

七鳃鳗鳃黏膜免疫系统类淋巴细胞免疫应答遗传基础

刘欣^{1,2}, 宋雪莹^{1,2}, 张晓萍^{1,2}, 韩英伦^{1,2}, 朱婷^{1,2}, 肖蓉^{1,2}, 李庆伟^{1,2}

1. 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116081;
2. 辽宁师范大学七鳃鳗研究中心, 大连 116081

摘要: 近年来, 在无颌类脊椎动物七鳃鳗体内发现了以可变淋巴细胞受体(Variable lymphocyte receptors, VLR)为基础的抗原识别机制。为揭示七鳃鳗鳃黏膜免疫系统中类淋巴细胞适应性免疫应答的遗传基础, 探索无颌类与有颌类脊椎动物在适应性免疫应答机制上的进化关系, 本文构建了日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)鳃囊组织免疫前后 cDNA 文库并进行了高通量转录组测序及分析。通过对组装得到的 88 525 个独立基因(Unigene)进行功能注释, 分别有 21 704 和 9769 个 unigene 在 GO(Gene Ontology)和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库得到注释。999 个 unigene 参与免疫系统的多个通路, 其中 184 个与高等脊椎动物 TCR(T cell receptor)和 BCR(B cell receptor)信号通路的 51 个分子具有较高的同源关系, 说明七鳃鳗体内存在高等脊椎动物适应性免疫应答信号通路的相关分子。本文还发现 5 个 VLRA、7 个 VLRB 和 4 个 VLRC 分子, 说明七鳃鳗鳃黏膜免疫组织内至少分布 3 种类淋巴细胞亚群。实时荧光定量 PCR 结果显示, *Lck*、*Fyn* 和 *Zap70* 基因在免疫激发后表达量显著上调, 而 *Syk*、*Btk* 和 *Blk* 基因表达没有显著变化, 说明七鳃鳗鳃组织受到抗原刺激后, 类似 T 淋巴细胞的信号转导途径被激活。本研究初步证明, 尽管无颌类和有颌类脊椎动物的适应性免疫系统在抗原识别机制上存在不同, 但具有共同的遗传基础。研究结果为探讨七鳃鳗 VLRA⁺、VLRB⁺和 VLRC⁺淋巴细胞免疫应答信号传导过程提供了有价值的线索。

关键词: 日本七鳃鳗; 鳃黏膜免疫组织; 转录组; 免疫应答

Genetic basis of immune response of lymphocyte-like cells in the mucosal immune system of *Lampetra japonica*

Xin Liu^{1,2}, Xueying Song^{1,2}, Xiaoping Zhang^{1,2}, Yinglun Han^{1,2}, Ting Zhu^{1,2}, Rong Xiao^{1,2}, Qingwei Li^{1,2}

1. School of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China ;
2. Lamprey Research Center, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China

Abstract: In recent years, the antigen recognition mechanism based on variable lymphocyte receptors (VLRs) was found in agnathan lamprey. To illuminate the genetic basis of immune response of lymphocyte-like cells in the mucosal immune system of lamprey and explore the evolutionary relationship of adaptive immune responses between the

收稿日期: 2015-03-16; 修回日期: 2015-05-19

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)课题(编号: 013CB835304)和国家自然科学基金项目(编号: 31271323)资助

作者简介: 刘欣, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: liuxin@lnnu.edu.cn

通讯作者: 李庆伟, 教授, 博士生导师, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: liqw@263.net

DOI: 10.16288/j.ycz.15-108

网络出版时间: 2015-8-28 9:25:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150828.0925.002.html>

jawless and jawed vertebrates, we constructed cDNA libraries of lamprey (*Lampetra japonica*) gills before and after stimulation, and then performed high-throughput transcriptome sequencing and analysis. Through functional annotation of 88 525 assembled unigenes, 21 704 and 9769 unigenes were annotated in Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) databases, respectively. Among 999 unigenes involved in multiple pathways of immune system, 184 unigenes were highly homologous to 51 TCR (T cell receptor) and BCR (B cell receptor) signalling molecules in higher vertebrates, indicating that molecules involved in adaptive immune signalling pathways in higher vertebrates also exist in lampreys. In addition, identification of five VLRA, seven VLRB and four VLRC molecules suggest that at least three types of lymphocyte subsets are distributed in lamprey gill mucosal immune tissues. The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that the expression levels of *Lck*, *Fyn* and *Zap70* were up-regulated after immune stimulation while those of *Syk*, *Btk* and *Blk* were not changed significantly, indicating the activation of TCR-like signal transduction pathway after antigen stimulation in lamprey gill tissues. Our studies preliminarily proved that two parallel adaptive immune systems in jawless and jawed vertebrates have common genetic basis, and also provided valuable clues to the exploration of signalling processes of VLRA⁺, VLRB⁺, and VLRC⁺ lymphocyte-like cells in response to antigens.

Keywords: *Lampetra japonica*; mucosal immune tissues; transcriptome ; adaptive immune response

黏膜免疫是免疫系统的一个重要组成部分,为生物体的各种黏膜提供保护,使其免受潜在病原微生物的入侵并调节机体的免疫反应^[1]。鱼类生活在水环境中,其皮肤、鳃和肠道与水体直接接触,是病原侵入鱼体的门户。为免受病害侵袭,在长期进化过程中,这些组织和器官形成了黏膜相关淋巴组织(Mucosal associated lymph tissue, MALT)。尽管负责气体交换的鱼鳃由几对鳃片组成,但鳃片上排列的梳齿状鳃丝具有巨大的表面积,使其成为鱼类重要的黏膜免疫组织。Lin 等^[2]在大西洋鲑(*Salmo salar*)和黄盖鲈(*Limanda limanda*)鳃组织中发现大、小淋巴细胞、巨嗜细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等免疫细胞的存在。当鱼体受抗原刺激时,巨噬细胞可以对抗原进行处理和呈递,抗体分泌细胞会分泌特异性抗体,构成了机体与外界相接触的第一道免疫防护体系^[3]。从鳃淋巴细胞对有丝分裂原脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)和植物血凝素(Phytohaemagglutinin, PHA)的反应来看,PHA比LPS对鳃淋巴细胞的激活作用更加显著,说明分布在鱼类鳃中的淋巴细胞以T细胞为主^[4]。

七鳃鳗属于脊椎动物门、圆口纲(Cyclostomata)、七鳃鳗目(Petromyzontiformes)。长久以来,七鳃鳗作为脊椎动物中最低等的鱼形动物,因其在进化上的特殊地位在比较解剖学^[5]、发育神经生物学^[6]、生理学^[7]和免疫学^[8]等研究领域备受关注。近年来,Pancer 等^[9,10]发现海七鳃鳗(*Petromyzon marinus*)和

太平洋粘盲鳗(*Eptatretus stoutii*)存在以可变淋巴细胞受体(Variable lymphocyte receptors, VLR)为基础的抗原识别机制,提出无颌类存在一种平行于有颌脊椎动物以T细胞受体(T cell receptor, TCR)、B细胞受体(B cell receptor, BCR)识别抗原的适应性免疫系统。之后,共有3种VLR(VLRA、VLRB和VLRC)被发现,且分别存在于不同的淋巴细胞亚群上(VLRA⁺、VLRB⁺和VLRC⁺淋巴细胞)^[11]。Guo 等^[12]发现在七鳃鳗的鳃囊中存在小淋巴细胞,并且VLRA⁺和VLRB⁺淋巴细胞的数量比值在鳃囊中接近1,远高于其他组织,说明VLRA⁺淋巴细胞主要分布在鳃囊中。VLRA⁺淋巴细胞在PHA刺激后的反应方式与高等脊椎动物的T细胞相似。刺激后的VLRA⁺淋巴细胞特异性表达分子包括转录因子GATA2/3(GATA binding protein 2/3)、原癌基因*c-Rel*(v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog)、芳香烃受体Ahr(Aryl hydrocarbon receptor)、B-细胞淋巴瘤因子Bcl11B(B-cell CLL/lymphoma 11B);趋化因子受体CCR9(Chemokine (C-C motif) receptor 9);T细胞命运决定分子Notch1(Neurogenic locus Notch homolog protein 1);酪氨酸磷酸酶CD45;白细胞介素IL-8(Interleukin 8)受体和趋化因子受体CXCR2(Chemokine (C-X-C motif) receptor 2);促炎细胞因子IL-17和巨噬细胞移动抑制因子MIF(Macrophage migration inhibitory factor)。但是,由于七鳃鳗体内不存在以组织相容性

复合体 (Major histocompatibility complex, MHC)、TCR、BCR 和免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)等分子为主导的适应性免疫机制,其黏膜免疫系统中类淋巴细胞适应性免疫应答的遗传基础及其与高等脊椎动物适应性免疫应答的异同目前尚未见报道。

本研究以日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)这一东亚亚种活化石为研究对象,利用高通量测序技术对其免疫前后的鳃囊组织进行了转录组测序(RNA-seq)。通过对序列进行比较分析,搜索和识别无颌类脊椎动物参与适应性免疫应答的相关分子,揭示无颌类黏膜免疫系统类淋巴细胞适应性免疫应答的遗传基础,探究与高等脊椎动物适应性免疫系统之间在进化上的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

日本七鳃鳗捕自黑龙江省松花江流域同江地区,活体置于实验室水族箱驯养(2~5□)。1周后选取24条健康的个体(体长35~55 cm),分为两组:对照组和实验组。实验组以复合抗原浸泡免疫1 h方式进行免疫刺激^[13]。复合抗原用市售生理盐水配制,含灭活的大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5α)(TaKaRa, Dalian)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)(宝生物工程(大连)有限公司)和啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)(市售)各 1×10^9 个/mL,免疫时用水族箱养殖水稀释3 000倍后使用。实验组经过2次加强免疫(每2周1次),末次免疫后3 d取其新鲜的鳃组织。对照组不用复合抗原,其余的处理方法同实验组。

1.2 方法

1.2.1 RNA 样品提取及 cDNA 文库的构建和测序

使用 RNAiso Reagent(TaKaRa, Dalian)提取日本七鳃鳗复合免疫实验组及对照组鳃囊总 RNA。获得符合测序标准的总 RNA 样本后,委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行等量混合后构建转录组测序文库并用 Illumina HiSeqTM 2000 进行双向测序(Paired-end sequencing)及分析。

1.2.2 转录本的拼接

测序得到的原始序列需去除含 N(N 表示无法确

定碱基信息)的比例大于 10%的读数(Reads)、带接头的读数及低质量的读数(质量值 Q 5 的碱基数占整个读数长度 50%以上的读数),从而得到纯净读数(Clean reads)。采用针对短序列拼接的 Trinity 软件进行拼接(版本:v2012-10-05),min_kmer_cov 参数设置为 2,其他参数设置为默认^[14]。最后,将拼接至两端不能再延长的转录本作为独立基因(Unigene)。

1.2.3 转录组数据处理与注释分析

利用 Blast 软件(NCBI blast 2.2.28+)将 Unigene 在 Nr 蛋白序列数据库中进行序列比对。未注释的 Unigene 在 Nt 核酸序列数据库中搜索同源序列。为减少错配比例,将 *e* 值(*e*-value)的阈值设为小于 $1E-10$ 。

运用 HMMER3 程序(<http://pfam.sanger.ac.uk/>),根据 Pfam(Protein family)数据库^[15]中已构建好的蛋白结构域 HMM(Hidden Markov Models)统计模型,对 Unigene 进行蛋白质结构域的注释。

利用 Blast2GO^[16]和 KAAS^[17](<http://www.genome.jp/tools/kaas/>)软件,基于 Nr 和 Pfam 两部分的蛋白注释结果对 Unigene 分别进行 Gene Ontology(GO)和 KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)通路功能注释及分类统计。

1.2.4 基因差异表达分析

将拼接得到的 Unigene 序列作为参考序列(Reference sequence),利用软件 Bowtie^[18]将每个样品的纯净读数比对(Mapping)到参考序列上,运行参数设为默认值。利用 RSEM(RNA-Seq by Expectation Maximization)软件^[19]对 Bowtie 的比对结果进行统计,进一步得到了每个样品比对到每个 Unigene 上的读数数量(Read count),并对其进行处理 FPKM 转换,估算基因的表达水平^[20]。基因差异表达的输入数据为基因表达水平分析中得到的读数数量数据。采用 TMM(Trimmed mean of M values)^[21]对读数数量数据进行标准化处理,利用 DEGseq^[22]进行差异分析,筛选阈值为 $q < 0.005$ 且 $|\log_2(\text{Sample1}/\text{Sample2})| > 1$ ^[23]。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 分析

选取与 TCR、BCR 相邻的 7 个重要的信号分子(酪氨酸蛋白激酶 Lck、Fyn、Tec、ZAP-70,脾酪氨

酸激酶 Syk, B 细胞连接蛋白 Blnk 和布鲁顿酪氨酸激酶 Btk) 进行实时荧光定量 PCR 分析验证。鳃组织总 RNA 样品的提取按方法 1.2.1 进行。采用 Primescript™ RT 试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)进行反转录。使用 TaKaRa SYBR® primerscript™ RT-PCR(宝生物工程(大连)有限公司)试剂盒, 按照产品说明书进行实时荧光定量 PCR, 每个样品重复实验 3 次。以七鳃鳗 *GAPDH* 的表达水平作为内参, 对实验结果进行校准。各实验组结果用对照组结果进行归一化计算相对表达水平。PCR 扩增程序为: 95℃ 预变性 5 s; 95℃ 5 s, 60℃ 5 s, 72℃ 30 s, 40 个循环; 最后再 65℃ 延伸 15 s。运用 SPSS 统计软件包的 *t* 检验模块对基因表达进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。所验证的 7 个蛋白激酶的 PCR 引物序列见表 1, 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

2 结果与分析

2.1 七鳃鳗转录组测序序列的转录本拼接及注释

对所构建的对照组和实验组两个 cDNA 文库进行双向测序分别得到的原始数据为 25 947 041 和 28 841 887 对原始读数(Raw reads)。通过对原始读数过滤, 分别得到 24 382 693 和 27 004 299 对纯净读数(序列总碱基数分别为 4.88 G 和 5.4 G 个碱基), Q20 和 Q30(Phred 数值大于 20、30 的碱基占总体碱基的百分比)指标分别高于 96% 和 90%, 说明测序结果良好。利用 Trinity 软件对 2 个转录组双向 4 组纯净读

数集合进行混合拼接, 最终在所组装的 119 004 个序列重叠群(Contig)中筛选出 88 525 个 Unigene, 总长度 69 291 924 bp, 平均长度 671 bp, N50 值为 1 092 bp。在这些 Unigene 中, 序列长度在 300 bp 以下的有 28 283 个, 占 31.95%; 300 ~ 499 bp 的有 25 072 个, 占 28.32%; 500 ~ 999 bp 的有 17 952 个, 占 20.28%; 1000~1 999 bp 的有 9728 个, 占 10.99%;

长度在 2 000 bp 以上的有 7 490 个, 占 8.46%。按照转录组数据处理与注释分析方法对 88 525 个 Unigene 进行了功能注释, 占总数 29.43% 的 26 049 个 Unigene 至少在一个数据库中得到注释。在 PFAM 和 GO 数据库得到注释的比例较高, 分别有 20 834 个(24.52%)和 21 704 个(23.53%) Unigene; 在 Nr、KEGG 和 Nt 数据库中被注释的相对较少, 分别有 16 879(19.07%)、9 769(11.04%)和 8 084 个(9.13%)。

2.2 Unigene 的 GO 分类

对 21 704 个获得 GO 注释的 Unigene 按照生物学过程、细胞组分和分子功能进行了分类, 结果见图 1。在生物学过程 23 个小类中, 归入 Unigene 数量较多的是细胞过程(13 197 个, 9.46%)、代谢过程(10 410 个, 7.46%)和单有机体过程(8 329 个, 5.97%)。分别有 3 051 个(2.19%)、338 个(0.24%)和 44 个(0.03%) Unigene 归入信号传递、免疫系统过程和细胞的杀伤等与免疫相关的类别。在细胞成分的 18 个注释小类中, 细胞(8 394 个, 6.02%)和细胞组件(8 344 个, 5.98%)归入的 Unigene 较多, 突触(96 个, 0.07%)、突触组件(85 个, 0.06%)和细胞核(6 个, 0.00%)归入

表 1 实时荧光定量 PCR 扩增所用引物

扩增对象	引物序列(5'→3')
酪氨酸蛋白激酶 Lck	F:GACAAAGAAGGAGGGATA R:TACGGACAGGGAATAGGA
酪氨酸蛋白激酶 Fyn	F:ATGGGTTGTATGAAGAGC R:CCGAATGGACAGTGAGTA
酪氨酸蛋白激酶 Tec	F:ATGAGTAGGGAGGTGCTGCT R:CGGTCCAGTGTTTGCTC
酪氨酸蛋白激酶 ZAP-70	F:TTGAAGGTGGATACTCTGTTGGAT R:TTTGTGCTGGTCGGGTCGTTGGT
B 细胞连接蛋白 Blnk	F:GCTCCATCAAGAGATCAG R:TCCATCTCCGTGCTCCATAC
布鲁顿酪氨酸激酶 Btk	F:CACCTCCGACAGCCCCCTGCCAAGC R:CGGGATTCAATTTGCCGCCAGCGTGG
脾酪氨酸激酶 Syk	F:CGGGTGGGAGCCATGGACGCGAG R:CAGCCTCTACCCACGTAGGCCTACT
GAPDH	F:ACCAACTGCCTGGCTCCT R:TCTTCTGCGTTGCCGTGT

的 Unigene 较少。细胞成分注释只反映被注释分子在细胞中的位置, 因此不能直观反映该分子是否参与免疫过程。在分子功能注释中, 结合(12 050 个, 8.64%)归入的 Unigene 最多, 其次为催化活性(7 646 个, 5.48%)和转运活性(1 650 个, 1.18%), 而较少的类别有抗氧化活性(35 个, 0.03%)、受体调节活性(34 个, 0.02%)和金属伴侣活性(8 个, 0.01%)。GO 分类结果在一定程度上反映出七鳃鳗组织中所表达的基因的位置分布、所参与的生物学过程及可能行使的功能属性, 为后续进行免疫相关基因的筛选和功能富集分析奠定了基础。

2.3 Unigene 的 KEGG 通路注释

对 Unigene 进行 KO 注释后, 根据它们参与的 KEGG 通路进行分类, 结果见表 2。9769 个被注释的 Unigene 分别属于细胞过程、环境信息加工、遗传信息加工、代谢和有机体系统这 5 个一级分类群下的 260 个标准生物学通路(表 2)。在二级分类群中, 信号转导中的 Unigene 最多, 共有 2 914 个; 其他较多的有内分泌系统(1 506 个)、神经系统(1324 个)、免

疫系统(999 个)、细胞通讯(775 个)、运输和催化(642 个)及信号转导分子和相互作用(576 个)。

参与免疫系统各通路的 999 个 Unigene 中, 146 个参与细胞因子信号通路(Chemokine signaling pathway, ID:ko04062); 128 个参与白细胞跨血管壁迁移(Leukocyte transendothelial migration, ID: ko04670); 124 个参与 Fc γ R 介导巨噬细胞吞噬作用(Fc gamma R-mediated phagocytosis, ID:ko04666); 104 个参与 TCR 信号通路(T cell receptor signaling pathway, ID: ko04660); 84 个参与抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(Natural killer cell mediated cytotoxicity, ID: ko04650); 80 个参与 BCR 信号通路(B cell receptor signaling pathway, ID:ko04662); 70 个 unigene 参与 Toll 样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway, ko04620) 52 个 unigene 参与 Fc ϵ RI 信号通路(Fc epsilon RI signaling pathway ID:ko04664)。还有少量 unigene 参与天然免疫的分子通路, 如: 补体凝集反应(Complement and coagulation cascades, ID:ko04610)、RIG-I 样受体信号通路(RIG-I-like receptor signaling

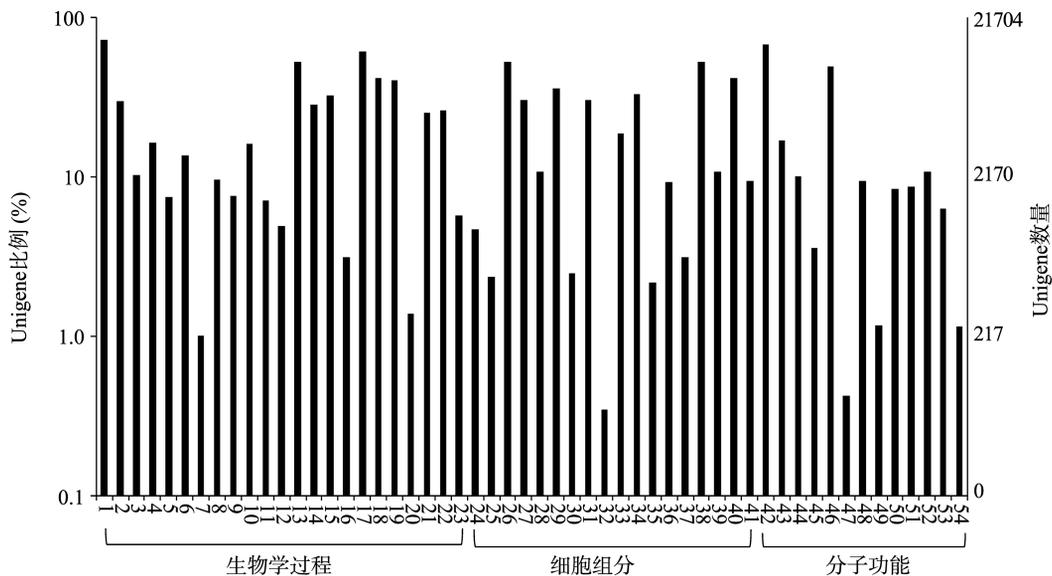


图 1 Unigene 的 GO 分类图

1: 细胞过程; 2: 定位; 3: 正调节的生物过程; 4: 多生物过程; 5: 复制; 6: 发育过程; 7: 律动过程; 8: 负调节的生物过程; 9: 生物粘附; 10: 多细胞有机体过程; 11: 运动; 12: 生殖过程; 13: 单有机体过程; 14: 定位建立; 15: 刺激响应; 16: 生长; 17: 代谢过程; 18: 生物调节; 19: 生物过程的调节; 20: 细胞杀伤; 21: 细胞组分的组织或生物合成; 22: 信号传递; 23: 免疫系统过程; 24: 细胞外基质; 25: 突触; 26: 细胞; 27: 膜组件; 28: 病毒组件; 29: 大分子复合物; 30: 细胞连接; 31: 细胞器组件; 32: 细胞核; 33: 细胞膜的封闭腔; 34: 细胞膜; 35: 突触组件; 36: 细胞外区域组件; 37: 细胞外基质组件; 38: 细胞组件; 39: 病毒扩增; 40: 细胞器; 41: 胞外区; 42: 结合; 43: 转运蛋白活性; 44: 分子转导活性; 45: 通道调节活性; 46: 催化活性; 47: 金属伴侣活性; 48: 结构分子活性; 49: 抗氧化活性; 50: 受体活性; 51: 酶调节活性; 52: 核酸结合的转录因子活性; 53: 蛋白结合的转录因子活性; 54: 受体调节活性。

pathway, ID:ko04622)和 NOD 样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway, ID:ko04621)。以上结果显示,七鳃鳗也存在高等脊椎动物天然免疫和适应性免疫应答信号通路的相关分子,说明在一定程度上这两种平行的适应性免疫系统具有共同的遗传基础。

2.4 七鳃鳗鳃黏膜适应性免疫应答分子的甄别

对注释为参与 TCR 和 BCR 信号通路的 184 个 Unigene 进行分析,发现它们与 51 个高等脊椎动物参与 TCR 和 BCR 信号通路的分子有较高的同源关系。对这 184 个 Unigene 进行归类比较,其中有 51 个 Unigene 序列长度较长、同源匹配 e 值较高(表 3)。其中,编号 1~23 号分子在 TCR 和 BCR 信号通路中都行使功能,24~43 号分子属于 TCR 信号通路,而剩下的 8 个分子属于 BCR 信号通路。并且,有 14 个 Unigene 在复合抗原刺激后在转录水平出现明显上调。另外,本文也从注释的 Unigene 中甄选到 5 个 VLRA、7 个 VLRB 和 4 个 VLRC 分子(表 4);还

有 100 多个 Unigene 在 Nt 数据库被注释为 VLR 分子,但由于序列较短不能被准确确定类别,所以本文未给出结果。3 种 VLR 分子的发现,说明七鳃鳗鳃黏膜免疫组织内分布着所有的类淋巴细胞亚群,而这些分子的发现为将来探讨 VLRA⁺、VLRB⁺和 VLRC⁺淋巴细胞免疫应答信号传导过程提供了有价值的线索。

2.5 T、B 细胞信号转导通路关键蛋白激酶的验证

在筛选的参与 TCR 和 BCR 信号通路的 7 个蛋白激酶中,酪氨酸蛋白激酶 Lck、Fyn、Tec 和 ZAP-70 参与 T 细胞信号转导通路,而 B 细胞连接蛋白(Blnk)、布鲁顿酪氨酸激酶 Btk 和脾酪氨酸激酶 Syk 参与 B 细胞信号通路。利用实时荧光定量 PCR 对这些蛋白激酶的 mRNA 在免疫前后的表达情况进行验证,发现 Lck、Fyn 和 Zap70 在免疫后表达量显著上调,而 Syk、Btk 和 Blnk 没有显著变化(图 2)。结果说明,七鳃鳗鳃组织在受到抗原刺激后,类似 T 淋巴细胞的信号转导途径被激活。

表 2 KEGG 通路注释结果统计表

一级分类群名称	二级分类群名称	标准生物学通路数量	Unigene 数量*	一级分类群名称	二级分类群名称	标准生物学通路数量	Unigene 数量*
细胞过程	细胞通讯	4	775	代谢	脂质代谢	16	437
细胞过程	细胞生长和死亡	7	533	代谢	辅基和维生素代谢	12	171
细胞过程	细胞活力	1	262	代谢	其他氨基酸代谢	8	112
细胞过程	运输和催化	5	642	代谢	萜类和聚酮化合物代谢	6	32
环境信息加工	膜运输	2	57	代谢	核苷酸代谢	2	269
环境信息加工	信号转导	23	2 914	代谢	概述	5	278
环境信息加工	信号转导分子和相互作用	4	576	代谢	异源化合物降解和代谢	15	107
遗传信息加工	折叠,排序和降解	7	496	有机体系统	循环系统	3	439
遗传信息加工	复制和修复	7	266	有机体系统	发育	3	330
遗传信息加工	转录	3	209	有机体系统	消化系统系统	9	711
遗传信息加工	翻译	5	435	有机体系统	内分泌系统	14	1 506
代谢	氨基酸代谢	13	385	有机体系统	环境适应	5	240
代谢	次生代谢物的合成	11	35	有机体系统	排泄系统	5	238
代谢	碳水化合物代谢	14	564	有机体系统	免疫系统	15	999
代谢	能量代谢	8	310	有机体系统	神经系统	10	1 324
代谢	糖合成和代谢	13	342	有机体系统	感官系统	5	250

注: *一个 Unigene 可被注释到多个通路中,参与各通路的 Unigene 会被重复统计。

表 3 与 T、B 细胞受体信号通路相关分子同源的信号分子

编号	Unigene	长度(bp)	在 Nr 数据库注释的同源基因	序列登录号	e 值	FPKM_C	FPKM_E
1	Lj84612_c0	2285	B-细胞淋巴瘤因子 10	XP_003223119.1	1.09E-20	5.89	5.7
2	Lj90208_c0	5038	凋亡加强结构域蛋白 11	EDL89719.1	5.00E-150	4.07	5.46
3	Lj87142_c1	1615	肝醣合成酶激酶-3 β	XP_003226831.1	0	28.43	38.1
4	Lj47878_c0	2384	生长因子受体结合蛋白 2	BAE33439.1	1.09E-127	36.23	43.91
5	Lj93843_c0	4636	原癌基因 HRas	XP_003202040.1	2.55E-45	71.74	92.17
6	Lj82595_c1	475	原癌基因 KRas	NP_113703.1	1.34E-73	31.76	41.59
7	Lj91957_c0	6568	鸟嘌呤核苷酸交换因子 VAV	XP_002199325.1	0	2.46	3.3
8	Lj90380_c0	4338	B 细胞 κ 轻链基因增强子抑制因子、激酶 β	XP_003464671.1	0	10.69	11.86
9	Lj89998_c1	2995	B 细胞 κ 轻链基因增强子抑制因子、激酶 γ	XP_004001080.1	3.14E-47	34.11	35.92
10	Lj61718_c0	1168	丝裂原活化蛋白激酶 1/3	NP_786987.1	0	37.69	56.67
11	Lj91599_c2	1825	丝裂原活化蛋白激酶 2	XP_003421972.1	2.90E-90	6.49	7.13
12	Lj91664_c1	3607	黏膜相关淋巴组织淋巴瘤转运蛋白 1	XP_003827367.1	2.67E-125	32.19	56.12
13	Lj91212_c1	1881	B 细胞 κ 轻链基因增强子抑制因子、激酶 ϵ	NP_001133852.1	7.50E-37	77.8	76.69
14	Lj89413_c0	3802	细胞核因子 p50/k 基因结合核因子	EDL82272.1	4.61E-131	67.44	54.74
15	Lj37671_c0	1222	活化 T 细胞核因子 1	EDL75219.1	1.56E-116	11.36	15.73
16	Lj90248_c0	3455	磷酸肌醇 3-激酶	NP_999104.1	0	17.03	19.01
17	Lj79348_c0	3550	磷酸肌醇 3-激酶调节亚基	XP_003972088.1	1.42E-70	1.87	2.07
18	Lj88763_c0	1780	蛋白激酶 B α	XP_002916535.1	0	99.16	111.46
19	Lj84495_c1	4719	丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 2B 调节亚基	JAA50732.1	7.97E-104	41.36	41.97
20	Lj88283_c0	7797	鸟苷释放蛋白	XP_002938172.1	0	15.11	15.72
21	Lj92549_c7	2762	转录因子 AP-1	XP_003361982.1	7.91E-41	39.17	43.06
22	Lj90331_c4	3742	p65 转录因子	NP_001096177.1	1.18E-81	67.49	73.63
23	Lj90140_c1	403	蛋白酪氨酸磷酸酯酶非受体 6 型	EFN65023.1	3.35E-25	7.37	11.13
24	Lj74388_c0	335	p21 活化蛋白激酶 2	BAC29802.1	2.83E-40	0.43	2.15
25	Lj39065_c0	2295	3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1	XP_003790963.1	0	20.78	23.74
26	Lj89105_c0	1000	细胞分裂周期蛋白 42	AFJ49681.1	1.10E-121	180.25	207.18
27	Lj79384_c1	2358	突触相关蛋白 97	XP_003641811.1	0	9.29	15.83
28	Lj89241_c0	4493	E3 泛素蛋白连接酶 CBL	EDM11080.1	0	4.86	9.08
29	Lj92398_c0	2431	丝裂原活化蛋白激酶激酶 7	XP_003340802.1	0	12.95	14.93
30	Lj94133_c4	3200	丝裂原活化蛋白激酶激酶 14	4DN5	5.33E-45	10.16	17.12
31	Lj90639_c0	3589	丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 7	ELK00075.1	0	21.54	19.15
32	Lj58355_c0	1253	NCK 衔接因子蛋白	XP_002666641.1	1.39E-83	8.8	9.65
33	Lj9627_c0	249	p21 活化激酶 1	XP_420314.2	2.38E-34	0	1.05
34	Lj91123_c1	1771	p21 活化激酶 3	XP_003226447.1	0	52.57	77.76
35	Lj63381_c1	2978	p21 活化激酶 7	BAE89964.1	9.50E-172	20.92	20.95
36	Lj92683_c3	2621	有丝分裂原激活蛋白激酶 p38	XP_003441575.1	0	44.79	56.49
37	Lj233996_c0	816	磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C	XP_003229730.1	1.27E-129	2.24	2.61
38	Lj93304_c1	2264	ras 同源物基因家族, 成员 A	NP_001187623.1	1.13E-121	506.24	498.3
39	Lj89468_c3	3606	受体型蛋白酪氨酸磷酸酯酶 C	XP_003229730.1	0	19.14	27.51
40	Lj90579_c1	2386	酪氨酸蛋白激酶 Lck	2OFV	1.37E-54	11.43	11.87
41	Lj88855_c1	2902	酪氨酸蛋白激酶 Fyn	BAA84740.1	2.63E-114	5.59	10.02
42	Lj83556_c0	3512	酪氨酸蛋白激酶 Tec	BAD52302.1	0	17.82	20.29
43	Lj94607_c5	970	酪氨酸蛋白激酶 ZAP-70	XP_003978120.1	1.12E-41	7.8	11.34
44	Lj89977_c0	4153	B 细胞连接蛋白	XP_003755296.1	6.71E-26	5.1	6.42
47	Lj39084_c0	1536	CD81 抗原	AAN64299.1	9.19E-139	173.26	162.43

续表 3

编号	Unigene	长度(bp)	在 Nr 数据库注释的同源基因	序列登录号	e 值	FPKM_C	FPKM_E
48	Lj93599_c2	1117	磷酸化酪氨酸和磷酸肌醇双重衔接蛋白 1	XP_003772990.1	1.81E-101	19.26	25.31
49	Lj94025_c0	2747	含 SH2 结构域的肌醇磷酸酶	NP_001034893.1	0	4.5	8.44
50	Lj91415_c1	4434	磷脂酰肌醇 3-激酶接头蛋白 1	AAN64296.2	0	4.18	5.87
51	Lj85578_c0	2443	Ras 相关的 C3 肉毒杆菌毒素底物 1	2YIN	5.21E-119	63.14	64.78

注：FPKM_C 和 FPKM_E 分别表示对照组和实验组 FPKM 值，字体加粗的数值表示与对照组相比表达量显著上调($q < 0.005$)。

表 4 鳃中表达的可变淋巴细胞受体(VLR)的类型

Unigene	长度(bp)	在 Nr 数据库注释的同源基因	序列登录号	e 值	FPKM_C	FPKM_E
Lj93501_c0	2508	VLRA	BAJ14924.1	6.17E-44	24.04	32.05
Lj79539_c0	386	VLRA cassette	ABO85618.1	2.74E-35	0.63	0.62
Lj85070_c0	2982	VLRA cassette	ABO85331.1	3.94E-66	7.75	6.69
Lj67200_c0	250	VLRA diversity region	ABO21237.1	1.74E-42	1.03	1.09
Lj85018_c0	245	VLRA diversity region	ABO21223.1	1.19E-43	0	2.85
Lj30173_c0	297	VLRB	BAF43201.1	2.36E-60	0.59	1.79
Lj82691_c0	394	VLRB	BAF43229.1	2.68E-92	2.13	1.99
Lj76425_c0	225	VLRB	BAF43288.1	5.31E-38	4.46	5.2
Lj93338_c0	274	VLRB	BAF43235.1	3.27E-43	0	5.34
Lj88380_c0	1646	VLRB	AAT70353.1	8.15E-139	109.04	181.61
Lj1694042_c0	219	VLRB cassette	ABO85781.1	4.03E-26	1.83	0
Lj85335_c0	807	VLRB diversity region	ABA40076.1	1.13E-30	3.85	7.49
Lj82384_c0	406	VLRC	BAJ15012.1	1.37E-53	0	1.12
Lj75884_c0	360	VLRC	BAJ14950.1	3.02E-47	0	1.81
Lj86227_c0	1361	VLRC	BAJ14967.1	4.43E-18	7.52	7.91
Lj93338_c1	2413	VLRC	BAJ14926.1	3.18E-79	24.68	32.87

注：FPKM_C 和 FPKM_E 分别表示对照组和实验组 FPKM 值，字体加粗的数值表示与对照组相比表达量显著上调或下调($q < 0.005$)。

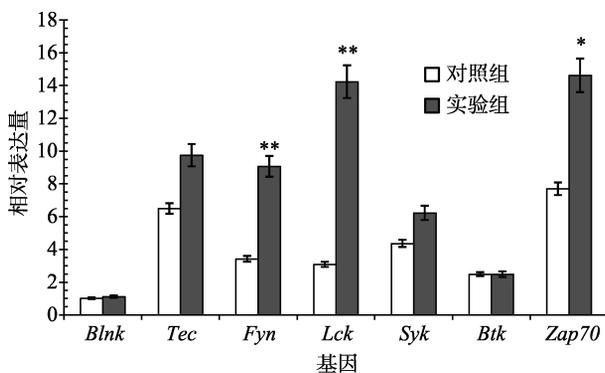


图 2 7 种蛋白激酶 mRNA 表达情况的实时荧光定量 PCR 验证

Blnk：B 细胞连接蛋白；Tec：酪氨酸蛋白激酶 Tec；Fyn：酪氨酸蛋白激酶 Fyn；Lck：酪氨酸蛋白激酶 Lck；Syk：脾酪氨酸激酶 Syk；Btk：布鲁顿酪氨酸激酶 Btk；Zap-70：酪氨酸蛋白激酶 Zap-70。*： $P < 0.05$ ；**： $P < 0.01$ 。

3 讨论

长期以来，人们普遍认为高等脊椎动物的适应性免疫系统是由无脊椎动物的先天性免疫系统直接进化而来^[24]。随着研究的深入，发现以七鳃鳗和盲鳗为代表的古老的无颌类脊椎动物存在类似脊椎动物所具有的适应性免疫现象，同时还存在着许多与脊椎动物适应性免疫分子同源的分子^[25]。而 VLR 及其重组机制的发现，挑战了先天性免疫进化学说；这种在无颌类脊椎动物中富含亮氨酸重复序列 (Leucine-rich repeat) 插入的重组机制，极有可能是现代适应性免疫的起源。因此，作为研究脊椎动物起源与进化的模式动物，七鳃鳗也逐渐成为探讨适应性免疫起源与进化的关键物种。本研究成功构建了日本七鳃鳗黏膜免疫重要组织鳃的 cDNA 文库，通

过转录本的注释,探索 and 发现日本七鳃鳗组织适应性免疫相关分子的组成及表达。本文为进一步研究七鳃鳗黏膜组织各淋巴细胞亚群适应性免疫应答的机制,以及适应性免疫系统的起源与进化提供了有价值的线索。

高等脊椎动物的适应性免疫应答反应是指抗原特异性 T、B 细胞受抗原刺激后,从自身活化开始到增殖、分化为效应细胞,产生一系列生物学效应的全过程。参与此过程的信号通路主要有 TCR 和 BCR 信号通路。TCR 是一种 T 细胞膜蛋白复合物,与 CD3 分子一起形成 T 细胞受体复合体来参与抗原呈递时 T 细胞的激活。由于 TCR 具有两种类型(TCR $\alpha\beta$ 和 TCR $\gamma\delta$),T 细胞也相应存在两种亚群($\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ T 细胞)^[26]。与有颌类脊椎动物相比,无颌类脊椎动物的适应性免疫系统尚没有进化出完善的 MHC 抗原呈递机制,也没有发现 TCR 及 BCR 存在。但是,Guo 等^[12]发现在七鳃鳗中存在 VLRA⁺和 VLRB⁺两种淋巴细胞亚群,其免疫反应类似于 T 和 B 细胞;Hirano 等^[27]发现在七鳃鳗鳃囊中除了存在少量 VLRB⁺类淋巴细胞外,还存在 VLRA⁺和 VLRC⁺两种类淋巴细胞,它们除了分别特异性表达 VLRA 和 VLRC 外,也分别表达高等脊椎动物 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ T 细胞分化相关的一些直系同源基因。因此,该研究提出 VLRA⁺和 VLRC⁺两种类淋巴细胞在起源上与 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ T 细胞有共同的祖先。本研究也发现在七鳃鳗的鳃囊中有 VLRA、VLRB 和 VLRC3 种受体分子的表达(表 4),说明七鳃鳗黏膜免疫组织内有 3 种类淋巴细胞亚群分布。由于鳃囊中毛细血管丰富,本文检测到相对较多数量的 VLRB 受体的原因可能是由于外周血中 VLRB⁺类淋巴细胞比例较高所造成的。尽管此前的研究在七鳃鳗中发现 VLRA⁺、VLRC⁺及 VLRB⁺3 种类淋巴细胞在起源上类似于有颌类脊椎动物的 $\alpha\beta$ 、 $\gamma\delta$ T 及 B 细胞,但参与这 3 种 VLR 受体信号转导的分子基础有哪些尚未涉及。本研究发现七鳃鳗组织存在与高等脊椎动物 T、B 细胞信号通路 51 个信号分子同源的 Unigene(表 3)。其中,有 23 个分子为 T、B 信号通路所共有,另外分别有 20 和 8 个分子为 T 和 B 细胞信号通路所特有。这些结果反映出无颌类和有颌类脊椎动物适应性免疫应答尽管在机制上不同,但在一定程度上具有共同的遗传基础。

T 细胞被 MHC 递呈的抗原肽激活后,CD3 ζ 链

的免疫受体酪氨酸激活基序(Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)的酪氨酸残基被胞内的酪氨酸蛋白激酶 Lck 磷酸化,然后募集其他含有 SH2(Scr homology 2)结构域的酪氨酸蛋白激酶(Fyn 和 Zap-70 等),并诱导一系列细胞内信号级联反应^[26]。BCR 依靠 B 细胞外膜的免疫球蛋白受体分子识别抗原,然后将细胞外信号通过跨膜的 CD79 α /CD79 β 异二聚体胞内结构域的 ITAM 基序传导进胞内。后者通过募集激酶 Lyn、Syk 及 PI3K 和接头分子 GAB1 和 BLNK 等启动细胞内信号传导过程^[28]。本文发现在 28 个注释参与 T 和 B 细胞信号通路的分子中存在与 TCR(酪氨酸蛋白激酶 Lck、Fyn、Zap-70 和 Tec)以及 BCR(B 细胞连接蛋白 Blnk、脾酪氨酸激酶 Syk 和布鲁顿酪氨酸激酶 Btk)邻近的上游信号分子,通过实时荧光定量 PCR 方法验证了它们在日本七鳃鳗鳃囊组织中的转录表达情况(图 3)。这些上游信号分子的发现与验证,说明七鳃鳗各淋巴细胞亚群与高等脊椎动物相比除了跨膜信号转导途径不同以外,它们胞内部分的信号传导机制可能是保守的。另外,本文还发现 Lck、Fyn 和 Zap70 等几个 T 细胞信号转导关键激酶同源分子在免疫激发后显著上调,说明七鳃鳗黏膜免疫系统在受到抗原刺激后主要启动的是类似 T 细胞的免疫应答信号转导途径。

VLR 分子 C 末端具有富含脯氨酸和苏氨酸的茎(Stalk)区和一段疏水尾(Hydrophobic tail)。VLRA 和 VLRC 可以通过糖基磷脂酰肌醇(Glycosyl-phosphatidyl-inositol, GPI)修饰,切掉疏水尾后锚定到类淋巴细胞膜表面^[29]。因此,分布于类淋巴细胞外膜表面的 VLR 分子一定需要跨膜蛋白分子的配合才能向胞内传递信号。由于在无颌类脊椎动物中没有发现 TCR 和 CD3 分子构成的 T 细胞受体复合体及 BCR 和 CD79 构成的 B 细胞抗原受体复合物,因此无颌类脊椎动物 VLR 信号跨膜传导的协同作用分子尚不清楚。Suzuki 等^[30]在盲鳗(*E. burgeri*)类淋巴细胞中发现了无颌类成对抗原受体样分子—APARs (Agnathan paired receptors resembling Ag receptors)。APARs 中的一种(APAR-B)胞内区存在免疫受体酪氨酸抑制基序(Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif, ITIM);还有一类含有 ITAM 基序,被命名为 NICIR(novel ITAM-containing immunoglobulin

superfamily receptors)^[31]。但是 APARs 与各种 VLR 分子跨膜信号传导的联系目前还没有实验证据，未来尚需要进行更深入的研究和探索。

参考文献

- [1] Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*, 2005, 11(4 Suppl): S45–S53. [DOI]
- [2] Lin SH, Davidson GA, Secombes CJ, Ellis AE. A morphological study of cells isolated from the perfused gill of dab and Atlantic salmon. *J Fish Biol*, 1998, 53(3): 560–568. [DOI]
- [3] Press CMcL, Evensen Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, 9(4): 309–318. [DOI]
- [4] Lin SH, Ellis AE, Davidson GA, Secombes CJ. Migratory, respiratory burst and mitogenic responses of leucocytes isolated from the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*, 1999, 9(3): 211–226. [DOI]
- [5] Forey PL, Janvier P. Agnathans and the origin of jawed vertebrates. *Nature*, 1993, 361(6408): 129–134. [DOI]
- [6] Braun CB. The sensory biology of the living jawless fishes: a phylogenetic assessment. *Brain Behav Evol*, 1996, 48(5): 262–276. [DOI]
- [7] Baker ME, Funder JW, Kattoula SR. Evolution of hormone selectivity in glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 137: 57–70. [DOI]
- [8] Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 2006, 124(4): 815–822. [DOI]
- [9] Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GRA, Ceitlin J, Garland GL, Cooper MD. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*, 2004, 430(6996): 174–180. [DOI]
- [10] Pancer Z, Saha NR, Kasamatsu J, Suzuki T, Amemiya CT, Kasahara M, Cooper MD. Variable lymphocyte receptors in hagfish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(26): 9224–9229. [DOI]
- [11] Kasamatsu J, Sutoh Y, Fugo K, Otsuka N, Iwabuchi K, Kasahara M. Identification of a third variable lymphocyte receptor in the lamprey. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(32): 14304–14308. [DOI]
- [12] Guo P, Hirano M, Herrin BR, Li JX, Yu CL, Sadlonova A, Cooper MD. Dual nature of the adaptive immune system in lampreys. *Nature*, 2009, 459(7248): 796–801. [DOI]
- [13] 毛芝娟, 楼丹, 杨波, 吴建军, 吴雄飞, 川合研儿, 陈昌福. 用灭活哈维弧菌菌苗浸泡免疫大黄鱼的研究. *华中农业大学学报*, 2004, 23(3): 326–330. [DOI]
- [14] Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng QD, Chen ZH, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(7): 644–652. [DOI]
- [15] Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer ELL, Tate J, Punta M. Pfam: the protein families database. *Nucl Acids Res*, 2014, 42(D1): D222–D2230. [DOI]
- [16] Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucl Acids Res*, 2008, 36(10): 3420–3435. [DOI]
- [17] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa A, Kanehisa M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucl Acids Res*, 2007, 35(Suppl. 2): W182–W185. [DOI]
- [18] Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*, 2009, 10(3): R25. [DOI]
- [19] Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinform*, 2011, 12: 323–339. [DOI]
- [20] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotech*, 2010, 28(5): 511–515. [DOI]
- [21] Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*, 2010, 11(3): R25. [DOI]
- [22] Wang LK, Feng ZX, Wang X, Wang XW, Zhang XG.

- DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 136–138. [DOI]
- [23] Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genome-wide studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(16): 9440–9445. [DOI]
- [24] Laird DJ, De Tomaso AW, Cooper MD, Weissman IL. 50 million years of chordate evolution: seeking the origins of adaptive immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(13): 6924–6926. [DOI]
- [25] Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 497–518. [DOI]
- [26] Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell*, 2002, 111(7): 967–979. [DOI]
- [27] Hirano M, Guo P, McCurley N, Schorpp M, Das S, Boehm T, Cooper MD. Evolutionary implications of a third lymphocyte lineage in lampreys. *Nature*, 2013, 501(7467): 435–438. [DOI]
- [28] Seda V, Mraz M. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol*, 2015, 94(3): 193–205. [DOI]
- [29] Herrin BR, Alder MN, Roux KH, Sina C, Ehrhardt GRA, Boydston JA, Turnbough CL Jr, Cooper MD. Structure and specificity of lamprey monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 2040–2045. [DOI]
- [30] Suzuki T, Shin-I T, Fujiyama A, Kohara Y, Kasahara M. Hagfish leukocytes express a paired receptor family with a variable domain resembling those of antigen receptors. *J Immunol*, 2005, 174(5): 2885–2891. [DOI]
- [31] Haruta C, Suzuki T, Kasahara M. Variable domains in hagfish: *NICIR* is a polymorphic multigene family expressed preferentially in leukocytes and is related to lamprey *TCR-like*. *Immunogenetics*, 2006, 58(2–3): 216–225. [DOI]

(责任编辑: 胡松年)