg- II* mRNA 的表达量在细菌感染后 6~12 h 显著上调, 随后表达量恢复正常。离体培养的牙鲆巨噬细胞经迟缓爱德华氏菌感染后, *Arg- II* 基因也呈显著上调模式。因此, 本研究结果表明, *Arg- II* 基因参与牙鲆响应迟缓爱德华氏菌感染的免疫过程, 揭示 *Arg- II* 基因可能在牙鲆抗病免疫中发挥重要作用。

关键词 牙鲆; 精氨酸酶 II; 迟缓爱德华氏菌; 免疫表达; 巨噬细胞

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)03-0044-09

L-精氨酸主要通过“精氨酸酶”途径和“NO”途径参与机体代谢过程。精氨酸酶(Arginase)催化 L-精氨酸生成鸟氨酸和尿素, 鸟氨酸是合成多胺类物质的前体, 而多胺是重要的代谢调控物质。一氧化氮合酶(NOS)分解 L-精氨酸生成瓜氨酸和一氧化氮(Munder *et al.*, 2009)。两条途径之间相互抑制, 共同调节精氨酸的

代谢。病理条件下, 精氨酸酶和一氧化氮合酶的动态平衡被打破, 多胺、NO 等产物含量发生变化, 导致多种病理反应和免疫失调(孙红暖等, 2014; 王琦, 2015)。

巨噬细胞是脊椎动物先天性免疫反应和特异性免疫的主要执行者, 在免疫防御和组织修复等过程中发挥重要作用。精氨酸酶是巨噬细胞极化的重要标志,

* 国家自然科学基金(31461163005)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2016HY-ZD02)、山东省自然科学基金(ZR2016QZ003)和山东省泰山学者攀登计划项目共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31461163005), Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD02), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016QZ003), and Taishan Scholar Climbing Project, Shandong, China]. 马慧鑫, E-mail: 1129220691@qq.com

① 通讯作者: 王磊, E-mail: leileiwang@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-01, 收修改稿日期: 2017-04-26

在替代激活型巨噬细胞中高表达,参与机体免疫反应(Morris *et al*, 1998)。在炎症发生过程中,活化的巨噬细胞能够将 L-精氨酸水解成 L-鸟氨酸、NO 和多种活性氮物质,发挥抵御病毒、细菌和肿瘤细胞等的作用(MacMicking *et al*, 1997)。精氨酸酶有 I 和 II 两种亚型,二者具有相似的结构特征和酶特性,区别在于各自的亚细胞定位、组织分布和免疫反应不同(Jenkinson *et al*, 1996)。目前, *Arg- I* 和 *Arg- II* 基因仅在大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)(Benedicenti *et al*, 2016)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)(丁斐斐等, 2016)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Wright *et al*, 2004)、鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)(Joerink, 2006)等少数硬骨鱼中被克隆和鉴定出来,推测精氨酸酶在鱼类抗菌免疫应答中发挥重要作用。刘华等(2016)在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中克隆得到了 284 bp 的中间片段,并对其二级结构进行了初步分析,但没有分析其与免疫的相关性。

牙鲆俗称牙片、偏口等,是中国重要的海水养殖鱼类之一(雷霖霖, 2011),因其具有极好的营养价值与经济价值而受到大家的喜爱。但由于过度捕捞,野生牙鲆数量锐减。同时,工厂化养殖近亲繁殖严重,使得种质资源严重退化。传染病造成的牙鲆大面积死亡现象时有发生,给养殖场造成了巨大的损失(雷霖霖, 2011; 莫照兰等, 2003)。从鱼类自身的免疫调控入手,对其抗菌感染的分子机制进行深入研究,挖掘抗病相关基因显得尤为重要(陈松林等, 2016)。本研究对精氨酸酶 II (Arginase II, *Arg- II*)进行了全长克隆分析,检测了 *Arg- II* 基因在正常组织和迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)感染后的不同组织和巨噬细胞中的表达水平,为研究 *Arg- II* 在鱼类免疫分子机制中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用牙鲆为健康 2 龄牙鲆,取自山东黄海水产有限公司,感染所用迟缓爱德华氏菌由本实验室保存。RNAiso 试剂、反转录试剂盒、Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒均购自 TaKaRa 公司(日本)。引物合成及序列测定由睿博兴科生物有限公司(北京)完成。

1.2 方法

1.2.1 组织样品的采集 随机选取 9 尾 2 龄牙鲆,分别取肠、脾、鳃、心、皮肤、脑、肌肉、肝脏、肾

脏等组织,立即投到液氮中保存,随后转移到 -70°C 冰箱保存。参考郑卫卫等(2016)的方法,取 6 个月牙鲆用于迟缓爱德华氏菌感染实验,实验组按照半致死浓度 LD_{50} 为 2.63×10^4 CFU/ml 的剂量进行腹腔注射,对照组注射等量 PBS 溶液,分别在注射后 0、6、12、24、48 h 共 5 个时间点取样,每个时间点 3 个样本,分别取肾脏、鳃、脾脏和肝脏组织。体外培养巨噬细胞感染实验参考孙璐明等(2016)的方法,实验组按照感染复数 20:1 接种到吞噬细胞中,对照组加入等量 PBS 溶液,在感染后 0、4、8、12、24 h 共 5 个时间点取样,每个时间点 3 个重复。

1.2.2 牙鲆 *Arg- II* 的克隆及序列分析 通过生物信息学方法在牙鲆基因组及转录组数据库(Shao *et al*, 2016)中筛选 *Arg- II* 基因信息,用 Primer 5.0 软件设计特异性引物,通过 PCR 扩增中间序列,扩增程序: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 20 s, 72°C 延伸 30 s, 30 个循环; 72°C 延伸 5 min。测序验证序列的准确性。根据中间序列设计 5-RACE 扩增引物 *Arg- II-5'N*、*Arg- II-5'R* 和 3-RACE 扩增引物 *Arg- II-3'R*、*Arg- II-3'N* (表 1),通过 TaKaRa RACE 扩增试剂盒说明书进行扩增,获得 5'UTR 和 3'UTR 区域序列,测序验证序列的准确性。序列分析使用 DNASTAR 软件和 NCBI-CDD search 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>)。

1.2.3 牙鲆 *Arg- II* 的组织表达特征 参考位战飞等(2016)的方法,利用荧光定量 PCR 技术检测 *Arg- II* 基因在各个组织中的表达情况。对采集的正常牙鲆组织样品分别进行总 RNA 抽提和反转录。以 β -actin 为内参,采取三步法进行 PCR 扩增: 95°C 预变性 15 min; 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 20 s,最后 72°C 延伸 30 s,同时采集荧光信号,共 40 个循环,之后加入熔解曲线程序。利用相对标准曲线法 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 对定量结果进行计算,分析 *Arg- II* 基因在各个组织的相对表达量。

1.2.4 迟缓爱德华氏菌感染对牙鲆免疫组织以及巨噬细胞 *Arg- II* mRNA 表达的影响 对迟缓爱德华氏菌感染牙鲆的肝、脾、肾、鳃等免疫组织和体外培养的巨噬细胞,分别进行总 RNA 抽提和反转录。采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *Arg- II* mRNA 的表达变化,方法同 1.2.3。

1.3 数据分析

实验结果用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,采用 SPSS 19.0.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计, $P < 0.05$ 为差异显著。

表 1 本研究用到的引物
Tab.1 Primers used in this study

Table with 3 columns: 引物 Primer, 序列 Sequence(5'-3'), 目的 Purpose. Rows include Arg-II-S, Arg-II-A, Arg-II-5'R, Arg-II-5'N, Arg-II-3'R, Arg-II-3'N, Arg-II-qRT-A, Arg-II-qRT-S, beta-actin-A, beta-actin-S.

2 结果

2.1 牙鲆 Arg-II 基因的序列分析

依据基因组和转录组序列设计特异引物,PCR 扩增及测序显示,牙鲆 Arg-II 基因由 1882 个核苷酸组成,包含一个 1050 bp 的开放阅读框,编码 349 个氨基酸。分子量预测为 38.02 kDa,等电点为 6.42。通过 5'RACE 和 3'RACE 向两端扩增,获得 5'UTR 长度

为 150 bp,3'UTR 长度为 708 bp。保守结构域预测牙鲆 Arg-II 基因编码的氨基酸具有典型的 Arginase 结构特征,在氨基酸的第 22、26、104、108、153、333、349 位存在 7 个糖基化位点(图 1)。氨基酸的多重比对结果显示,牙鲆 Arg-II N 端比 Arg I 多 120 个氨基酸,C 端相似性较高,推测二者具有不同的功能。牙鲆 Arg-II 与其他生物 Arg-II 具有多个保守氨基酸区段(图 2)。进化树分析显示,牙鲆与其他物种的 Arg-II



图 1 牙鲆 Arg-II cDNA 序列及推导的氨基酸序列
Fig.1 The Arg-II cDNA sequence and deduced amino acids in P. olivaceus

小写字母代表 5'和 3'端非编码区;大写字母代表编码区序列,上面为核苷酸序列,下面对应为氨基酸序列;起始密码子 ATG、终止密码子 TGA、polyA 尾均加下划线;红色大写字母代表磷酸化修饰位点;Lowercase letters represent the sequence of 5' and 3' untranslated region, capital letters represent the coding sequence. The nucleotide sequence is above and the coded amino sequence is below. The initiation codon ATG, the stop codon TGA, and the polyadenylation are underlined; Red capitals represent phosphorylation sites

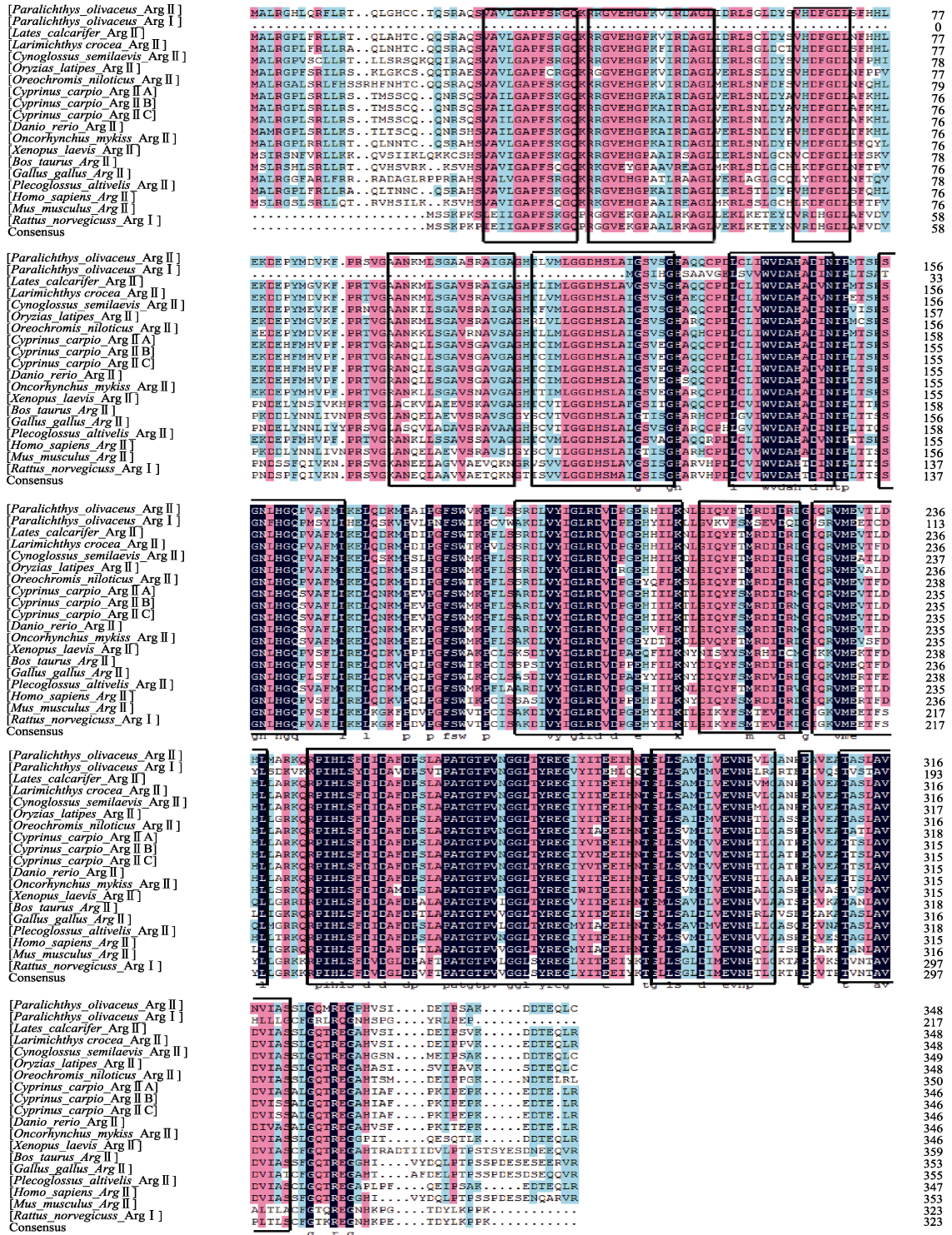


图 2 牙鲆与其他物种 Arg-II 和 Arg-I 氨基酸序列多重比对

Fig.2 Multiple alignment of Arg-II and Arg-I amino acid sequence between *P. olivaceus* and other species

XP_019962845 *Paralicthys olivaceus* Arg-II, XP_019965324 *Paralicthys olivaceus* Arg-I, XP_018537157 *Lates calcarifer* Arg-II, XP_010754895 *Larimichthys crocea* Arg-II, XP_003445522 *Oreochromis niloticus* Arg-II, XP_008311803 *Cynoglossus semilaevis* Arg-II, XP_004082141 *Oryzias latipes* Arg-II, XP_021441146 *Oncorhynchus mykiss* Arg-II, AMJ39609 *Plecoglossus altivelis* Arg-II, NP_955905 *Danio rerio* Arg-II, CAI38847 *Cyprinus carpio* Arg-II A, CAF02014 *Cyprinus carpio* Arg-II B, CAI38846 *Cyprinus carpio* Arg-II C, NP_001079511 *Xenopus laevis* Arg-II, NP_001186633 *Gallus gallus* Arg-II, DAA25083 *Bos Taurus* Arg-II, NP_001163 *Homo sapiens* Arg-II, AAA98611 *Mus musculus* Arg-I, AAA40760 *Rattus norvegicus* Arg-I

氨基酸序列聚为一簇,相似性为 58%~93%。其中,和鲈鱼(*Lates calcarifer*)*Arg- II*基因的同源性最高,为 93%。与两栖动物、鸟类及哺乳动物的 *Arg- II*的氨基酸序列的同源性不高,仅为 58%~69%。牙鲆 *Arg I*与大鼠(*Rattus norvegicus*)和小鼠(*Mus musculus*)的 *Arg I*聚为一簇(图 3)。

2.2 健康牙鲆 *Arg- II* mRNA 的组织表达特征

取健康牙鲆的肝、脾、肾、脑、鳃和肠组织进行 qRT-PCR 检测。牙鲆 *Arg- II*基因扩增产物的大小为 111 bp,内参 β -actin 基因扩增产物大小为 92 bp。结果显示(图 4),健康牙鲆 *Arg- II* mRNA 主要在肝、肾、肠中高表达,其次是鳃、心、脑,在其他组织中微弱表达。

2.3 牙鲆 *Arg- II* mRNA 的表达与迟缓爱德华氏菌感染的相关性

根据 *Arg- II*在健康牙鲆组织中的表达特征,选取迟缓爱德华氏菌感染牙鲆的肝、肾、鳃、脾组织、体外培养巨噬细胞,进行 qRT-PCR 检测。图 5 显示,在牙鲆的肾组织中 *Arg- II* mRNA 的相对表达量在感染后 6 h 开始增加,12 h 时显著高于对照组,为对照组的 1.98 倍,24 h 略有下降,48 h 基本降至对照组;在鳃组织中,6 h 和 12 h 时显著高于对照组,分别为

对照组的 1.53 倍和 2.1 倍;在脾组织中,在 6 h 开始增加,12 h 和 24 h 显著高于对照组,12 h 时为对照组的 5.23 倍,48 h 与对照组无显著差异;肝组织中,*Arg- II*的表达量在 6 h 时显著增加,为对照组的 3.8 倍,12 h 时略有下降,24 h 时恢复至对照组水平;巨噬细胞中,4 h 开始增加,8 h 时达到最大,为对照组的 6.1 倍,24 h 后恢复到对照组水平。

3 讨论

本研究通过牙鲆转录组测序数据设计 *Arg- II*基因的特异性引物,获得全长 cDNA 序列。刘华等(2016)克隆得到的精氨酸酶片段为本研究克隆得到的精氨酸酶 II 序列全长的一部分。通过多重序列比对可知,牙鲆与哺乳动物的 *Arg- II*基因有更多的相似性,而 *Arg- II*是线粒体蛋白,需要 N-末端线粒体靶向肽进入线粒体基质(Korte *et al*, 1997; Todgham *et al*, 2001)。作者推测, *Arg- II*发挥免疫作用的主要信号通路可能两条:在甘氨酸鸟氨酸循环信号通路中,精氨酸可以在 *Arg- II*的作用下分解成尿素和鸟氨酸,鸟氨酸有利于细胞再生以及伤口的愈合,同时,鸟氨酸是合成多胺类物质的前体,多胺在生物学调控中发挥着巨大作用,调控巨噬细胞的功能(Kepkalenhart *et al*, 2001)。在精氨酸循环信号通路中, iNOS 可以长时间产生大

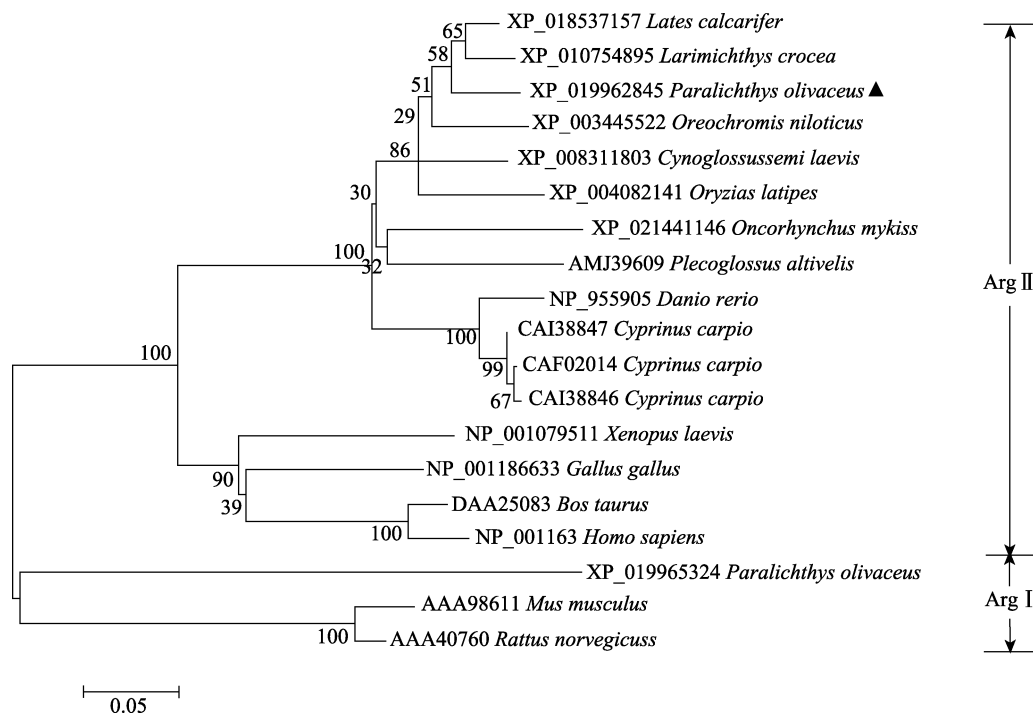


图 3 基于 Neighbor-Joining 法构建牙鲆及其他物种 *Arg- II* 及 *Arg- I* 氨基酸序列的系统进化树
Fig.3 Phylogenetic tree of *Arg- II* and *Arg- I* amino acid sequence of *P. olivaceus* and other species based on neighbor-joining

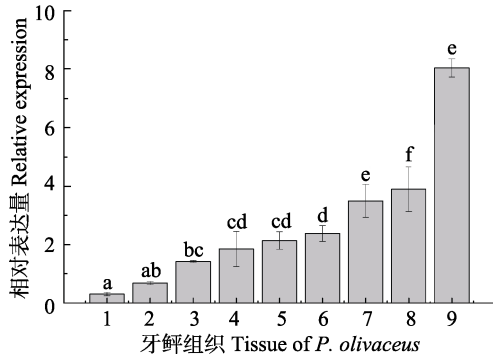


图 4 牙鲆 Arg- II mRNA 的组织表达

Fig.4 The tissue expression of Arg- II mRNA in *P. olivaceus*

1: 肌肉; 2: 皮肤; 3: 脾脏; 4: 心脏; 5: 脑; 6: 鳃; 7: 肠; 8: 肾脏; 9: 肝脏。上标字母为 SPSS 软件中 Duncan 算法计算出的子集分组

The letters above the columns were subsets by Duncan algorithm. 1: Muscle; 2: Skin; 3: Spleen; 4: Heart; 5: Brain; 6: Gill; 7: Intestine; 8: Kidney; 9: Liver

量的 NO, 而过量的 NO 生成会引起肠黏膜和肠屏障功能损伤, 对胃肠道的运动也有不利影响; 同时, 精氨酸由于 NO 的释放不平衡也会造成全身炎症反应的加剧, 在免疫反应中, 来源于精氨酸的 NO 起了主导作用。而 Arg- II 与一氧化氮合酶(NOS)竞争 L-精氨酸, 调节机体免疫功能(Corraliza *et al*, 1995; 朱琳楠等, 2010; 陶璇, 2012)。

巨噬细胞作为先天免疫系统的重要组成部分, 分泌一系列促炎症因子, M2 型巨噬细胞分泌的精氨酸酶可以与 iNOS 竞争性地结合底物精氨酸, 分解精氨酸为多胺, 促进细胞分裂和胶原的形成, 对炎症后期由病原微生物造成的组织损伤进行修复和重塑, 在机体抵御细胞内病原体的感染中起到重要作用(Mantovani *et al*, 2002; Gordon *et al*, 2003)。已有研究显示, 精氨酸酶 I 具有免疫抑制功能, 特别是对 T 淋巴细胞功能的抑制, 但对 Arg- II 的研究还鲜有报道(Ckless *et al*, 2008; 张乃春等, 2015)。本研究中, Arg- II 在迟缓爱德华氏菌感染巨噬细胞后显著上调, 推测与上述 2 条免疫通路有关, 通过上调 Arg- II 基因的表达来增强机体免疫能力。

组织分布表明, Arg- II 在各个组织中都有表达, 尤其是在肝脏等组织中表达最高, 这与鲤鱼、虹鳟中的研究结果较一致(Wright *et al*, 2004; Joerink *et al*, 2006)。Marathe 等(2006)研究表明, Arg- II 直接调控肝受体 X(LRX), 而 LRX 能抑制 iNOS 在巨噬细胞中的表达, 提高免疫效果。与哺乳动物相比, 鱼类的 Arg- II 基因免疫方面的研究相对较少, 在已有的研究中, 揭示了 Arg- II 基因可能与鱼类免疫有关。在鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染的香鱼中, 香鱼肝组织中 Arg- II 基因 4 h 之后开始增加, 8 h 之后为对照组的 5.2 倍(Benedicenti *et al*, 2016)。在阿米巴变形虫感染的大马

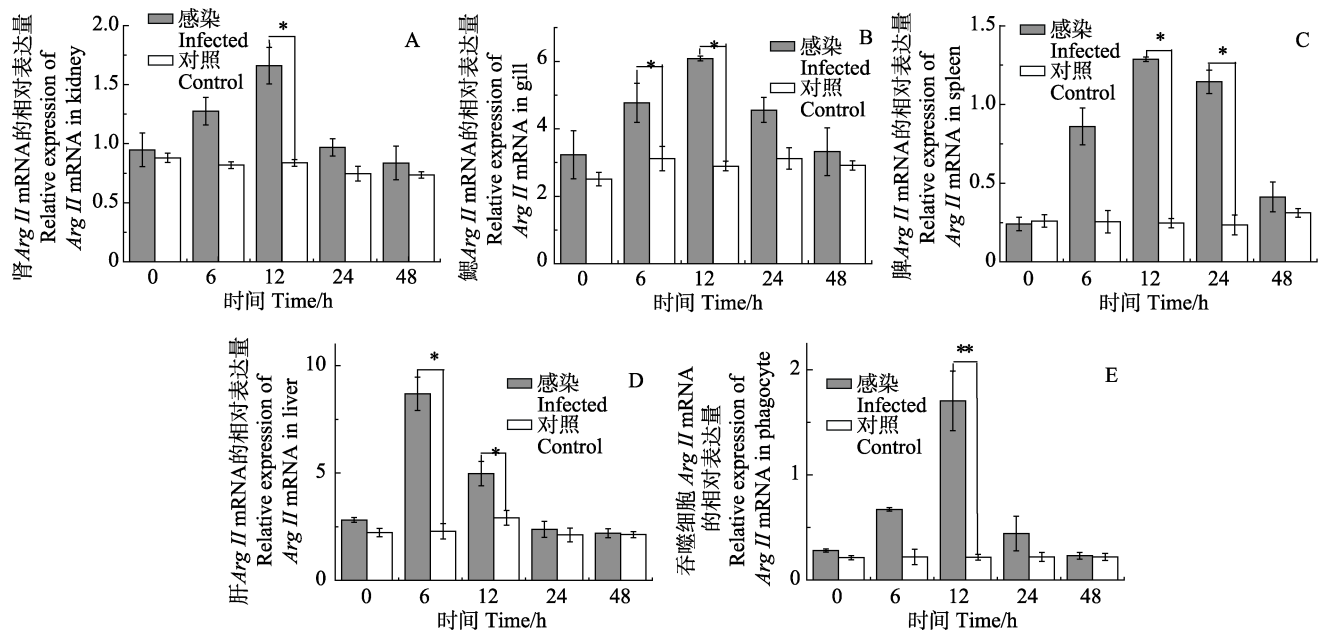


图 5 迟缓爱德华氏菌感染对牙鲆重要组织及细胞的 Arg- II mRNA 表达的影响

Fig.5 mRNA expressions of Arg- II in differernt tissues of *P. olivaceus* infected with *E. tarda*

A: 肾; B: 鳃; C: 脾脏; D: 肝脏; E: 吞噬细胞。感染组与对照组之间的差异显著性(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

A: Kidney; B: Gill; C: Spleen; D: Liver; E: Phagocytes. Difference between the treatment and control group (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

哈鱼(*Oncorhynchus keta*)组织中,脾脏的表达量为对照组的 2.75 倍(Morris *et al.*, 1998)。本研究中,迟缓爱德华氏菌注射牙鲆,免疫相关组织(如肝脏、肾脏等)中 *Arg- II* mRNA 的表达量明显上调,与上述研究结果一致。同时,肾、鳃等免疫组织以及巨噬细胞中 *Arg- II* mRNA 的表达量也明显上调,揭示了 *Arg- II* 可能与牙鲆免疫应答密切相关,可能通过巨噬细胞发挥作用,但具体作用机制有待进一步深究。

4 结 论

牙鲆 *Arg- II* 基因 cDNA 序列与鲑鱼 *Arg- II* 序列最相似。健康牙鲆中, *Arg- II* 基因主要在肝、肾、肠中表达;迟缓爱德华氏菌感染后, *Arg- II* 基因表达量显著上调,揭示了 *Arg- II* 与牙鲆抗病原感染的免疫反应密切相关。

参 考 文 献

- Benedicenti O, Wang T, Wangkahart E, *et al.* Characterisation of arginase, paralogues in salmonids and their modulation by immune stimulation/infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 61: 138–151
- Chen SL, Shao CW, Xu P. Development strategy for fisheries biotechnology. *China Engineering Science*, 2016, 18(3): 49–56 [陈松林, 邵长伟, 徐鹏. 水产生物技术发展战略研究. *中国工程科学*, 2016, 18(3): 49–56]
- Ckless K, Lampert A, Reiss J, *et al.* Inhibition of arginase activity enhances inflammation in mice with allergic airway disease, in association with increases in protein S-nitrosylation and tyrosine nitration. *Journal of Immunology*, 2008, 181(6): 4255–4264
- Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, *et al.* Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1995, 206(2): 667–673
- Ding FF, Li CH, Chen J, *et al.* cDNA cloning of arginase II Gene in Ayu (*Plecoglossus altivelis*) and the correlation between its expression and *Vibrio anguillarum* infection. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(2): 109–115 [丁斐斐, 李长红, 陈炯, 等. 香鱼精氨酸酶 II 基因的 cDNA 克隆及其表达与鳃弧菌感染的相关性. *生物技术通报*, 2016, 32(2): 109–115]
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(1): 23
- Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 114(1): 107–132
- Joerink M, Savelkoul HF, Wiegertjes GF. Evolutionary conservation of alternative activation of macrophages: Structural and functional characterization of arginase 1 and 2 in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Molecular Immunology*, 2006, 43(8): 1116–1128
- Kepkalenhardt D, Mistry SK, Wu G, *et al.* Arginase I: A limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 2001, 279(6): R2237–2242
- Korte JJ, Salo WL, Cabrera VM, *et al.* Expression of carbamoyl-phosphate synthetase III mRNA during the early stages of development and in muscle of adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(10): 6270–6277
- Lei JL. Theory and technology of marine fish culture. Beijing: China Agriculture Press, 2011, 482–483 [雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 2011, 482–483]
- Liu H, Shi TT, Shi ZY. Cloning and sequencing of gene fragments of *Paralichthys olivaceus* arginase. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2016, 43(12): 108–114 [刘华, 施婷婷, 施志仪. 牙鲆精氨酸酶基因片段的克隆及序列分析. *广东农业科学*, 2016, 43(12): 108–114]
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, 1997, 15: 323–350
- Mantovani, Alberto, Sozzani, *et al.* Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, 2002, 23(11): 549–555
- Marathe C, Bradley MN, Hong C, *et al.* The arginase II gene is an anti-inflammatory target of liver X receptor in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(43): 32197–32206
- Mo ZL, Mao YX, Chen SY, *et al.* Identification and phylogenetic analysis of one pathogenic bacterium associated with swollen abdomen of cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2003, 34(2): 131–141 [莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析. *海洋与湖沼*, 2003, 34(2): 131–141]
- Morris JS, Kepkalenhardt D, Chen LC. Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells. *American Journal of Physiology*, 1998, 275(1): 740–747
- Munder M. Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system. *British Journal of Pharmacology*, 2009,

- 158(3): 638–651
- Shao CW, Bao BL, Xie ZY, *et al.* The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. *Nature Genetics*, 2017, 49(1): 119–124
- Sun HN, Yang HM, Wang ZY, *et al.* Nutrition physiological and immune functions of arginine in animals. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(1): 54–62 [孙红暖, 杨海明, 王志跃, 等. 精氨酸对动物的营养生理及免疫作用. *动物营养学报*, 2014, 26(1): 54–62]
- Sun LM, Yu MJ, Chen YD, *et al.* Half smooth tongue sole AKT-interacting protein immune cloning and gene expression analysis. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(3): 467–473 [孙璐明, 于孟君, 陈亚东, 等. 半滑舌鳎 AKT-interacting protein 基因的克隆及免疫应答表达分析. *水生生物学报*, 2016, 40(3): 467–473]
- Tao X. Study on the expression and correlation of arginine I and inducible nitric oxide synthase in hepatocellular carcinoma. Master's Thesis of Fujian Medical University, 2012 [陶璇. 精氨酸酶 I 和诱导型一氧化氮合成酶在肝细胞癌中的表达及其相关性研究. 福建医科大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Todgham AE, Anderson PM, Wright PA. Effects of exercise on nitrogen excretion, carbamoyl phosphate synthetase III activity and related urea cycle enzymes in muscle and liver tissues of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2001, 129(2–3): 527–539
- Wang Q. Changed expression of arginase I in the brain of UT-B null mice accompanied by inflammatory reactions. Master's Thesis of Medical University of Chongqing, 2015, 38–42 [王琦. UT-B 基因敲除小鼠脑中精氨酸酶 I 的表达变化及炎症反应的发生. 重庆医科大学硕士研究生学位论文, 2015, 38–42]
- Wei ZF, Guo H, Li HL, *et al.* Cloning and immunologic function analysis of CD40 from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1063–1072 [位战飞, 郭华, 李海龙, 等. 半滑舌鳎 CD40 基因克隆及其免疫功能分析. *中国水产科学*, 2016, 23(5): 1063–1072]
- Wright PA, Campbell A, Morgan RL, *et al.* Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: Expression of arginase Type I and II genes in rainbow trout: Influence of fasting on liver enzyme activity and mRNA levels in juveniles. *Journal of Experimental Biology*, 2004, 207(12): 2033–2042
- Zhang NC, Huang L, Wang SS, *et al.* Expression of arginase I in peripheral superficial lymph node of HIV-infected individuals. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2015, 29(1): 44–46 [张乃春, 黄磊, 王松山, 等. 精氨酸酶 I 在 HIV 感染者外周浅表淋巴结中表达的研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2015, 29(1): 44–46]
- Zheng WW, Chen SL, Li ZY, *et al.* Analyzing of heritability and breeding value of disease resistance for *Edwardsiella tarda* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(8): 1181–1189 [郑卫卫, 陈松林, 李泽宇, 等. 牙鲆抗迟缓爱德华氏菌性状的遗传力和育种值分析. *农业生物技术学报*, 2016, 24(8): 1181–1189]
- Zhu LN, Hou YZ, Zhao Y. Molecular expression regulation of arginine I and inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Chinese Journal of Immunology*, 2010, 26(8): 748–753 [朱琳楠, 侯玉柱, 赵勇. 精氨酸酶 I 及诱生性一氧化氮合酶在巨噬细胞中的分子表达调控. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(8): 748–753]

(编辑 冯小花)

The Different Expression Patterns of the Gene Arginase II in *Paralichthys olivaceus* and the Correlation Between its Expression and *Edwardsiella tarda* Infection

MA Huixin^{1,2}, WANG Lei^{1,3①}, WANG Linqing^{1,4}, ZHOU Qian^{1,3}, CHEN Songlin^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071;

4. College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350116)

Abstract Arginase II (*Arg-II*) is a type of arginase. It mainly participates in the urea cycle, and has been found to play an important role in the pathological process. However, its role in fish is not well reported. In this milieu, we obtained the full cDNA of *Arg-II* of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and detected its space-time expression profile in the immune tissue and bacterial infected tissue of Japanese flounder. The results showed that the *Arg-II* gene consists of 1882 nucleotides, including an open reading frame (1150 bp) that encodes a protein of 349 amino acids (with deduced molecular mass of 38.02 kDa and theoretical isoelectric point of 6.42). The amino acid of Arg-II protein in Japanese flounder displayed the typical structure of arginase, therefore we assumed that it might have functions similar to that in mammals. Phylogenetic tree analysis also confirmed that fish *Arg-II* formed a cluster, and Japanese flounder *Arg-II* was most closely related to that of *Lates calcarifer* (93%). Quantitative real-time PCR (q-RT PCR) analysis showed that the mRNA of *Arg-II* is mainly expressed in immune tissues, such as the liver, spleen, gills, and kidney. Intensive study showed that the mRNA expression of gene *Arg-II* was significantly upregulated after 6~12 h of *Edwardsiella tarda* challenge, and then returned to normal condition in the immune tissues of Japanese flounder. The expression of *Arg-II* was also significantly upregulated in the *in vitro* cultured *E. tarda* challenged Japanese flounder phagocyte. The present study demonstrates that the gene *Arg-II* might participate in the immune response of Japanese flounder to *E. tarda* infection, thus indicating that the gene *Arg-II* might play an important role in the antibacterial immunity of Japanese flounder.

Key words *Paralichthys olivaceus*; Arginase II; *Edwardsiella tarda*; Expression; Macrophage

① Corresponding author: WANG Lei, E-mail: leileiwang@ysfri.ac.cn