

文章编号: 1004-0374(2012)04-0362-06

补体系统的进化

余英才¹, 张纯², 夏循礼¹, 梁永红^{1*}

(1 江西中医学院, 南昌 330004; 2 南昌工程学院, 南昌 330099)

摘要: 补体系统中的大多数组织成员有着特征性的结构域及其特有的结构域组合形式, 这使得我们可以利用基因组数据研究分析补体系统的起源与进化。综合文献报道和数据分析, 发现补体系统的某些结构域存在于低等的后口动物, 甚至在原口动物中也有大量分布, 但哺乳动物中特有的结构域组合方式只在后口动物中存在。这些揭示了补体系统拥有比适应性免疫更早的起源, 完善的补体系统可能形成在后口动物中的无脊椎动物, 而更为原始的补体系统雏形则在原口动物中已经出现。就近些年的研究成果作一综述, 以期系统阐明补体系统的起源与进化。

关键词: 补体系统; 膜攻击复合体; MBL; C3; 进化

中图分类号: Q352; R392.1; Q961 **文献标志码:** A

Evolution of the complement system

YU Ying-Cai¹, ZHANG Chun², XIA Xun-Li¹, LIANG Yong-Hong^{1*}

(1 Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2 Nanchang Institute of Technology, Nanchang 330099, China)

Abstract: Most of complement components show characteristic domain structure and adopt unique combinations, enabling us to study the origin and evolution of the complement system by using genome database. According to the data published in literatures and genome database, most of characteristic domains are present in genomes of invertebrate deuterostomes, even in protostomes. However, unique combinations of these domains founded in human complement components are not found in those genomes of protostomes. All of these are indicating that the origin of the complement system is much more ancient than that of adaptive immunity, the perfect complement system seems to have been established at the early stage of deuterostome evolution, and the more primitive one have emerged in protostomes. This review will focus on the recent progress in comparative immunology of complement system.

Key words: complement system; membrane attack complex; MBL; C3; evolution

为应对环境存在的大量病原微生物的压力, 生物体在漫长的进化过程中发展了一套复杂而精确的抗感染机制——免疫系统, 包括先天性免疫系统和适应性免疫系统。补体系统是由一系列约 40 种蛋白质分子所组成, 有着精密调控机制的蛋白质反应系统。它参与破坏或清除病原微生物, 是先天性和适应性免疫的交汇点, 包括经典途径 (classical pathway)、凝集素途径 (lectin pathway) 和旁路途径 (alternative pathway) 三条激活途径。大量的证据表明, 适应性免疫系统建立在有颌类脊椎动物进化的早期^[1], 而补体系统却有更早的起源, 像无颌脊椎

动物七鳃鳗 (lamprey) 和盲鳗 (hagfish), 甚至无脊椎的后口动物, 如海胆 (sea urchin)、海鞘 (ascidian) 和文昌鱼 (amphioxus) 等均发现该系统的存在^[2]。这些动物都被认为出现在两次基因组大规模复制之前, 因此, 推测它们的补体系统要比高等脊椎动物的更为简单。相对于后口动物, 那些补体系统特异

收稿日期: 2011-12-12; 修回日期: 2012-01-17

基金项目: 江西中医学院博士启动基金(530009); 江西中医学院重点学科青年教师培养计划项目(530171)

*通信作者: E-mail: liangli4@126.com; Tel: 0791-87118921

的结构域并未在原口动物, 如线虫 (*Caenorhabditis elegans*)和果蝇 (*Drosophila melanogaster*)的基因组数据库中, 推测补体系统是在后口动物进化早期出现的。然而, 补体系统的中心分子C3及其同源基因C4和C5却是个例外, 在一些原口动物中发现了它们的同源基因, 如鲎(*Carcinoscorpius rotundicauda*)的CrC3^[3], 蛤(*Ruditapes decussatus*)的RD-C3^[4], 海葵(*Haliplanella lineate*)和按蚊(*Anopheles gambiae*)的TEP (Thioester containing protein)等^[5-7]。此外, 在鲎和蛤中分别还发现B因子的同源基因^[3-4]。本文就补体系统进化方面的研究做一概述。

1 MBL/C1q/ficolin

补体系统的上游识别分子主要包括C1q、甘露糖结合凝集素 (mannose binding lectin, MBL) 和纤维胶原素 (ficolin), 其中C1q参与经典途径的激活, 而后两者参与凝集素途径的激活, 三者最终均引起C3的活化, 进而引发相应的效应。经典途径是抗体介导的体液免疫应答的主要效应方式, 激活该途径的物质主要是免疫复合物, C1q与免疫球蛋白的Fc段相互结合后, 分子构象发生改变, 引起C1r和C1s的依次活化, 随之引起一系列的效应。C1q所介导的经典途径属适应性免疫范畴, 仅发现于有颌类的脊椎动物中。C1q分子的N端具有胶原区, C端具有C1q结构域; 包含C1q结合域 (C1q domain containing, C1qDC) 在生物界中广泛存在, 甚至在低等的细菌中也有发现^[8], 而具备高等脊椎动物类似结构的C1q或C1q样分子目前仅在后口动物中发现。最近几年, 不断有更为低等的物种中存在C1q分子, 如在七鳃鳗中发现一个LC1q分子, 该分子不参与经典途径的激活, 却作为凝集素分子与MASP(MBL-associated serine protease)结合参与补体系统的另一激活途径——凝集素途径^[9]。在比七鳃鳗更为低等的动物文昌鱼中也发现一个AmphiC1q1分子, 它具有部分脊椎动物C1q分子的特性, 如抑制血小板凝集等, 但未发现其具有类似七鳃鳗LC1q的功能, 如与GlcNAc结合的能力, 是否也能激活凝集素途径, 暂未见后续的报道^[10]。令人兴奋的是, 目前在低等的无脊椎动物中发现了一系列C1qDC分子, 且实验证明具有参与免疫识别的作用, 如软体动物海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)的AiC1qDC-1分子进行体外实验发现具有真菌凝集活性, 而该活性可以被D-甘露糖和肽聚糖所抑制^[11]; 在贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*)

中发现的MgC1q通过Q-PCR分析也显示作为模式识别分子参与先天性免疫应答^[12]; 紧接着报道鉴定出多达168个C1qDC转录本序列^[13]。这些发现对认识补体分子在早期进化中的起源具有很大的提示作用。从目前的信息来看, 凝集素途径可能拥有比经典途径更早的起源。

MBL和ficolin为模式识别分子, 参与补体系统中凝集素途径的激活, 它们能够识别细菌的甘露糖残基并与其结合, 然后与MASP相结合从而引起一系列的效应。相较其他两条激活途径, 凝集素途径是较晚确立的一条途径, 直至1995年才鉴定明确, 而早期也只在哺乳动物中发现该途径的存在。后来, 在更为低等的脊椎动物中发现了相关分子, 如硬骨鱼类中发现MBL分子, 并且存在多个亚型^[14]。在无颌类七鳃鳗中克隆到MBL分子, 通过功能实验表明其参与补体的激活^[15]; 在海鞘中发现了类似MBL的葡萄糖结合凝集素 (glucose-binding lectin, GBL), GBL具有与MBL一样的糖结合结构域 (C-type lectin domains, CTLDs), 但在N端缺乏胶原区, 实验结果表明也能与海鞘的MASP结合激活凝集素途径^[16]; 之后又克隆到两个具有哺乳动物MBL相同结构的CoiMBL分子, 通过免疫组织化学实验发现与MASP共定位于胃肠道上皮细胞^[17]。MBL的重要功能结构域CTLDS在头索动物文昌鱼基因组中发现超过1 000多个, 远远高于人类, 甚至其他目前已知基因组序列的物种, 推测文昌鱼中该基因处在大爆炸时期, 为精确的功能分工作储备^[18]。此外, 在更为低等的软体动物和节肢动物中也有大量包含CTLDS的凝集素分子。在海湾扇贝中发现多个C型凝集素分子, 其中AiCTL-7具有甘露糖特异的真菌凝集活性, 推测参与初始的急性反应期的免疫应答^[19]。栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)的CfLec-1不但介导免疫识别, 而且具有调理作用^[20], 而调理作用是脊椎动物补体系统的一个重要功能。小龙虾 (*Procambarus clarkii*)的Pc-Lec1以及中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)的Es-lectin分别作为模式识别分子介导细胞免疫反应和参与先天性免疫识别^[21-22]。这一系列研究发现表明, 在原口动物中的C型凝集素分子可能是进化过程中凝集素途径MBL识别分子上游的祖先, 到了后口动物才发展具备胶原区加CTLDS的结构形式, 参与完善的补体系统。

ficolin与MBL结构类似, N端具有胶原区, 只是在C端的纤维蛋白原样结构域 (fibrinogen-like domain, FBG) 取代了糖结合结构域。包含一个或多

个 FBG 结构域的蛋白称为纤维蛋白原相关蛋白 (fibrinogen-related proteins, FREPs), 广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物中, 参与多种免疫反应以及一些生理作用。在人类中, 存在 L-ficolin、H-ficolin 和 M-ficolin 三个分子均能与 MASPs 结合激活补体系统; 在低等生物中也获得新型的 ficolin 分子 AsFCNs, 后来研究发现其中 ficolin 3 可能参与先天性免疫反应, 但是否参与补体激活有待进一步验证^[23-24]。值得一提的是, 最近在文昌鱼中发现了一个 ficolin 的同源分子 BjFCN1, 并通过实验证明参与了补体系统的凝集素途径^[25]。FREPs 分子在无脊椎动物中得到了广泛的研究, 如在文昌鱼中还发现另一个 BtFREP 分子, 具有广谱溶菌活性^[26]; 贻贝中的 FREPs 虽然缺乏胶原区, 但具备类似脊椎动物 ficolins 的活性, 如细菌感染或 PAMP 处理, 这些分子的表达量明显上升, 且呈现调理活性^[27]。通过对 12 个种的果蝇进行全基因组搜索发现, 这些 FBG 结构域具有高度的序列相似性和保守性, 其中一些 FBG 结构预测具有先天性免疫中对微生物表面糖组分及其衍生物的识别功能^[28]。这些表明, FREPs 分子的补体功能的始祖可追溯到原口动物进化早期。

2 丝氨酸蛋白酶

在脊椎动物中, 丝氨酸蛋白酶具有多种功能, 其中之一就是在补体系统中的作用。除因子 D(factor D) 之外, 大多数哺乳动物补体系统中的丝氨酸蛋白酶如 MASP/C1r/C1s、因子 I 和因子 B/C2 都有特征性的结构域——C 末端的丝氨酸蛋白酶结构域 (trypsin-like serine protease, Trypc_SPc), 并在补体系统中起重要的催化作用^[29]。除该结构外, 这些丝氨酸蛋白酶还具有很多其他的结构域, 如 LDLa(LDL receptor domain class A)、CCP (complement control protein)、EGF_CA(calcium-binding EGF-like domain)、CUB(C1, uEGF, bone morphogenic protein)、FIMAC(factor I, membrane attack complex protein) 和 SRCR(scavenger receptor cysteine-rich) 等。这些结构域也存在于低等生物如线虫、果蝇、螭等的基因组中^[5, 30-31], 然而, 哺乳动物补体系统中特有的结构域组合方式 (如 MASP1/2/3、C1r 和 C1s 五个分子具有 CUB-EGF_CA-CUB-CCP-CCP-Tryp_SPc 的结构形式) 并未在它们当中发现, 相反地, 大多数组合方式却在海鞘和文昌鱼中发现^[18, 32-33], 而且脊椎动物因子 B(factor B) 特异的模块结构在棘

皮动物 (echinoderm) 海胆中也是保守的^[34], 因子 I 也首次在有颌脊椎动物以外的物种七鳃鳗中发现^[35], 而对海葵全基因组分析并未发现因子 I 的存在^[36]。这些都暗示完善的补体系统是后口动物所特有的, 据此推断补体系统丝氨酸蛋白酶的基本结构是在后口动物进化早期建立的。

3 C3/C4/C5

C3 是哺乳动物补体系统中最重要的重要组成部分, 是激活和效应中心, 补体系统的三大激活途径均汇集于 C3, 然后产生相应的效应。C3 也与旁路途径的激活起始有关, 旁路途径属于自发性激活, 一种称为 C3 的“慢速运转” (tickover) 机制^[37]。每小时大约有占总体 1% 的 C3 自发地发生“tickover”, 产生结构变更的 C3, 称 C3(H₂O), 而 C3(H₂O) 能与因子 B 结合, 因子 B 自身发生构象变化而能被保持激活的血清蛋白酶因子 D 所裂解, 之后引起一连串的效应导致的 C3 的裂解激活。C3 的存在通常可作为补体系统中旁路激活途径存在的一个依据。C3 是个包含硫酯的蛋白, 相对于补体系统中的其他组成部分而言, C3 没有非常清晰的结构区域, 但它的系统发生可以追溯到原口动物——刺胞动物、节肢动物和两侧对称动物^[5, 31, 38], 可以认为 C3 是补体系统进化过程中最早出现的分子。在哺乳动物中, C3 与 C4、C5 同源, 这三个分子与血清蛋白酶抑制因子 α 2M(α -2-macroglobulin) 以及血细胞的 GPI 锚定膜蛋白 CD109^[39] 同属于一个家族——硫酯包含蛋白家族^[40]。目前, 已经在低等的后口动物乃至原口动物中克隆获得 C3 的 cDNA 序列, 部分有了功能上的研究结果^[3, 41-42]。在按蚊和果蝇中均发现硫酯包含蛋白 TEP, 据报道这些分子拥有类似于脊椎动物 C3 的调理作用, 它们作为调理素参与病原菌的清除^[43-45]。研究认为果蝇和按蚊中存在以 TEP 为中心的类补体途径。然而, 从序列进化分析来看, 昆虫 TEP 分子亲缘关系更接近于 CD109 或 α 2M, 而不是 C3/C4/C5 (构建系统进化树显示硫酯包含蛋白家族聚成 CD109/ α 2M 和 C3/C4/C5 两簇)^[46], 那么后口动物 C3/C4/C5 与昆虫 TEP 的免疫功能的分享可能是功能的汇聚而不是共同的祖先。当然, 还有一种可能就是硫酯包含蛋白的原始功能特征之一是免疫功能, 只是 α 2M 这簇一些成员后来丢失了这些功能。对原始类群中硫酯包含蛋白的更深入分析研究有助于揭示该蛋白家族的早期发生。研究者在这方面作了很多探索, 如在文昌鱼中发现一个

$\alpha 2M$ 成员 $Bj\alpha 2M$ 可能参与急性期免疫应答^[47]; 中华绒螯蟹的血细胞中克隆到 $\alpha 2M$, 该分子在机体感染嗜水气单胞菌后表达量显著上升^[48]; 而罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的 $\alpha 2M$ 的表达量变化与蜕皮期和细菌感染密切相关^[49]。最近, 在海葵中也发现四个 TEP 分子, 据构建进化树分析, 其中两个命名为 HaliA2M 和 HaliCD109, 另两个命名为 HaliC3-1 和 HaliC3-2, 每个分子均保留基本的结构域和重要的功能位点, mRNA 的表达分布却有各自的特点, 表明 CD109、C3 和 $\alpha 2M$ 的基因复制与功能分化可追溯到刺胞动物和两侧对称动物分化之前^[5]。这一系列研究报道表明, 补体中心分子 C3 的出现可能要追溯到更早的腔肠动物时期。

4 膜攻击复合体

补体系统的激活引起的最终效应是清除外来物, 以保护机体免受伤害。在哺乳动物中, 补体系统的终末成分 C6/C7/C8/C9 等分子可共同组装成膜攻击复合体 (membrane attack complex, MAC) 而裂解目的细胞, 或 C3 标记外来物后被调理吞噬。补体系统中参与 MAC 形成的组分有一个重要的共同特征就是包含一个 MACPF (MAC/perforin) 的特征结构域, 这个结构域也在参与介导细胞毒性的穿孔素 (perforin) 中发现^[50]。穿孔素储存在细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T cells) 和自然杀伤细胞 (natural killer cells) 的溶解颗粒中, 一旦这些细胞被激活, 穿孔素就会被释放并在目标细胞的膜上聚合产生跨膜孔。因此, 所有参与免疫细胞毒性的中枢分子可能共同起源于包含 MACPF 结构域的祖先分子。迄今为止, 这些分子只在哺乳动物中发现并得到功能上的确定, 在硬骨鱼中只克隆到 C8 和 C9 的 cDNA 序列并发现 MAC 的存在, 对该类分子的免疫毒性起源进化知之甚少。通过对人类全基因组序列搜索发现仅存在 6 个具有 MACPF 结构域基因, 包括穿孔素、C6、C7、C8 α 、C8 β 和 C9, 而在原口动物果蝇基因组中并没有发现任何分子具有 MACPF 结构域。该结构域可能只存在于后口动物中, 如在头索动物 (cephalochordate) 文昌鱼中有 C6-like 分子 cDNA 的报道, 序列分析发现该分子与人的 C6 亲缘关系较近^[41]。令人惊讶的是, 后续的报道中, 在海鞘的基因组序列中竟然发现 10 多个包含 MACPF 结构域基因^[32], 而在文昌鱼的基因组序列中也发现多达 29 个^[18], 这些基因大多数具有与人 C6 类似的结构, 也存在一些物种所特有的不明功能的结

构域。从功能上看, 免疫细胞毒性作用仅追溯到鲨鱼, 七鳃鳗的补体系统目前发现只有调理作用, 而未见到细胞裂解方面功能的报道, 而文昌鱼的 C6-like 分子的功能是否作为细胞裂解因子还不清楚, 有待进一步的功能研究。

5 结语

如前所述, 通过基因组数据分析发现硫酯包含蛋白、丝氨酸蛋白酶和 MACPF 基序分子等也存在于后口无脊椎动物中, 那么这些动物可能具有与高等脊椎动物类似的功能完备的补体系统。然而, 现在的研究数据缺乏大部分功能上的直接证据, 只有少许的功能报道, 如在海胆和海鞘补体系统中发现的调理作用^[42,51], 七鳃鳗 LC1q 和 MBL、文昌鱼 BjFCN1 均可分别与各自 MASP 结合导致 C3 的裂解^[9,15,25]。因此, 补体组分之间的可能功能链还需要更为深入的实验研究。图 1 展示出了迄今为止从低等到高等动物补体系统中的研究概况。从整个补体系统的进化来看, 我们可以认为旁途径是最先出现的激活途径, 而后才出现凝集素途径, 而经典的激活途径是到了有颌脊椎动物才具备的。随着对低等动物补体系统的研究更加深入, 相信对补体系统的起源与进化会有更深的了解, 也对高等脊椎动物的研究有很好的促进作用。

[参 考 文 献]

- [1] Kasahara M, Nakaya J, Satta Y, et al. Chromosomal duplication and the emergence of the adaptive immune system. *Trends Genet*, 1997, 13(3): 90-2
- [2] Nonaka M. Evolution of the complement system. *Curr Opin Immunol*, 2001, 13(1): 69-73
- [3] Zhu Y, Thangamani S, Ho B, et al. The ancient origin of the complement system. *EMBO J*, 2005, 24(2): 382-94
- [4] Prado-Alvarez M, Rotllant J, Gestal C, et al. Characterization of a C3 and a factor B-like in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(2): 305-15
- [5] Fujito NT, Sugimoto S, Nonaka M. Evolution of thioester-containing proteins revealed by cloning and characterization of their genes from a cnidarian sea anemone, *Haliphanella lineate*. *Dev Comp Immunol*, 2010, 34(7): 775-84
- [6] Blandin S, Shiao SH, Moita LF, et al. Complement-like protein TEPI is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell*, 2004, 116(5): 661-70
- [7] Blandin S, Levashina EA. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Mol Immunol*, 2004, 40(12): 903-8
- [8] Carland TM, Gerwick L. The C1q domain containing proteins: Where do they come from and what do they do?

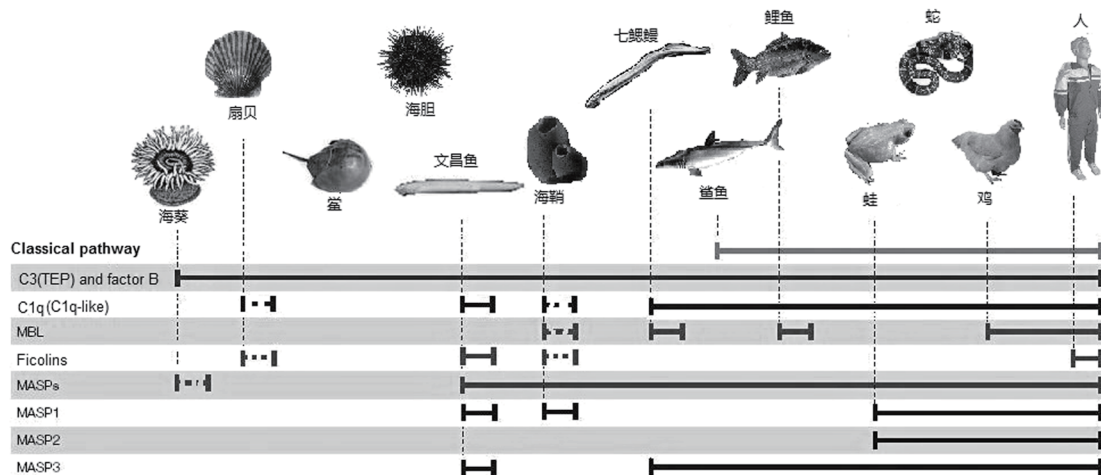


图1 补体系统的进化(参考Fujita 2002)

- Dev Comp Immunol, 2010, 34(8): 785-90
- [9] Matsushita M, Matsushita A, Endo Y, et al. Origin of the classical complement pathway: Lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(27): 10127-31
- [10] Yu Y, Huang H, Wang Y, et al. A novel C1q family member of amphioxus was revealed to have a partial function of vertebrate C1q molecule. J Immunol, 2008, 181(10): 7024-32
- [11] Kong P, Zhang H, Wang L, et al. AiC1qDC-1, a novel gC1q-domain-containing protein from bay scallop *Argopecten irradians* with fungi agglutinating activity. Dev Comp Immunol, 2010, 34(8): 837-46
- [12] Gestal C, Pallavicini A, Venier P, et al. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*. Dev Comp Immunol, 2010, 34(9): 926-34
- [13] Gerdol M, Manfrin C, De Moro G, et al. The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: a widespread and diverse family of immune-related molecules. Dev Comp Immunol, 2011, 35(6): 635-43
- [14] Kania PW, Sorensen RR, Koch C, et al. Evolutionary conservation of mannan-binding lectin (MBL) in bony fish: identification, characterization and expression analysis of three bona fide collectin homologues of MBL in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(6): 910-20
- [15] Takahashi M, Iwaki D, Matsushita A, et al. Cloning and characterization of mannose-binding lectin from lamprey (Agnathans). J Immunol, 2006, 176(8): 4861-8
- [16] Sekine H, Kenjo A, Azumi K, et al. An ancient lectin-dependent complement system in an ascidian: novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. J Immunol, 2001, 167(8): 4504-10
- [17] Skjoedt MO, Palarasah Y, Rasmussen K, et al. Two mannose-binding lectin homologues and an MBL-associated serine protease are expressed in the gut epithelia of the urochordate species *Ciona intestinalis*. Dev Comp Immunol, 2010, 34(1): 59-68
- [18] Huang S, Yuan S, Guo L, et al. Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity. Genome Res, 2008, 18(7): 1112-26
- [19] Kong P, Wang L, Zhang H, et al. A novel C-type lectin from bay scallop *Argopecten irradians* (AiCTL-7) agglutinating fungi with mannose specificity. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(3): 836-44
- [20] Yang J, Wang L, Zhang H, et al. C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and opsonization. PLoS One, 2011, 6(2): e17089
- [21] Zhang H, Chen L, Qin J, et al. Molecular cloning, characterization and expression of a C-type lectin cDNA in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Fish Shellfish Immunol, 2011, 31(2): 358-63
- [22] Zhang XW, Wang XW, Sun C, et al. C-type lectin from red swamp crayfish *Procambarus clarkii* participates in cellular immune response. Arch Insect Biochem Physiol, 2011, 76(3): 168-84
- [23] Kenjo A, Takahashi M, Matsushita M, et al. Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. J Biol Chem, 2001, 276(23): 19959-65
- [24] Cha IS, Castillo CS, Nho SW, et al. Innate immune response in the hemolymph of an ascidian, *Halocynthia roretzi*, showing soft tunic syndrome, using label-free quantitative proteomics. Dev Comp Immunol, 2011, 35(8): 809-16
- [25] Huang H, Huang S, Yu Y, et al. Functional characterization of a ficolin-mediated complement pathway in amphioxus. J Biol Chem, 2011, 286(42): 36739-48
- [26] Fan C, Zhang S, Li L, et al. Fibrinogen-related protein from amphioxus *Branchiostoma belcheri* is a multivalent pattern recognition receptor with a bacteriolytic activity. Mol Immunol, 2008, 45(12): 3338-46
- [27] Romero A, Dios S, Poisa-Beiro L, et al. Individual

- sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates. *Dev Comp Immunol*, 2011, 35(3): 334-44
- [28] Middha S, Wang X. Evolution and potential function of fibrinogen-like domains across twelve *Drosophila* species. *BMC Genomics*, 2008, 9: 260
- [29] Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, et al. Control of the complement system. *Adv Immunol*, 1996, 61: 201-83
- [30] Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science*, 2001, 291(5507): 1304-51
- [31] Buresova V, Hajdusek O, Franta Z, et al. Functional genomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system. *J Innate Immun*, 2011, 3(6): 623-30
- [32] Azumi K, De Santis R, De Tomaso A, et al. Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". *Immunogenetics*, 2003, 55(8): 570-81
- [33] He Y, Tang B, Zhang S, et al. Molecular and immunochemical demonstration of a novel member of Bf/C2 homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri*: implications for involvement of hepatic cecum in acute phase response. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24(6): 768-78
- [34] Smith LC, Shih CS, Dachenhausen SG. Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system. *J Immunol*, 1998, 161(12): 6784-93
- [35] Kimura A, Ikeo K, Nonaka M. Evolutionary origin of the vertebrate blood complement and coagulation systems inferred from liver EST analysis of lamprey. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33(1): 77-87
- [36] Kimura A, Sakaguchi E, Nonaka M. Multi-component complement system of Cnidaria: C3, Bf, and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Immunobiology*, 2009, 214(3): 165-78
- [37] Muller-Eberhard HJ. Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem*, 1988, 57: 321-47
- [38] Miller DJ, Hemmrich G, Ball EE, et al. The innate immune repertoire in cnidaria--ancestral complexity and stochastic gene loss. *Genome Biol*, 2007, 8(4): R59
- [39] Lin M, Sutherland DR, Horsfall W, et al. Cell surface antigen CD109 is a novel member of the $\alpha 2$ macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing proteins. *Blood*, 2002, 99(5): 1683-91
- [40] Sottrup-Jensen L, Stepanik TM, Kristensen T, et al. Common evolutionary origin of $\alpha 2$ -macroglobulin and complement components C3 and C4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(1): 9-13
- [41] Suzuki MM, Satoh N, Nonaka M. C6-like and C3-like molecules from the cephalochordate, amphioxus, suggest a cytolytic complement system in invertebrates. *J Mol Evol*, 2002, 54(5): 671-9
- [42] Clow LA, Raftos DA, Gross PS, et al. The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as an opsonin. *J Exp Biol*, 2004, 207(Pt 12): 2147-55
- [43] Levashina EA, Moita LF, Blandin S, et al. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*, 2001, 104(5): 709-18
- [44] Bou Aoun R, Hetru C, Troxler L, et al. Analysis of thioester-containing proteins during the innate immune response of *Drosophila melanogaster*. *J Innate Immun*, 2011, 3(1): 52-64
- [45] Povelones M, Upton LM, Sala KA, et al. Structure-function analysis of the *Anopheles gambiae* LRIM1/APL1C complex and its interaction with complement C3-like protein TEP1. *PLoS Pathog*, 2011, 7(4): e1002023
- [46] Nonaka M, Yoshizaki F. Evolution of the complement system. *Mol Immunol*, 2004, 40(12): 897-902
- [47] Liang Y, Pan A, Zhang S, et al. Cloning, distribution and primary immune characteristics of amphioxus α -2 macroglobulin. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31(6): 963-9
- [48] Qin C, Chen L, Qin JG, et al. Molecular cloning and characterization of $\alpha 2$ -macroglobulin ($\alpha 2$ -M) from the haemocytes of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29(2): 195-203
- [49] Ho PY, Cheng CH, Cheng W. Identification and cloning of the $\alpha 2$ -macroglobulin of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its expression in relation with the molt stage and bacteria injection. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(3): 459-66
- [50] Shinkai Y, Takio K, Okumura K. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature*, 1988, 334(6182): 525-7
- [51] Miyazawa S, Azumi K, Nonaka M. Cloning and characterization of integrin α subunits from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J Immunol*, 2001, 166(3): 1710-5