

# 斜带石斑鱼转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ ) 基因的 克隆及表达分析\*

平海林, 吴金英, 徐胜威, 胡开顺, 段志刚

(中山大学生命科学学院水生经济动物研究所//广东省水生经济动物良种繁育  
重点实验室, 广东 广州 510275)

**摘要:** 转化生长因子  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) 是一种高度保守的多效细胞因子。通过分子克隆得到了斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* TGF- $\beta 1$  cDNA 全长序列, 全长为 2 477 bp, 开放阅读框为 1 161 bp, 编码一种含 386 个氨基酸的多肽。Realtime PCR 分析表明, TGF- $\beta 1$  基因在健康斜带石斑鱼所取组织中均有表达, 肾脏中表达最高, 其次是头肾和脾脏。用 PolyI: C 或 ConA 刺激斜带石斑鱼头肾淋巴细胞, TGF- $\beta 1$  表达量明显上升, 且在刺激 4 h 后达到最高值。用 PolyI: C 刺激 16、24 h 后, TGF- $\beta 1$  几乎不表达, 而用 ConA 刺激实验组, TGF- $\beta 1$  表达量一直高于对照组。结果说明, 斜带石斑鱼 TGF- $\beta 1$  基因结构和表达特征与其他硬骨鱼类具有高度相似性。

**关键词:** TGF- $\beta 1$ ; 斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides*; 克隆; 表达分析

**中图分类号:** Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2011) 01-0092-07

## Molecular Cloning and Expression Analysis of Transforming Growth Factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ ) from Orange- Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*)

PING Hailin, WU Jinying, XU Shengwei, HU Kaishun, DUAN Zhigang

(Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for  
Aquatic Economic Animals, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)

**Abstract:** Transforming growth factor- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) is a highly conserved pleiotropic cytokine. In this study, we presented the bioinformatics analysis of TGF- $\beta 1$  full-length cDNA sequences from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). The full length cDNA is 2477 bp, which contains an ORF of 1161 bp, encoding a 386 amino acids protein. Real-time PCR results showed that TGF- $\beta 1$  mRNA was predominantly expressed in the kidney, followed by head kidney and spleen of the healthy orange-spotted grouper. The expression of TGF- $\beta 1$  in isolated headkidney lymphocytes was up-regulated treated with PolyI: C or ConA, and peaked at 4 hours after stimulation. Lymphocytes groups which were treated with PolyI: C had little TGF- $\beta 1$  expression after 16 and 24 hours, while the expression of TGF- $\beta 1$  was significantly higher than the control groups during the whole experimental processing time treated with ConA. In conclusion, we found the structure and expression pattern of grouper TGF- $\beta 1$  was similar to those of other fish.

**Key words:** TGF- $\beta 1$ ; *Epinephelus coioides*; cloning; expression

转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 主要由巨噬细胞、成纤维细胞和血小板产生<sup>[1]</sup>, 能参与调节多种细

\* 收稿日期: 2010-01-20

基金项目: 国家海洋 863 资助项目 (2002AA624010); 广东省自然科学基金资助项目 (05003313)

作者简介: 平海林 (1984 年生), 女, 硕士; 通讯作者: 吴金英; E-mail: lsswjy@mail.sysu.edu.cn

胞功能,例如细胞增殖、分化、存活、迁移以及免疫细胞的活化和失活等<sup>[2]</sup>。进化研究表明,TGF- $\beta$  基因相当保守,其配体、受体和与家族蛋白有关的信号分子在节肢动物中也存在,表明该基因在 10 亿年前就已存在<sup>[3]</sup>。哺乳动物中发现 TGF- $\beta$  有 3 种异构体:TGF- $\beta 1$ 、2、3,其中 TGF- $\beta 1$  在所有免疫细胞中都有所表达,并在出现各种压力和多种疾病信号后,参与细胞反应<sup>[4]</sup>。如阻断免疫细胞 TGF- $\beta 1$  的表达,会导致疾病,并伴随慢性炎症的纤维化过程<sup>[5]</sup>,寄生虫病中,TGF- $\beta 1$  分泌可以阻断巨噬细胞活化,并削弱它们的氧化反应<sup>[6]</sup>,人类腹腔和肠道炎症疾病中,TGF- $\beta 1$  信号减少<sup>[7]</sup>。在免疫系统中,成熟的 TGF- $\beta 1$  多肽是一种强有力的细胞分化调节剂和免疫抑制剂,并能下调许多细胞因子的表达。例如,TGF- $\beta 1$  通过 Smad3 信号通路抑制巨噬细胞生长<sup>[8]</sup>,通过诱导 TGF- $\beta$  靶基因 Id3 抑制 B 细胞的增殖<sup>[9]</sup>,也可以诱导结缔组织生长因子(CTGF),促使伤口上的成纤维细胞增殖<sup>[10]</sup>。

在鱼类研究中,TGF- $\beta 1$  序列已经从虹鳟、斑马鱼、鲤鱼、草鱼、金鱼、真鲷和海鲈中克隆得到<sup>[11-17]</sup>,其功能研究报道主要如下:哺乳类重组 TGF- $\beta 1$  可以抑制虹鳟巨噬细胞呼吸爆发活动和头肾白细胞产生巨噬细胞活化因子<sup>[18-19]</sup>;可以诱导草鱼外周血液淋巴细胞的增殖,也可以阻断由植物血凝素或者脂多糖刺激引起的草鱼外周血液淋巴细胞的增殖<sup>[14]</sup>;可以抑制斑马鱼卵细胞成熟,其作用的多位点包括 LHR, 20 $\beta$  HSD 和 mPR- $\beta$ <sup>[12,20]</sup>。重组金鱼 TGF- $\beta 1$  蛋白能够诱导金鱼成纤维细胞(CCL71)的增殖,对 TNF- $\alpha$  活化巨噬细胞的硝化氧化反应有下调作用<sup>[15]</sup>。在大西洋鲑中,TGF- $\beta 1$  下调可导致上皮内淋巴细胞敏化性增强,不能维持正常的远端肠道黏膜的完整性<sup>[21]</sup>。

本研究通过中间片段克隆并结合 RACE 技术,克隆得到了斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* TGF- $\beta 1$  cDNA 全长序列,并通过 Realtime PCR 技术检测了该基因在健康斜带石斑鱼不同组织的分布情况,还检测了用 PolyI: C 或 ConA 刺激斜带石斑鱼头肾淋巴细胞不同时间后,TGF- $\beta 1$  基因的表达情况。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验鱼和样品的采集

实验用健康斜带石斑鱼,2 龄,长 25~30 cm,体质量约 700 g,购自大亚湾水产实验中心,实验

前至少暂养 1 周。取样时先用 MS-222 (Sigma, 美国)麻醉实验鱼并抽出血液,再取所需各组织样品,用液氮速冻保存,然后放于 -80 °C 冰箱备用。

### 1.2 TGF- $\beta 1$ cDNA 的克隆和测序

用常规 Trizol (Invitrogen, 美国)抽提法从斜带石斑鱼肾脏中提取总 RNA,将总 RNA 用反转录试剂盒 (TOYOBO, 日本)反转录合成 cDNA 第一链,并以此作为模板利用简并引物(表 1)扩增 TGF- $\beta 1$  中间片段,然后利用特异性引物(表 1)结合 RACE 技术得到全长 TGF- $\beta 1$  cDNA 序列。PCR 产物连接到 pMD19-T 载体中 (TaKaRa, 日本),序列测序由华大基因公司完成。

### 1.3 生物信息学分析

用 BLAST 程序搜索基因库分析 TGF- $\beta 1$  分子的同源性,通过 DNAtools 6.0 分析开放读码框和相应的氨基酸序列。多重比对通过 CLUSTAL W (www.ebi.ac.uk/clustalw) 来实现。通过 Mega 3.1 软件的 N-J 方法来构建进化树。

### 1.4 Realtime PCR 分析

Realtime PCR 分析所用仪器为 ABI 的 PRISM-7900。每个实验样品设 3 个重复,根据 TGF- $\beta 1$  基因序列合成定量用特异性引物(表 1),以斜带石斑鱼的  $\beta$ -肌动蛋白 cDNA 作为内参,分析 TGF- $\beta 1$  mRNA 的表达谱。

### 1.5 细胞孵育和免疫刺激

实验鱼先用 MS-222 麻醉并抽出血液,断头后取出头肾,用 RPMI-1640 培养基 (Invitrogen, 美国)洗除表面血液,并将组织块在冰上剪碎,研磨成单细胞,过 300 目筛得到单细胞悬浮液。4 °C, 2 000 r/min 离心 10 min,用 RPMI-1640 培养基洗涤沉淀两次,去上清,加入 4 mL 组织培养液重悬细胞。将细胞悬液小心地铺在 3 mL 淋巴细胞分离液 (GE Healthcare, 瑞士)中,19 °C, 1 500 r/min 离心 50 min,收集淋巴细胞,然后转入培养瓶中,在 27 °C,  $\varphi = 5\%$  CO<sub>2</sub> 的条件下培养 5 h 之后除去粘附细胞,收集悬浮细胞,重新培养在六孔板中,再向培养基中加入 50  $\mu$ g/mL 的 PolyI: C (Amersham Bio-science, 美国)或 10  $\mu$ g/mL 的 ConA (Sigma, 美国),以没加刺激物的细胞做阴性对照,设 2、4、8、16 和 24 h 5 个时间段,每个条件组设 3 个重复。通过离心收集细胞,加入 1 mL Trizol 用于总 RNA 的提取,最后用 Realtime PCR 分析 TGF- $\beta 1$  的表达情况。

表 1 引物序列和用途  
Table1 Primer oligonucleotide sequences and their applications

引物名称	序列 (5'→3')	用途
DF1	GAYCTGGRNTGGAARTGGAT	TGF-β1 中间片段
DF2	GARGCBATTMGRRHGACAGAT	TGF-β1 中间片段
DR1	GCMGAKGCWCCDGGRTTGTG	TGF-β1 中间片段
GR2	GTTTTACAGATTCCAGATGTAGGTG	TGF-β1 中间片段
3GF1	GACCTGGGGTGGAAGTGGAT	TGF-β1 3'-RACE
3GF2	CACCTACATCTGGAATGCTGAAAAC	TGF-β1 3'-RACE
5GR1	ACTCTTCTTCTCTCTCTCTGTG	TGF-β1 5'-RACE
TF1	CACCTACATCTGGAATGCTGAAAAC	定量表达
TR2	CTGCTCCACCTTGTGTTGCCTGC	定量表达
Oligo dT	CGACUGGAGCACCAGGACACUGGAGUGAAGAGUAG AAAGCTGTCAACGATACGTACGTAACGGCATGACAGTG (T) 18	
NUPA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
3'-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT C (T) 30 (AGC)	通用引物
UPMA-S	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
UPMA-L	CTAATACGACTCACTATAGGGCAACGAGTGG TATCAACGCAGAGT	
5'-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	

## 1.6 统计分析

统计数值采用算术平均数 ± 标准差来表示 ( $n=3$ )。统计差异性用单因子方差分析中的 LSD 和 Duncan's 检测, 0.05 和 0.01 水平用来指示差异的显著性, 所有数据采用 SPSS Statistics 16.0 软件分析。

## 2 结果

### 2.1 斜带石斑鱼 TGF-β1 cDNA 全长序列

利用中间片段非特异性扩增并结合 RACE 技术, 克隆得到了斜带石斑鱼 TGF-β1 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号为 GQ503351), 全长为 2 477 bp, 5'非编码区为 47 bp, 3'非编码区为 1 269 bp, 开放读码框 (Open Reading From, ORF) 为 1 161 bp, 编码一种含 386 个氨基酸的多肽, 包括含信号肽的前导肽和含 112 个氨基酸的成熟肽。在 3'非编码区 polyA 前共有 5 个在细胞因子上常见的 mRNA 不稳定点 (ATTTA) 和一个多聚腺苷酸加尾信号 (AATAAA)。

### 2.2 斜带石斑鱼 TGF-β1 的同源性和系统进化分析

选取的其它物种及其基因在 GenBank 的氨基

酸序列号列举如下: 斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides*, ACV96791; 海鲈 *Morone chrysops* × *Morone saxatilis*, AAD46997; 真鲷 *Sparus aurata*, AAN03842; 虹鳟 *Oncorhynchus mykiss*, CAA67685; 斑马鱼 *Danio rerio*, AAI62361; 大西洋鲑 *Salmo salar*, ACN11294; 草鱼 *Ctenopharyngodon idella*, ABU84814; 鲤鱼 *Cyprinus carpio*, AAF22573; 金鱼 *Carassius auratus*, ABU55371; 蝶螈 *Ambystoma mexicanum*, ABX24523; 牛 *Bos taurus*, AAA30778; 马 *Equus caballus*, AAD49431; 猪 *Sus scrofa*, AAC83807; 挪威鼠 *Rattus norvegicus*, AAH76380; 家鼠 *Mus musculus*, AAH13738; 长尾猴 *Chlorocebus aethiops*, AAA35369; 人 *Homo sapiens*, AAH01180。

氨基酸序列比对结果显示, 在前导肽区域有整合素结合位点 (RGD) 和 KEX-Furin 样蛋白酶识别位点 (RKKR); 成熟肽区域有 36 位点的脯氨酸和 46 位点的甘氨酸以及由 9 个半胱氨酸组成的典型的 "cysteine knot" 结构 (图 1)。用 MEGA3.1 邻接法构建 TGF-β1 家族进化树结果表明, 斜带石斑鱼和其他鱼类进化树在同一分支上, 与海鲈亲缘关系最近, 与两栖类和哺乳类亲缘关系较远 (图 2)。

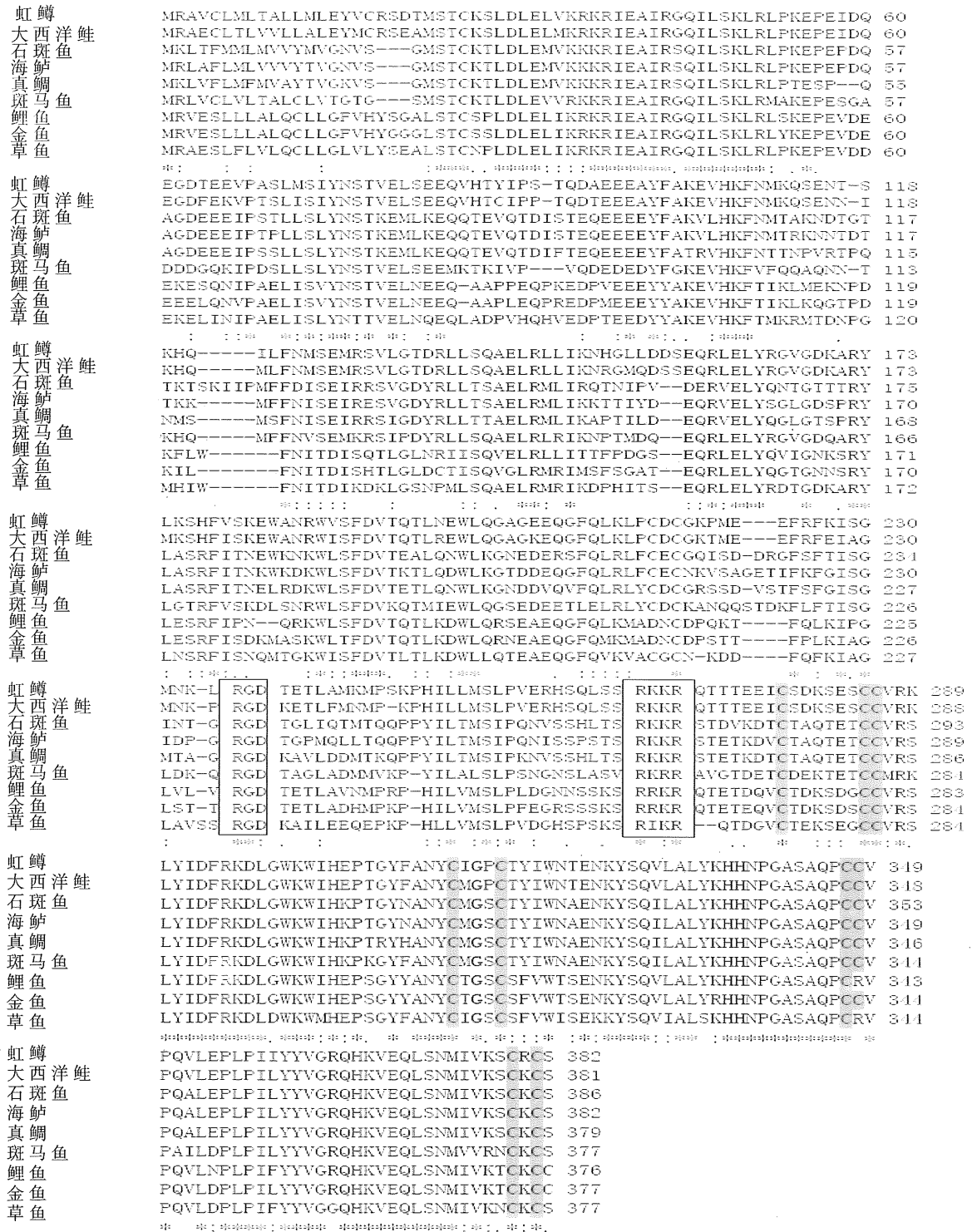


图 1 斜带石斑鱼 TGF- $\beta 1$  的氨基酸序列与已知的其它鱼类序列的比较

Fig. 1 Amino acid alignment of *E. coioides* TGF- $\beta 1$  and other known TGF- $\beta 1$  amino acid sequences of fish

(框架标明整合素位点 RGD 及标志成熟肽起始的 RKKR 结构; 阴影标明保守的半胱氨酸; 黑体标明成熟肽 36 位点的脯氨酸和 46 位点的甘氨酸)

2.3 斜带石斑鱼 TGF- $\beta 1$  的组织表达分析

Realtime PCR 结果表明, 斜带石斑鱼 TGF- $\beta 1$  基因在肾脏、头肾、脾脏、鳃、肝脏、肠道、心

脏、肌肉、脑、性腺、眼各组织中均有表达, 其中在肾脏中表达最高, 其次是头肾和脾脏, 在肌肉和眼中表达最少(图 3)。

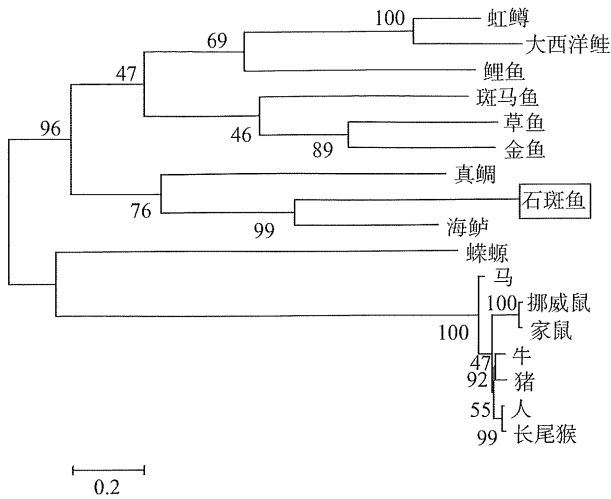


图 2 斜带石斑鱼和其它动物 TGF-β1 氨基酸序列的系统进化数构建

Fig. 2 Construction a phylogenetic tree of amino acid sequence of *E. coioides* TGF-β1 and other species

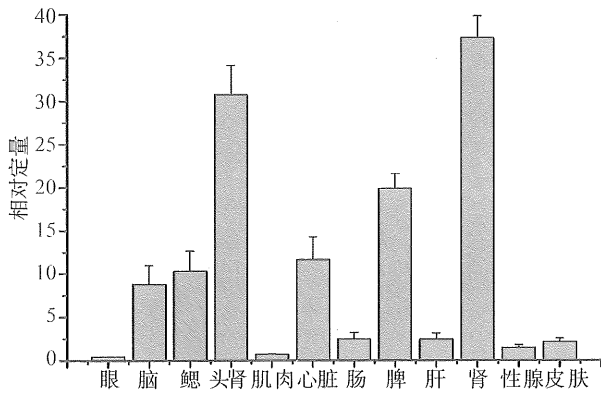


图 3 TGF-β1 在健康斜带石斑鱼各组织中的表达分析  
Fig. 3 Real-time PCR analysis of TGF-β1 expression in various tissues of healthy *E. coioides*

2.4 斜带石斑鱼 TGF-β1 在刺激头肾淋巴细胞中的表达分析

Realtime PCR 结果表明, 用 PolyI: C 或 ConA 刺激头肾淋巴细胞后, 斜带石斑鱼 TGF-β1 表达量都明显上升, 刺激 4 h 后达到最高, 其中 ConA 组是对照组表达量的 27 倍, PolyI: C 组是对照组的 3 倍。刺激 4 h 后表达量均有所下降, 其中用 PolyI: C 刺激头肾淋巴细胞 16、24 h 后, TGF-β1 基本无表达, 而用 ConA 刺激实验组, 虽然在 4 h 后 TGF-β1 表达量有所下降, 但一直高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 特别在刺激 4、8、16 h 后, 表达量显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。

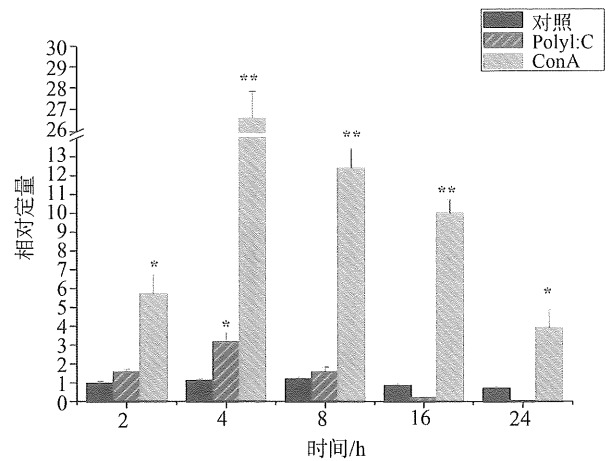


图 4 斜带石斑鱼 TGF-β1 在刺激头肾淋巴细胞中的表达  
Fig. 4 Real-time PCR analysis of TGF-β1 expression in stimulated lymphocytes of *E. coioides* head kidney  
\* 和 \* \* 表示实验组与对照组具有显著性差异, 分别以  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  做统计分析

3 讨论

本研究克隆得到了斜带石斑鱼 TGF-β1 全长 cDNA 序列, 在成熟肽区域, 具有和其他鱼类一样保守的 9 个半胱氨酸组成的典型的 “cysteine knot” 结构<sup>[12,15,17,22]</sup>, 其中的 8 个半胱氨酸以成对的方式形成分子中心区的 4 对链内二硫键, 结合第 9 个半胱氨酸形成链间二硫键一起形成 TGF-β 二聚体<sup>[11]</sup>。整合素结合位点 (RGD) 能够与整合素特异结合, 例如能够与  $\alpha_v\beta_6$  特异结合, 从而使潜活型的 TGF-β1 活化<sup>[23]</sup>, KEX-Furin 样蛋白酶识别位点 (RKRR) 可以使前体蛋白转化为成熟蛋白, 另有研究显示 C 型胶原蛋白酶也可通过此位点裂解 TGF-β 前期复合物<sup>[11]</sup>, 以及成熟肽 36 位点的脯氨酸和 46 位点的甘氨酸, 都表明斜带石斑鱼 TGF-β1 具有超家族特征标志<sup>[22]</sup>, 延续了 TGF-β1 基因在进化过程中的保守性。

TGF-β1 基因在所取斜带石斑鱼的各个组织中都表达, 而在虹鳟和草鱼中, TGF-β1 基因在肝脏中检测不到表达<sup>[11,14]</sup>, 在鲤鱼肌肉中检测不到表达<sup>[13]</sup>, 表明 TGF-β1 在鱼类各组织中的表达具有一定差异性。在硬骨鱼类, 像草鱼和斑马鱼, 肾脏是主要的 B 细胞产生和结合位点<sup>[24]</sup>; 虹鳟中, 发育中的 B 细胞在头肾中成熟, 然后迁移到脾脏或者后肾的活化位点<sup>[25]</sup>; 脾脏是免疫球蛋白 M 在软骨鱼类表达的的第一个站点<sup>[26]</sup>, 斜带石斑鱼 TGF-β1 基因在肾脏、头肾、脾脏中高表达, 表明 TGF-β1 基因在斜带石斑鱼免疫系统中可能具有潜在功能。

用 PolyI: C 和 ConA 刺激斜带石斑鱼头肾淋巴细胞后, TGF- $\beta 1$  基因表达量升高, 这与在鲤鱼头肾白细胞中观察到的结果一致<sup>[13]</sup>。另有报道表明, 在金鱼和虹鳟中, 用 LPS 和 rTNF- $\alpha$  刺激的巨噬细胞中, TGF- $\beta 1$  基因表达量也上升<sup>[15,27]</sup>。因此, 斜带石斑鱼 TGF- $\beta 1$  的表达量在刺激后有所上升, 表明了 TGF- $\beta 1$  对类似有丝分裂类因子的刺激, 与其它典型的细胞因子一样做出了积极反应, 对淋巴细胞的活化是必不可少的<sup>[28]</sup>。在刺激超过 4 h 后, 可能是前 4 h 大幅增加的 TGF- $\beta 1$  抑制了淋巴细胞的增殖, 从而使 TGF- $\beta 1$  表达量下降, 有研究报告表明, LPS 和 ConA 可诱导鲤鱼外周血液淋巴细胞的增殖<sup>[29]</sup>, 而 rTGF- $\beta 1$  可以阻断由 PHA 和 LPS 诱导的草鱼外周血液淋巴细胞的增殖<sup>[14]</sup>, 表明 TGF- $\beta 1$  在调控鱼类淋巴细胞的增殖方面和哺乳类具有相似的作用, 但其作用的分子机制还有待进一步研究。

TGF- $\beta 1$  作为一种多效应的细胞免疫因子, 其功能在哺乳动物中研究较多, 作用的效果取决于多项因素, 如分泌的时间, 浓度, 受体的表达, 细胞分化的周期等<sup>[30-32]</sup>, 但是在鱼类, 对 TGF- $\beta 1$  的功能研究还比较少, 有待进一步发展和完善。

#### 参考文献:

- [1] TAKEHARA K. Growth regulation of skin fibroblast[J]. *Dermatology Science*, 2000, 24: 70 - 77.
- [2] LI Ming O, SANJABI S, ROBERTSON A K, et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses[J]. *Annual Review Immunology*, 2006, 24: 99 - 146.
- [3] NEWFELD S J, WISOTZKEY R G, KUMAR S. Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers [J]. *Genetics*, 1999, 152: 783 - 795.
- [4] LETTERIO J J, ROBERTS A B. TGF-beta: a critical modulator of immune cell function[J]. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1997, 84: 244 - 250.
- [5] BORDER W A, NOBLE N A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis [J]. *New England Journal Medicine*, 1994, 331: 1286 - 1292.
- [6] TSUNAWAKI S, SPORN M, DING A, et al. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta [J]. *Nature*, 1988, 334: 260 - 262.
- [7] MONTELEONE G, KUMBEROVA A, CROFT N M, et al. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel diseases[J]. *Journal Clinical Investigation*, 2001, 108: 601 - 609.
- [8] WERNER F, JAIN M K, FEINBERG M W, et al. Transforming growth factor-beta1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3 [J]. *Journal Biology Chemistry*, 2000, 275: 36653 - 36658.
- [9] KEE B L, RIVERA R R, MURRE C. Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF-beta[J]. *Nature Immunology*, 2001, 2: 242 - 247.
- [10] KOTHA P D, FRAZIER K S, WELPLY A, et al. Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway[J]. *Cell Growth Differentiation*, 1997, 8: 61 - 68.
- [11] HARDIE L J, LAING K J, DANIELS G D, et al. Isolation of the first piscine transforming growth factor beta gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Cytokine*, 1998, 10: 555 - 563.
- [12] KOHLI G, HU Siqin, PENG Chun, et al. Cloning of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and its type II receptor from zebrafish ovary and role of TGF-beta1 in oocyte maturation [J]. *Endocrinology*, 2003, 144: 1931 - 1941.
- [13] ZHAN Yin, JIMMY K. Molecular isolation and characterisation of carp transforming growth factor beta 1 from activated leucocytes [J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2000, 10: 309 - 318.
- [14] YANG Mu, ZHOU Hong. Grass carp transforming growth factor- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ): Molecular cloning, tissue distribution and immunobiological activity in teleost peripheral blood lymphocytes[J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45: 1792-1798.
- [15] GEORGE H, PATRICK C H, ELAINE C, et al. Molecular and functional characterization of goldfish (*Carassius auratus* L.) transforming growth factor beta [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32: 654-663.
- [16] TAFALLA C, ARANGUREN R, SECOMBES C J, et al. Molecular characterisation of sea bream (*Sparus aurata*) transforming growth factor beta1 [J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2003, 14: 405 - 421.
- [17] HARMS C A, HORNE W A, FULLER F J, et al. Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis*  $\times$  *M. chrysops*) transforming growth factor-beta (TGF-beta) and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay to measure TGF-beta mRNA of teleost fish[J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2000, 10: 61-85.
- [18] JANG S I, HARDIE L J, SECOMBES C J. The effects of transforming growth factor  $\beta 1$  on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2000, 10: 61-85.

- corhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1994, 18: 315 - 323.
- [19] JANG S I, HARDIE L J, SECOMBES C J. Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage derived supernatants [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1995, 57: 943 - 947.
- [20] TAN Qian, ZAGRODNY A, PENG Chun, et al. Regulation of membrane progesterin receptors in the zebrafish ovary by gonadotropin, active, TGF- $\beta$  and BMP-15 [J]. *Molecular and Cell Endocrinology*, 2009, 312: 72 - 79.
- [21] EINAR L, MICHAEL H P, XU Cheng, et al. Decreased expression of TGF- $\beta$ , GILT and T-cell markers in the early stages of soybean enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2009, 27: 65-72.
- [22] DAVID W B, ANDREW S L. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily [J], *Progress in Growth Factor Research*, 1994, 5: 99 - 107.
- [23] ANNES J, MUNGER J, RIFKIN D. Making sense of latent TGF $\beta$  activation [J]. *Journal Cell Science*, 2003, 116: 217 - 224.
- [24] TOMAS B, BLEU C C. The evolutionary history of lymphoid organs [J]. *Nature Immunology*, 2007, 8: 131 - 135.
- [25] ZWOLLO P, COLE S, BROMAGE E, et al. B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney [J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 174: 6608 - 6616.
- [26] MIRACLE A L, ANDERSON M K, LITMAN R T, et al. Complex expression patterns of lymphocyte-specific genes during the development of cartilaginous fish implicate unique lymphoid tissues in generating an immune repertoire [J]. *International Immunology*, 2001, 13: 567 - 580.
- [27] BRUBACHER J L, SECOMBES C J, ZOU J, et al. Constitutive and LPS-induced gene expression in a macrophage-like cell line from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2000, 24: 565 - 574.
- [28] LETTERIO J J, ROBERTS A B. Regulation of immune responses by TGF- $\beta$  [J]. *Annual Review of Immunology*, 1998, 16: 137 - 161.
- [29] REYNAUD S, DESCHAU X P. The effects of 3-methylcholanthrene on lymphocyte proliferation in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Toxicology*, 2005, 211: 156 - 164.
- [30] DERYNCK R, ZHANG Ye. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling [J]. *Nature*, 2003, 425: 577 - 584.
- [31] WAHL S M. Transforming growth factor-beta: innately bipolar [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2007, 19: 55-62.
- [32] WAHL S M, SWISHER J, CHEN W, et al. TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 76: 15 - 24.

(上接第 91 页)

#### 参考文献:

- [1] TUCKER K C, RICHARDSON D M. An expert system for screening potentially invasive alien plants in south African fynbos [J]. *Environmental Management*, 1995, 44: 309 - 338.
- [2] 徐汝梅. 生物入侵——数据集成、数量分析与预警 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [3] RUGINI E, MENCUCCINI M, BIASI R, et al. Olive (*Olea europaea* L.) [J]. *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 2005, 345 - 360.
- [4] HIJMANS R J, CAMERON S E, PARRA J L, et al. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land Areas [J]. *International Journal of Climatology*, 2005, 25: 1965 - 1978.
- [5] ANDERSON R P, LEW D, PETERSON A T. Evaluating predictive models of species' distributions: Criteria for selecting optimal models [J]. *Ecological Modelling*, 2003, 162: 211 - 232.
- [6] HEIN S, BINZENHOFER B, POETHKE H J, et al. The generality of habitat suitability models: A practical test with two insect groups [J]. *Basic and Applied Ecology*, 2007, 8: 310 - 320.
- [7] LAURA M. A comparison of the predictive abilities of four approaches for modelling the distribution of cetaceans [D]. Aberdeen, U. K: University of Aberdeen, 2004.
- [8] 魏淑秋, 章正, 郑耀水. 应用生物气候相似距对小麦矮化腥黑穗病在我国定殖可能性的研究 [J]. *北京农业大学学报*, 1995, 21(2): 127 - 131.
- [9] 左闻韵, 劳逆, 耿玉英, 等. 预测物种潜在分布区——比较 SVM 与 GARP [J]. *植物生态学报*, 2007, 31(4): 711 - 719.