DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.20098

鲤 IL-17N 的基因克隆、表达及促炎作用

张磊1, 沈泽恩1, 李红霞1,2, 徐逾鑫1, 李迎宾1, 俞菊华1,2

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214128;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081

摘要: 白细胞介素 17 (Interleukin-17, IL-17)在炎症和宿主防御中起重要作用。为了解鲤(Cyprinus carpio) IL-17N基 因的功能,本研究使用同源搜索和基因克隆的方法在鲤基因组挖掘鉴定到两个 IL-17N 基因(CclL-17Na 和 CcIL-17Nb),均由 TOP3B 基因内含子 2 的互补序列编码。共线性比较显示,除了东方红鳍鲀(Takifugu rubripes)外, 在其他已研究的鱼类中,与该基因相邻的均为 SDF2L 和 PPM1F 基因。两个 CcIL-17Ns 都有 3 个外显子,编码 136 个氨基酸, 两者相似性高达为 97.1%, CcIL-17Na、CcIL-17Nb 和其他硬骨鱼类的 IL-17N 相似性分别为 65.3%~ 97.1%、64.7%~96.3%,和鲤 IL-17 家族其他成员的相似性分别为 32.9%~51.4%、31.4%~50.7%。鱼类 IL-17 家族系 统树显示 7 个成员形成 6 支, 其中 IL-17A/F1 和 IL-17A/F3 组成一支, 其余 6 个成员单独成支, 鲤 IL-17N 先与鲤科 鱼类以 94% 置信值聚在一起, 然后与虹鳟(Oncorhynchus mykiss)、大西洋鲑(Salmo salar)、青鳉(Oryzias latipes)、 东方红鳍鲀(Takifugu rubripes)和尼罗罗非鱼(Oreochromis niloticus)等以 85%的置信值聚在一起,再与雀鳝 (Lepisosteus oculatus)和腔棘鱼(Coelacanth)的 IL-17N 以 95% 置信值聚为一支。实时定量 PCR 结果显示 CcIL-17Ns 在受精后 0.5 h 和 12 h 的表达量极显著高于受精后 25 h、35 h、60 h、120 h 及仔鱼阶段的表达量(P<0.01); CcIL-17Ns 在鲤夏花和成鱼脑中的表达量均最高,显著(P<0.05)或极显著(P<0.01)高于其他组织。嗜水气单胞菌(Aeromonas hydrophila) 感染导致 CcIL-17Ns 在各组织的表达均上调, 感染 6 h, 脑中的表达量显著增加(P<0.05), 1 d, CcIL-17Ns 在其他组织中均显著增加(P<0.05),感染3d和7d,表达量均下降至与对照组无显著差异(P>0.05)。构建原核重组 表达载体 pMAL-c2X-17N, 在大肠杆菌(Escherichia coli) Transetta (DE3)中进行原核表达, 使用镍柱纯化获得可溶 的 IL-17N 重组蛋白(MBP-17N)。使用 0.1 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 的 MBP-17N 孵育鲤肾组织 8 h, 结果显示,不同浓度的 MBP-17N 均使 IL-1β 和 NF-κB 显著上调(P<0.05); 1 ng/mL 和 10 ng/mL 的 MBP-17N 极显著 上调 IFN-y (P<0.01); 0.1 ng/mL、1 ng/mL的 MBP-17N 显著上调 IL-6, 1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL的 MBP-17N 显著上调 CCL20 (P<0.05); 1 ng/mL 的 MBP-17N 使 TRAF6 的表达显著高于对照组(P<0.05)。本研究通过分析鲤 IL-17Ns的系统发育、测定该基因的时空表达特征、发现嗜水气单胞菌感染后各组织 CclL-17Ns 表达上调、原核表 达蛋白能引起炎症因子的表达,从而证实了鲤 IL-17N 参与炎症反应。

白细胞介素 17 (Interleukin-17, IL-17)是一种 T 细胞来源细胞因子,最初被定义为细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 8 (cytotoxic T lymphocytes antigen 8, CTLA-8),主要由单核细胞、CD+记忆 T 淋巴细 胞分泌,可通过激活中性粒细胞吸引趋化因子(如 IL-8),诱导相关促炎细胞因子和抗菌肽(AMPs)等 而产生强烈的炎症反应^[1-3]。哺乳动物 IL-17 家族 有 IL-17A~IL-17F 共 6 个成员^[4],其中, IL-17A 与

收稿日期: 2020-04-06; 修订日期: 2020-05-11.

基金项目:中央级基本科研业务费项目(2018HY-ZD02, 2016HY-JC03, 2020JBFJ02).

作者简介: 张磊(1994-), 女,硕士研究生,研究方向为动物遗传育种与分子生物学. E-mail: zhanglei752499643@163.com 通信作者: 俞菊华,研究员,研究方向为动物遗传育种与分子生物学. E-mail: yujh@ffrc.cn

IL-17F 不仅介导 IL-6、IL-8、粒细胞集落刺激因 子等炎性因子,还可以与 TNF-α、IL-1 等细胞因子 协同作用,增强炎症反应^[5-6],并与宿主防御^[7-8]、 自身免疫性疾病^[9-10]和癌症^[11]等相关。

Gunimaladevi 等^[12]于 2006 年首先在斑马鱼 (Danio rerio)中鉴定克隆了 IL-17 家族成员基因 IL-17A/F1、IL-17A/F2、IL-17A/F3、IL-17C 和 IL-17D, 分析了其结构, 其中因为鱼类 IL-17A/F 与哺乳动物 IL-17A 和 IL-17F 有着相近的相似性 而命名为 A/F, 测定了正常组织和刺激组织中各 成员的表达水平。随后,在东方红鳍鲀(Takifugu rubripes)^[13]、虹鳟(Oncorhynchus mykiss)^[14-15]、鮸 (miiuy croaker)^[16]、青鳉(Oryzias latipes)^[17]、欧洲 鲈(Dicentrarchus labrax)^[18]中也鉴定到了 IL-17 家 族成员。至今除了哺乳动物中 IL-17E 的同源基因 在硬骨鱼类中没被发现外,其余的均被找到,且 在硬骨鱼类发现了一个 IL-17 家族新成员 IL-17N^[18-20]。Wang 等^[20]对 IL-17N 的来源进行了 分析, 认为 IL-17N 属于 IL-17A/F 亚家族。硬骨鱼 类 IL-17N 的相关研究主要集中在基因克隆和组 织表达方面,对于其功能研究相对较少。

本研究使用同源搜索和基因克隆的方法鉴定 了鲤(*Cyprinus carpio*)的两个 *IL-17N* 基因,通过 鱼类 *IL-17N* 基因的线性分析、鱼类 *IL-17N* 同源 性分析和系统树构建,揭示了 *IL-17N* 的进化地位; 使用实时定量 PCR 测定 *CcIL-17Ns* (*Cyprinus carpio IL-17Ns*)在鲤的胚胎发育阶段、早期发育阶 段、夏花和成鱼不同组织中的表达模式以及感染 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)对 *CcIL-17Ns* 的表达影响;利用原核表达的方法获得可溶的鲤 IL-17N 重组蛋白,通过测定鲤 IL-17N 重组蛋白 孵育后鲤肾组织中促炎细胞因子(*IL-1β、IFN-y* 和 *IL-6*)、趋化因子 *CCL20* 及 *NF-кB、TRAF6* (TNF receptor associated factor 6)基因的表达量的变化, 进一步验证鲤 IL-17N 的促炎功能。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

鲤早期胚胎样品:水温 22 ℃下,授精后 0.5 h (胚盘出现)、12 h (原肠中期)、25 h (肌节出)

现)、35h(脑泡出现)、60h(心、眼点出现)、120h (即将破膜)的受精卵、每次取样 20~30 枚受精卵 并保存于 RNA sample protector 中。鲤仔鱼样品: 水温 22 ℃, 受精卵出膜后 1 d、4 d、7 d、14 d、 26 d 的仔鱼, 每次取样 20~30 尾仔鱼并保存于 RNA sample protector 中。鲤夏花样品:采集出膜 后培育 35 d、体长约 3 cm 的鲤夏花心、肝、脾、 肾、鳃、皮肤、脑、肠和肌肉等9个组织,取20 尾鱼, 每种组织做 5 份混合样并保存于 RNA sample protector 中。取鲤成鱼(4 尾, 平均体重 500 g)心、肝、脾、体肾、头肾、肠、脑、鳃、皮 肤和肌肉 10 个组织, 于-80 ℃保存。感染嗜水气 单胞菌[1.4×10⁸ colony-forming units (CFU)/mL]前 两周,将平均体重 500 g 的鲤暂养于两个装有 1000 L 水的鱼缸中(每个鱼缸 15 尾), 1 周适应后, 实验组每尾鱼腹腔注射 0.1 mL 嗜水气单胞菌, 而 对照组的鱼注射等量的生理盐水溶液。感染组和 对照组分别于感染后第1、3、7天采集鲤的脑、 肝、心、体肾、肌肉、肠、皮肤、脾、鳃和头肾 等组织,-80 ℃保存。所有鱼均采自中国水产科学 研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地。

1.2 实验引物

根据 Blast 和线性分析在鲤基因组中挖掘到 的 2 个 CcIL-17N 基因序列,设计引物, P1-P2、 P1-P3 分别用于克隆验证 CcIL-17Na 和 CcIL-17Nb 全长 cDNA。由于 CcIL-17Na 和 CcIL-17Nb cDNA 序列一致性较高,设计一对共用引物 P4-P5 测定 CcIL-17Ns 的表达水平。在 NCBI 数据库(https:// www.ncbi.nlm.nih.gov)搜索鲤NF-кB(登录号:a为 GU064560.2, b 为 HM535646.1)、TRAF6(登录号: LHQP01010838.1)、CCL20(登录号: AJ245635)、 *IL-1β*(登录号: a: KC858890.1、b: KC858889.1)、 IFN-y (登录号: NW 017537846.1)、IL-6 (登录号: XM 026248516.1、LHQP01001186.1),由于鲤为 四倍体,为保证设计引物能测定所有旁基因的表 达,把鲤已有基因与斑马鱼等鱼的同源基因进行 比对,寻找基因的保守部位,设计定量引物对, P6-P7、P8-P9、P10-P11、P12-P13、P14-P15、 P16-P17 分别用于 TRAF6、NF-κB、IL-1β、IL-6、 *IFN-y*、*CCL20* 基因的定量表达测定。P18-P19 是 根据鲤 β-actin 基因(登录号: M24113)设计的定量 引物, 作为内参基因。P20-P21 为原核表达扩增 CcIL-17N 片段引物。引物均由苏州金唯智生物科 技有限公司合成,详细内容见表 1。

引物 primer	核苷酸序列(5'-3') nucleotide sequence	扩增序列长度/bp amplification sequence length	引物用途 primer application
IL-17N-F(P1)	CACCTCCGTTTCTCCAGCATG		
IL-17Na-R(P2)	GTGCATGAATTGTTAGACCCAGC	351	IL-17Na
IL-17Nb-R(P3)	TGCATGAACTGTCAGACCCAGTG	411	IL-17Nb
CcIL-17N-DF(P4)	CACAGCTCATCAACCTGCCCAG	174	qPCR
CcIL-17N-DR(P5)	CAATGGGGATGCTCTCCAGACTG		
TRAF6-DF(P6)	CTGTGCAGGGAGCTTTGTGTATGC	231	qPCR
TRAF6-DR(P7)	CATCTGTGTAAATTCCTGCATGTGCTG		
NF-κB-DF(P8)	GTCCGGAGGAACAGTGCGTGAG	203	qPCR
NF-ĸB-DR(P9)	CTCCGCTGTCGCATATCCCAC		
IL-1β-DF(P10)	CATCTTGGAGAATGTGATCGAAGAGC	350	qPCR
IL-1β-DR(P11)	CACAGAGCCACTGGCCTCCTTC		
IL-6-DF(P12)	GGTGAACATGACGGCGTATGAAG	331	qPCR
IL-6-DR(P13)	GAACAGGATCGAATGCGTCGTG		
IFN-y-DF(P14)	CAAGAGCATTGATGAGCTTAAAGCATAC	212	qPCR
IFN-y-DR(P15)	GAACATGTGCAAGTCTTTCCTTTGTAGC		
CCL20-DF(P16)	CAGCATGTTGYAGGAAGTATACCAAAG	158	qPCR
CCL20-DR(P17)	CACCCAGGSTTTGGAGGGGTC		
β -actin-DF(P18)	CGCCCCAGACATCAGGGTG	278	qPCR
β-actin-DR(P19)	GTGTTGAAGGTCTCAAACATGATCTGTG		
IL-17N-F(P20)	CG <u>GGATCC</u> AGTCCGATCATGGCCCAGTG	342	重组表达质粒构 建(rccIL-17N)
IL-17N-R(P21)	ACGC GTCGAC CTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGATTCTGTCTGGATGTGG		

表 1 序列验证和 qPCR 所用引物 Tab. 1 Primers used for sequences validation and qPCR

1.3 生物信息学分析

鲤 IL-17N 基因所在连锁群信息来自 NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), 雀鳝(Lepisosteus oculatus)、斑马鱼、三刺鱼(Gasterosteus aculeatus)等 鱼类的 IL-17N 线性分析使用 Genomicus (v87.01)^[21]。 使用 MatGAT 软件分析鲤及其他鱼类 IL-17 家族 氨基酸序列的一致性和相似性。在 MEGA 7.0 软 件^[22]中进行鲤及其他鱼类 IL-17 家族多序列比对, 比对结果用邻接法,以 1000 次自检率构建 N-J 系 统进化树。使用 protparam 在线工具对鲤 IL-17N 基 因 的 相 关 理 化 性 质 进 行 预 测 分 析 (http:// web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam), SignalP 4.1 在线工具^[23] (http://www.cbs.dtu.dk/services/ SignalP/)预测信号肽。

1.4 提取总 RNA 和实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析

使用总 RNA 提取试剂盒(Omega Bio-Tek, 上 海)提取各组织总 RNA 并测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ (1.8~ 2.0), 并于 1%琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 完整 性。采用 Prime ScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time)(TaKaRa, 大连)试剂盒进行反转录, 按 照 SYBR[®] Premix Ex Taq IITM (TaKaRa, 大连)说 明书进行实时定量 PCR, 测定 *CCIL-17Ns* 的表达 水平, 使用 β-actin 作为内参。

实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[24]进行计算, 随后使 用 SPSS 20.0 软件中的 Turkey 多重比较法和 t 检 验进行差异显著性分析, P < 0.05 为差异显著, P < 0.01 为差异极显著。

1.5 原核重组表达质粒的构建及表达纯化

根据鲤 *IL-17N* 基因序列,设计扩增成熟蛋白 引物。在正、反向引物的 5′端分别添加 BamH I 和 Sal I的酶切位点及保护碱基(表 1),以 CcIL-17N 基因的 T-克隆质粒为模板,PCR 扩增目的序列。 使用胶回收试剂盒(上海博彩生物技术公司)回收 PCR 产物,经 BamH I 和 Sal I 限制性内切酶 (TaKaRa,大连)酶切后,与被同样酶切过的 pMAL-c2X (杭州研真科技有限公司)连接,构建 CcIL-17N 表达载体 pMAL-c2X-17N。将连接产物 转化至大肠杆菌 DH5α敏感态细胞(北京全式金生 物有限公司),使用菌液 PCR 和双酶切鉴定筛选 阳性单克隆,并送至苏州金唯智生物科技有限公 司测序。

将测序准确的重组质粒 pMAL-c2X-17N 和 pMAL-c2X 空载分别转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) Transetta (DE3)感受态细胞(北京全式金生物 有限公司),挑取单克隆于 10 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 ℃, 200 r/min 培养过夜。次 日,以1:100 在含氨苄青霉素的 LB 液体培养基 中扩大培养, 37 ℃, 200 r/min 培养, OD₆₀₀ 值 0.5~0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 于 25 ℃,诱导 8~12 h。离心收集细菌,超声后取总 菌和上清蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。

上清裂解液用 Ni-NTA (无锡天演生物技术科 技有限公司)亲和层析,使用 SCGTMUV-VIS Detector (苏州赛普仪器有限公司)分离纯化。

1.6 鲤 IL-17N 重组蛋白(MBP-17N)对鲤炎症因 子、趋化因子以及 *NF-κB、TRAF6* 的表达影响

纯化后的重组蛋白 MBP-17N 和 MBP 用多粘 菌素 B 树脂(G-Biosciences,美国)去除内毒素,并 用鲎试剂(厦门鲎试剂生物科技股份有限公司)检 测内毒素残留,将去除内毒素的蛋白超滤浓缩 (10 kD)(Millipore,美国)于无内毒素的 PBS 中,考 虑到镍柱纯化蛋白总存在杂蛋白,参照王钦等^[25] 使用与已知浓度的 BSA 蛋白标准品(Sigma,美国) 进行 SDS-PAGE 电泳,根据目的带与牛血清白蛋 白(BSA)条带灰度(Tanon GIS imagine),计算纯化 后 MBP-17N 和 MBP 蛋白的浓度。

取新鲜的鲤体肾, 放入一个含有 RPMI-1640

(Thermo Scientific, 美国)的培养皿中, 切成 1~ 3 mm 的小块。将组织块分装到含 400 μL RPMI-1640 (含 10%链青霉素)的六孔板中, 每孔 5~6 块, 约 2 h 后, 待组织块贴于六孔板壁上, 将培养液换 成 400 μL 含 10% 胎牛血清和 10% 链青霉素的 RPMI-1640, 28 ℃, 5% CO₂孵育过夜后, 用不同 浓度的 MBP-17N (0.1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL)、MBP 蛋白对照组(100 ng/mL 的 MBP 蛋白)和 N83 对照组(83 ℃失活的 MBP-17N 蛋白) 分别培养孵育鲤体肾, 8 h 后从组织中提取总 RNA。使用实时荧光定量 PCR 法测定样品中 *NF-κB、TRAF6、CCL20、IL-1β、IFN-γ、IL-6* 的 表达。

2 结果与分析

2.1 鲤 IL-17N 基因序列

使用基因同线性分析和氨基酸序列同源搜索, 在 NCBI 中鉴定到 2 个鲤 IL-17N 基因, 分别位于 LHQP01016936, LHQP01050094 连锁群上, 由连 锁群上 TOP3B 基因内含子 2 的互补序列编码, 命 名为 CcIL17Na 和 CcIL17Nb。使用 RT-PCR 和 PCR 验证, 测序表明只存在个别碱基差异, 可能是 SNP 位点。CcIL17Na 和 CcIL17Nb 结构一致,均 由 3 个外显子和两个内含子组成, 外显子长度相 同,均为15 bp、176 bp、220 bp,编码136 个氨基 酸; 但内含子存在差异, 分别为 1439 bp、257 bp 和 1044 bp、284 bp。使用 SignalP 4.1 分析, N 端 起始的 22 个氨基酸为信号肽, 成熟蛋白均含有 IL-17家族保守的4个半胱氨酸,构成2个二硫键, 分子量分别为 15.41 kD 和 15.33 kD, 等电点分别 为 5.74 和 5.47。CcIL-17Ns 与其他硬骨鱼类 IL-17N 以及鲤 IL-17 家族其他成员间同源性比较, 结果, CcIL-17Na、CcIL-17Nb 与草鱼(Ctenopharyngodon idellus)、斑马鱼、尼罗罗非鱼(Oreochromis niloticus)、红鳍东方鲀和青鳉、虹鳟等鱼 IL-17N 的相似性分别为 65.3%~97.1%、64.7%~ 96.3%, 与鲤 IL-17 家族其他成员的相似性分别为 32.9%~51.4%、31.4%~50.7%(表 2)。

比较鱼类 IL-17N 附近基因,发现除了东方红 鳍鲀的相邻基因是 AEBP1 和 NR5A1 外,在雀鳝、

Tab. 2 Percentage of amino acid similarity and identity of CcIL-17N with other known IL-17N and CcIL-17 members													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. CcIL17Na		91.2	90.4	83.1	51.1	48.2	46.8	49.1	22.2	25.3	28.7	21.4	23.5
2. CcIL17Nb	97.1		88.2	80.9	52.5	48.9	48.2	48	23.5	24	30.2	22.3	22.9
3. CiIL17N	97.8	96.3		83.1	51.8	48.2	47.5	48.6	21	24.8	28.7	20.9	25.7
4. DrIL17N	91.9	89.7	91.2		51.8	47.5	50.4	43.9	23.6	25.3	30.7	21.4	24.6
5. OnIL17N	80.6	79.9	80.6	75.5		79.1	71.2	52	25.3	26.1	25.2	23.1	26.1
6. TrIL17N	76.3	74.8	76.3	70.5	91.4		66.2	49.1	22.7	28	26.5	20.9	23.1
7. OIIN17N	75.5	74.1	75.5	72.7	87.1	85.6		45.7	23.5	27.6	27.8	20.5	23.2
8. OmIL-17N	65.3	64.7	66.5	61.3	65.9	64.2	61.8		20.2	23.1	23.2	19	20.5
9. CcAF1	37.7	38.4	39	38.4	43.4	40.9	40.3	37.6		26.1	36.4	26.1	29
10. CCAF2a	51.4	50.7	50.7	48.6	48.6	51.4	52.1	41.6	42.8		31.4	24.8	22.7
11. CcAF3	45.5	47.6	46.2	46.2	48.3	46.2	49.7	39.3	55.3	49.7		24.5	23.4
12. CcIL17B1	35.9	36.9	35.9	36.4	36.4	35.9	35.9	36.4	39.9	39.4	42.9		23
13. CcIL17C-38	40.1	41.4	41.4	42.6	41.4	38.9	38.3	41	46.9	35.8	43.8	37.4	
14. CcIL17D1	32.9	31.4	33.3	31.9	31.9	32.9	30.9	39.1	40.1	33.8	40.6	39.1	37.7

表 2 鲤与其他鱼类 IL-17N 以及鲤 IL-17 家族成员氨基酸的一致性和相似性百分比 2 Percentage of amino acid similarity and identity of CcIL-17N with other known IL-17N and CcIL-17 m

注: 1. 鲤 IL-17Na, 2. 鲤 IL-17Nb, 3. 草鱼 IL-17N, 4. 斑马鱼 IL-17N, 5. 尼罗罗非鱼 IL-17N, 6. 东方红鳍鲀 IL-17N, 7. 青鳉 IL-17N, 8. 虹鳟 IL-17N, 9. 鲤 IL-17AF1, 10. 鲤 IL-17AF2a, 11. 鲤 IL-17AF3, 12. 鲤 IL-17B1, 13. 鲤 IL-17C-38, 14. 鲤 IL-17D1. 右上角, 一致性; 左下角, 相似性.

Note: 1. CcIL-17Na, 2. CcIL-17Nb, 3. *C. idellus* (Ci) IL-17N, 4. *D. rerio* (Dr) IL-17N, 5. *O. niloticus* (On) IL-17N, 6. *T. rubripes* (Tr)IL-17N, 7. *O. latipes* (Ol) IL-17N, 8. *O. mykiss* (Om) IL-17N, 9. CcIL-17AF1, 10. CcIL-17AF2a, 11. CcIL-17AF3, 12. CcIL- 17B1, 13. CcIL-17C-38, 14. CcIL-17D1. Upper triangle, identity; lower triangle, similarity.

腔棘鱼(Coelacanth)、斑马鱼、棘鱼(bristling)、尼 罗罗非鱼、青鳉、鲤、金线鲃(Sinocyclocheilus grahami)中, IL-17N相邻基因均为 SDF2L1 (stromal cell derived factor 2 like 1)和 PPM1F (Protein phosphatase 1F) (图 1)。

鱼类 IL-17 家族成员 N-J 系统进化树显示鱼 类 IL-17 家族 7 个成员形成 6 支,除了 IL-17C 一 支置信值为 63%外,其余均大于 70%。其中, IL-17A/F1、IL-17A/F3 先各自聚在一起,然后再 以 76%置信度聚为一支。鲤 IL-17N 与同属鲤科鱼 类的斑马鱼、草鱼先以 94%置信值聚在一起,然 后与鲑鳟鱼类的虹鳟和大西洋鲑、以及鳉、东方 红鳍鲀和尼罗罗非鱼等以 85%的置信值聚在一起, 再以 71%的置信值与硬骨鱼类二倍体祖先雀鳝的 IL-17N 聚为一支,最后与腔棘鱼以 95%置信值聚 为可靠的一支, IL-17N 支与 IL-17A/F2 支聚成一 支的置信值只有 43% (图 2)。

2.2 CcIL-17Ns 的表达分析

2.2.1 胚胎和仔鱼阶段 CcIL-17Ns 的表达 使用 qPCR 测定了鲤胚胎发育阶段 CcIL-17Ns 的表达,

结果显示,受精后 0.5 h 和 12 h CcIL-17Ns 表达量 最高,极显著高于 25 h、35 h、60 h 和 120 h (P<0.01);受精后 35 h 表达下降到最低点,然后 开始上升,但表达量差异不显著(P>0.05)。仔鱼 (出膜后 1—26 d) CcIL-17Ns 的表达稳定与受精后 25 h 后各点无显著差异,均低于受精后 0.5 h 和 12 h (图 3A)。

2.2.2 *CcIL-17Ns* 的组织表达 *CcIL-17Ns* 在鲤 夏花脑中的表达量最高,显著高于鳃(*P*<0.05), 极显著高于肝、心、体肾、肌肉、肠、皮肤和脾 脏中的表达量(*P*<0.01); 在鳃中的表达量显著高 于肾和肌肉中的表达量(*P*<0.05) (图 3B)。

CcIL-17Ns 在成鱼脑中的表达最高,其次是 肝,均极显著高于其他组织(*P*<0.01),其余组织 间没有明显差异(*P*>0.05) (图 3C)。

2.2.3 嗜水气单胞菌刺激对 CcIL-17Ns 表达的影响 实时定量 PCR 结果显示, 嗜水气单胞菌感染 6 h, 脑中 CcIL-17Ns 的表达显著高于肝、心、体 肾、肌肉、肠、皮肤、脾、鳃和头肾中的表达(P<0.05); 感染 1 d, CcIL-17Ns 的表达量从高到低依次为肌



PPM1F: Protein phosphatase 1F; SDF2L1: stromal cell derived factor 2 like 1; TOP3B: DNA topoisomerase 3-beta-1. 箭头方向表示转录方向.

间关刀问衣小转求刀问.

Fig. 1 Schematic diagram of synteny of IL-17N in teleosts and their ancestors *PPM1F*: Protein phosphatase 1F; *SDF2L1*: stromal cell derived factor 2 like 1; *TOP3B*: DNA topoisomerase 3-beta-1. Arrows indicate the transcriptional orientation.

肉、肝、皮肤、脑、心、体肾、肠、鳃和头肾,但 差异不显著(P>0.05); 3 d 时,脑和心的 CcIL-17Ns 表达显著高于肝、体肾、肌肉、肠、皮肤、脾、 鳃和头肾(P<0.05); 7 d 时,脑、心、肝和肌肉中 CcIL-17Ns 的表达显著高于体肾、肠、皮肤、脾、 鳃和头肾(P<0.05) (图 3D~图 3G)。

嗜水气单胞菌感染 6 h, 脑中 *CcIL-17Ns* 基因 表达量显著高于对照组(*P*<0.05); 感染 1 d, 肝、 心、体肾、肌肉、肠、皮肤、脾、鳃和头肾中 *CcIL-17Ns* 也显著上调(*P*<0.05), 感染 3 d 和 7 d, 各组织中 *CcIL-17Ns* 的表达均回落, 与对照组无 显著性差异(*P*>0.05) (图 3H)。

2.3 重组蛋白的表达与纯化

将测序验证过的重组载体 pMAL-c2X-17N 和 对照载体 pMAL-c2X 分别转化至大肠杆菌 Transetta (DE3)敏感态细胞中, 25 ℃, 0.5 mmol/L IPTG, 诱导培养 8~12 h, 离心收集菌体并超声裂 解, SDS-PAGE 电泳检测总菌和上清液中鲤 IL-17N 重组蛋白(MBP-17N)的表达情况。结果显示,在分 子量 58 kD 处出现一特殊条带,其分子量与预期 重组目的蛋白大小一致,且在上清也有明显表达 (图 5A)。使用镍柱纯化上清蛋白中重组蛋白 MBP-17N 和 MBP 蛋白, SDS-PAGE 电泳检测,得 到单一条带与预期结果一致。每克总菌约获得 0.09 mg MBP-17N 蛋白,每克总菌约获得 0.46 mg MBP 蛋白(图 5B)。

2.4 鲤 IL-17N 重组蛋白(MBP-17N)对鲤炎症因
子、趋化因子以及 NF-κB、TRAF6 表达的影响

与MBP蛋白对照组相比,所有基因的N83对 照组均无显著性差异(P>0.05),下文对照组皆以 MBP蛋白对照组为准。

使用不同浓度的 MBP-17N 蛋白(0.1 ng/mL、 1 ng/mL、10 ng/mL)孵育肾组织 8 h,结果肾组织 中的 *IL-1β* 的表达量均极显著上调(*P*<0.01),分别



图 2 鱼类 IL-17 家族成员系统进化树

將氨基酸序列与 ClustalOmega 程序比对,并使用 MEGA 7 软件中的邻接法构建无根系统发育树。节点处数字代表 10000 次自举 检验置信度。各氨基酸序列的 GenBank 登录号: 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*, Ci): IL-17A/F1 KC978892, A/F2 KP412312, A/F3 AKM20919, IL-17C AKM20917, IL-17-D AGW43284; 斑马鱼(*Danio rerio*, Dr): IL-17A/F1 NM_001020787, A/F2 NP_001018634, A/F3 NP_001018626, IL-17C NP_001018624, IL-17D NM_001020789; 斑秘鳉(*Aphanius punctatus*, Ip): IL-17A/F1 XP_017331302, A/F3 XP_017310921, IL-17B XP_017341329, IL-17C1 XP_017320727, IL-17C2 XP_017320728, IL-17D XP_017326425; 尼罗罗 非鱼(*Oreochromis niloticus*, On): IL-17A/F1 XP_003437645, A/F2 XP_003437800, A/F3 XP_003440884, IL-17C1 XP_003449294, IL-17C2 XP_005447868, IL-17D XP_003456654, IL-17N LG12 (347611152:426406-433928); 东方红鳍鲀(*Takifugu rubripes*, Tr): IL-17A/F1 AB522594, A/F2 BAI82579, A/F3 AB522596, IL-17C1 BAI82581, IL-17C2 BAI82582, IL-17D XP_003962280, IL-17N AB522600; 青鳉(*Oryzias latipes*, Ol): IL-17A/F1 AB567679, A/F2 NP_001191713, A/F3 AB567681, IL-17C1 CAW30792, IL-17-D BAJ41375, IL-17N NP_001191717, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, Om): IL-17A/F2NP_001118091, IL-17C1 CAW30792, IL17C2 CAW30793, IL-17D CAE45584, IL-17N KJ921981,大西洋鲑(*Salmo salar*, Ss): IL-17D NP_001134365, IL-17N KJ921975; 雀鳝(*Lepisosteus oculatus*, Lo): IL-17A/F1 ENSLOCG00000015957, IL-17A/F2 ENSLOCG00000015959; 腔棘鱼(*Latimeria chalumnae*, Lc): IL-17C XP_006008330, IL-17N ENSLACG00000013517.

Fig. 2 Phylogenetic tree of fish IL-17 family members

Amino acid sequences are aligned with the ClustalOmega program and an unrooted phylogenetic tree is constructed with the neighbor-joining method in the MEGA 7 software. Node values represent percent bootstrap confidence derived from 10,000 replicates. The accession numbers of the molecules used are as follows: *Ctenopharyngodon idella* (Ci): IL-17A/F1 KC978892, A/F2 KP412312, A/F3 AKM20919, IL-17C AKM20917, IL-17-D AGW43284; *Danio rerio* (Dr): IL-17A/F1 NM_001020787, A/F2 NP_001018634, A/F3 NP_001018626, IL-17C NP_001018624, IL-17D NM_001020789; *Aphanius punctatus* (Ip): IL-17A/F1 XP_017331302, A/F3 XP_017310921, IL-17B XP_017341329, IL-17C1 XP_017320727, IL-17C2 XP_017320728, IL-17D XP_017326425; *Oreochromis niloticus* (On): IL-17A/F1 XP_003437645, A/F2 XP_003437800, A/F3 XP_003440884, IL-17C1 XP_003449294, IL-17C2 XP_005447868, IL-17D XP_003456654, IL-17N LG12 (347611152:426406-433928); *Takifugu rubripes* (Tr): IL-17A/F1 AB522594, A/F2 BAI82579, A/F3 AB522596, IL-17C1 BAI82581, IL-17C2 BAI82582, IL-17D XP_003962280, IL-17N AB522600; *Oryzias latipes* (OI): IL-17A/F1 AB567679, A/F2 NP_001191713, A/F3 AB567681, IL-17C NP_001191723, IL-17-D BAJ41375, IL-17N NP_001191717; *Oncorhynchus mykiss* (Om): IL-17A/F2NP_001118091, IL-17C1 CAW30792, IL17C2 CAW30793, IL-17D CAE45584, IL-17N KJ921981, *Salmo salar* (Ss): IL-17D NP_001134365, IL-17N KJ921975; *Lepisosteus oculatus* (Lo): IL-17A/F1 ENSLOCG00000015957, IL-17A/F2 ENSLOCG00000015959; *Latimeria chalumnae* (Lc): IL-17C XP_006008330, IL-17N ENSLACG00000013517.



图 3 CcIL-17Ns 在鲤不同发育阶段以及嗜水气单胞菌感染后各组织的表达量

A. 鲤胚胎及仔鱼中 CcIL-17Ns 的表达水平,以受精后 120 h 的相对表达量为 1; B. CcIL-17Ns 在鲤夏花不同组织中的表达,肾的相 对表达量为 1; C. CcIL-17Ns 在成鱼各组织中的表达; D~G 分别为嗜水气单胞菌感染后 6 d、1 d、3 d和 7 d CcIL-17Ns 的表达, C~G 中各组织 CcIL-17Ns 的相对表达量以 CcIL-17Ns 在成鱼体肾中的相对表达量为 1; H. 嗜水气单胞菌感染后 CcIL-17Ns 的表达变 化,对照组为 1. 不同小写字母表示不同组织间差异显著(P<0.05),不同的大写字母表示不同组织间差异极显著(P<0.01).

B: 脑; L: 肝; H: 心; K: 体肾; M: 肌肉; I: 肠; Sk: 皮肤; Sp: 脾; G: 鳃; HK: 头肾.

Fig. 3 Expression of *CcIL-17Ns* in different development and various tissues of healthy and *Aeromonas hydrophila* infected individuals Expression of *CcIL-17Ns* in embryo and larval carp. Date in A is normalized to the expression level of *CcIL-17Ns* at 120 h after fertilization. B. Expression of *CcIL-17Ns* in tissues of fingerling. Data in B is normalized to the expression level of the fingerling's kidney value of *CcIL-17Ns*. C. Expression of *CcIL-17Ns* in adult fish tissues. D-G. Expression of *CcIL-17Ns* on 6 h, 1 d, 3 d and 7 d after *A. hydrophila* infection, respectively. Data in C-G are expressed relative to the HK value.H.Changes in expression of *CcIL-17Ns* at different time after *A. hydrophila* infection. Data in H are expressed relative to the corresponding control group value. Different lowercase letters indicate significant difference at P<0.05 and different capital letters indicate highly significant difference at P<0.01.

B: brain; L: liver; H: heart; K: trunk kidney; M: muscle; I: intestine; Sk: skin; Sp: spleen; G: gill; HK: head kidney.





是对照组的 28.11 倍、18.98 倍和 9.59 倍, 100 ng/mL 时 *IL-1β* 显著上调,是对照组的 6.52 倍(*P*<0.05) (图 5A)。1 ng/mL 和 10 ng/mL 的 MBP-17N 极显 著上调 *IFN-γ* 的表达(*P*<0.01), 100 ng/mL 时,与 MBP 蛋白对照组相比, *IFN-γ* 的表达水平已无显 著性差异(*P*>0.05) (图 5B)。*IL-6* 的表达呈现先升 高后降低的趋势,浓度 1 ng/mL 时达到峰值,且 极显著高于对照组(*P*<0.01) (图 5C)。

MBP-17N的浓度为 1 ng/mL、100 ng/mL 时, CCL20的表达显著上调,分别是对照组的 1.21 倍 和 1.22 倍(P<0.05),在 10 ng/mL 时达到峰值,且 极显著高于对照组(P<0.01)(图 5D)。

在 MBP-17N 蛋白的刺激下, *NF-κB* 的表达极显著高于对照组,表达水平随着浓度的升高先增加后下降,在 1 ng/mL 时达到峰值(*P*<0.01)(图 5E);类似地,*TRAF6* 的表达趋势与 *NF-κB* 相似,也在 1 ng/mL 时显著高于对照组(*P*<0.05)(图 5F)。

3 讨论

本研究挖掘到两个鲤的*IL-17N*基因*CcIL-17Na*和*CcIL-17Nb*,从线性分析、同源比对和系统树,可以看出,IL-17N在鱼类二倍体祖先雀鳝和陆生动物祖先腔棘鱼中均存在且有一定的保守性,而在哺乳动物中没找到该基因^[17,27],应该是在进化

过程中丢失所致。本研究中系统进化树的分析结 果显示 *IL-17N*和 *IL-17A/F2* 聚成一支的置信值只 有 43%,不支持 Wang 等^[20]推测的该基因为 IL-17A/F 亚家族成员的观点,这可能与当时鱼类 IL-17 家族基因挖掘工作还处于起始阶段,不能 很好地揭示 IL-17N 的系统进化关系有关。鱼类 IL-17 家族成员中 IL-17C 一支置信值小于 70%, 表明该基因在进化中变异比较大。

本研究组织表达分析结果表明,无论是夏花 还是成鱼 *CcIL-17Ns* 在脑中表达量均最高。这与 青鳉和鲑^[20]的 *IL-17N* 在脑中有高表达一致,但该 基因在神经系统中为何高表达,其作用是什么还 有待揭示; *IL-17N* 在河鲀的头肾中表达量最高^[13], 而鮸中则是在肾脏和鳃中有高表达^[16],说明了 IL-17N 的表达模式存在物种差异。此外,*CcIL-17Ns* 与 *CcIL-17A/F2* 的表达存在差异,*CcIL-17A/F2* 在鳃的表达水平最高^[3],说明 IL-17 家族不同成员 的表达存在差异,这与斑马鱼的研究结果一致^[12]。

有研究表明, IL-17 家族参与了炎症反应。 Kumari 等^[26]报道, LPS 刺激大西洋鲑头肾, *AsIL-17D* (*Atlantic salmon IL-17D*)在1d时表达显著上 调, 4 d 和 7 d 时, *AsIL-17D* 表达水平均降低。在 Li 等^[3]的研究中, 嗜水气单胞菌感染后的前 3 d, 鲤 *IL-17A/F2* 的表达在黏膜组织, 如头肾、体肾和



图 5 不同浓度的 MBP-17 蛋白对 *IL-1β、IFN-γ、IL-6、CCL20、NF-κB、TRAF6* 的表达影响 A: *IL-1β*; B: *IFN-γ*; C: *IL-6*; D: *CCL20*; E: *NF-κB*; F: *TRAF6*; N83: 83 ℃失活的 MBP-17N 蛋白; MBP: 相同体积的 100 ng/mL 的 MBP 蛋白; MBP-17N-0.1、1、10、100 分别表示 0.1 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 的 MBP-17N. 以 N83 组为空白 对照, 对照组为 1, 柱高为平均值; 不同小写字母表示不同组织间差异显著(*P*<0.05), 不同的大写字母表示不同组织间差异极 显著(*P*<0.01).

Fig. 5 Effects of different concentrations of MBP-17N on *IL-1β*, *IFN-γ*, *IL-6*, *CCL20*, *NF-κB* and *TRAF6* expression A: *IL-1β*; B: *IFN-γ*; C: *IL-6*; D: *CCL20*; E: *NF-κB*; F: *TRAF6*; N83: inactive MBP-17N at 83 °C; MBP: 100 ng/mL of MBP protein; MBP-17N-0.1, 1, 10, and 100 represent MBP-17N protein with concentrations of 0.1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL and 100 ng/mL, respectively. Data is normalized to the expression level of the N83. Different lowercase letters indicate significant difference at P<0.05; different capital letters indicate significant difference at P<0.01.

脾中显著上调,第7天表达水平降低。Korenaga 等^[13]证实,草鱼*IL-17N*的表达水平在LPS刺激后

4h达到顶峰,第2天表达水平下调。和上述结果类 似, 鲤感染嗜水气单胞菌后, 6h~1d CcIL-17Ns 在

各组织的表达量均显著增加,3 d 和 7 dCcIL-17Ns 的表达均下调。这与 Korenaga 等^[13]发现 LPS 能 够上调河豚头肾细胞中的 *IL-17N* 的研究一致,而 与 Wang 等^[20]LPS、poly I:C、PHA 和 PMA 对大 西洋鲑头肾细胞中 *IL-17N* 的表达没有影响的研 究结果不一致,说明 IL-17N 可能参与机体的炎症 反应。嗜水气单胞菌诱导的 CcIL-17Ns 参与炎症 反应,但与 CcIL-17A/F2 表达模式不同,暗示它 们在炎症过程中具有不同的生物学功能。

研究表明哺乳动物 IL-17A 和 F 通过 NF-κB 信号通路的激活,刺激炎症因子、趋化因子等的 表达而参与炎症反应^[27,32]。转染 IL-17 基因入小 鼠胃癌细胞,结果趋化因子 CCL20、CXCL2 及免疫 调节因子 VEGF、MMP-9、IL-6 的表达均增加^[28]。 至今研究表明, 鱼类 IL-17 家族成员也参与了免 疫反应, 如鲑 IL-17A/F2 重组蛋白能够上调脾细 胞中 IL-6 和 IL-8 的表达^[29]; 草鱼 IL-17D 重组蛋 白能刺激肾细胞炎症因子 IL-1β、CXCL-8 的表达 ^[30]; 草鱼 IL-17A/F1 重组蛋白可上调促炎细胞因 子 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 的表达^[31], 且两者均可通 过经典的 NF-кB 炎症信号通路发挥作用; 鲤 IL-17A/F2 重组蛋白也可诱导肾组织中炎症因子 *IL-1β*的表达^[3]。本研究结果表明 MBP-17N 也能 诱导炎症因子 IL-1β、IFN-y、IL-6 以及趋化因子 ССL20 的表达, 表明鲤 IL-17N 也可通过 NF-кВ 炎症信号通路参与炎症反应。本研究结果还显示 1 ng/mL MBP-17N 重组蛋白对所检测的因子均有 显著的刺激作用, 而高浓度 100 ng/mL 则刺激作 用减弱, 推测高浓度对细胞活性有影响^[3]。

综上所述,本研究分离并鉴定了鲤 IL-17N 基因,对鱼类 IL-17N 的系统发育进行了比较全面的分析,测定了在 CcIL-17Ns 的时空表达模式; 嗜水气单胞菌能够刺激 CcIL-17Ns 的显著上调,以及鲤 IL-17N 重组蛋白能够诱导促炎细胞因子(IL-1β、IFN-γ 和 IL-6)、趋化因子 CCL20 及 NF-κB、TRAF6 的上调,表明 IL-17N 能通过 NF-κB 途径,通过诱导趋化因子和炎症因子达到促炎作用。

参考文献:

[1] Yao Z B, Fanslow W C, Seldin M F, et al. Herpesvirus

saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor[J]. Immunity, 1995, 3(6): 811-821.

- [2] Rouvier E, Luciani M F, Mattéi M G, et al. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a *Herpesvirus saimiri* gene[J]. Journal of Immunology, 1993, 150(12): 5445-5456.
- [3] Li H X, Yu J H, Li J L, et al. Cloning and characterization of two duplicated interleukin-17A/F2 genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.): Transcripts expression and bioactivity of recombinant IL-17A/F₂[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 51: 303-312.
- [4] Kolls J K, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation[J]. Immunity, 2004, 21(4): 467-476.
- [5] Gaffen S L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family[J]. Nature Reviews Immunology, 2009, 9(8): 556-567.
- [6] Weaver C T, Hatton R D, Mangan P R, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages[J]. Annual Review of Immunology, 2007, 25: 821-852.
- [7] Liang S C, Tan X Y, Luxenberg D P, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2006, 203(10): 2271-2279.
- [8] Onishi R M, Gaffen S L. Interleukin-17 and its target genes: Mechanisms of interleukin-17 function in disease[J]. Immunology, 2010, 129(3): 311-321.
- [9] Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, et al. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction[J]. Immunity, 2008, 29(4): 628-636.
- [10] Boggio E, Clemente N, Mondino A, et al. IL-17 protects T cells from apoptosis and contributes to development of ALPS-like phenotypes[J]. Blood, 2014, 123(8): 1178-1186.
- Zou W, Restifo N P. T_H17 cells in tumour immunity and immunotherapy[J]. Nature Reviews Immunology, 2010, 10(4): 248-256.
- [12] Gunimaladevi I, Savan R, Sakai M. Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21(4): 393-403.
- [13] Korenaga H, Kono T, Sakai M. Isolation of seven IL-17 family genes from the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(5-6): 809-818.
- [14] Wang T H, Martin S A M, Secombes C J. Two interleukin-17C-like genes exist in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* that are differentially expressed and modulated[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(5):

491-500.

- [15] Secombes C J, Wang T, Bird S. The interleukins of fish[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2011, 35(12): 1336-1345.
- [16] Yang Q, Sun Y N, Su X R, et al. Characterization of six IL-17 family genes in miiuy croaker and evolution analysis of vertebrate IL-17 family[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 49: 243-251.
- [17] Kono T, Korenaga H, Sakai M. Genomics of fish IL-17 ligand and receptors: A review[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(5): 635-643.
- [18] González-Fernández C, Chaves-Pozo E, Cuesta A. Identification and regulation of interleukin-17 (IL-17) family ligands in the teleost fish European sea bass[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 2439.
- [19] Yang Q. Characterization, expression, and evolution analysis of miiuy croaker IL-1 and IL-17 family genes[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2017. [杨琼. 鮸鱼 IL-1及 IL-17 家族成员特征、表达及进化分析[D]. 舟山:浙江海洋大学, 2017.]
- [20] Wang T H, Jiang Y S, Wang A, et al. Identification of the salmonid IL-17A/F1a/b, IL-17A/F2b, IL-17A/F3 and IL-17N genes and analysis of their expression following in vitro stimulation and infection[J]. Immunogenetics, 2015, 67(7): 395-412.
- [21] Louis A, Muffato M, Roest Crollius H. Genomicus: five genome browsers for comparative genomics in eukaryota[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 41(D1): D700-D705.
- [22] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [23] Krogh A, Larsson B R, von Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 305(3): 567-580.
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

- [25] Wang Q, Li J L, Tang Y K, et al. Prokaryotic expression and activity analysis of catalytic domain of *Cyprinus carpio* PLA2g3a1[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2020, 43(2): 339-346. [王钦, 李建林, 唐永凯, 等. 鲤鱼 PLA2g3a1 催化活性区的原核表达及酶活性分析[J]. 南京 农业大学学报, 2020, 43(2): 339-346.]
- [26] Kumari J, Larsen A N, Bogwald J, et al. Interleukin-17D in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Molecular characterization, 3D modelling and promoter analysis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(5): 647-659.
- [27] Shi P Q, Zhu S, Qian Y C. IL-17 signaling and function[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2011, 33(4): 345-357. [施 沛青,朱书, 钱友存. IL-17 的信号传导及功能研究[J]. 中 国细胞生物学学报, 2011, 33(4): 345-357.]
- [28] Zhang Z P, Li Q X, Shan B E. Effects of IL-17 gene transfection on the biological characteristics of gastric cancer cells in mice[C]//Proceedings of the 9th National Congress of Immunology. Beijing: Chinese Society for Immunology, 2014: 559-560. [张智萍, 李巧霞, 单保恩. 转染 IL-17 基因 对小鼠胃癌细胞生物学特性的影响[C]//第九届全国免疫 学学术大会论文集. 北京: 中国免疫学会, 2014: 559-560.]
- [29] Monte M M, Wang T H, Holland J W, et al. Cloning and characterization of rainbow trout interleukin-17A/F2 (IL-17A/F2) and IL-17 receptor A: Expression during infection and bioactivity of recombinant IL-17A/F2[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(1): 340-353.
- [30] Du L Y, Qin L, Wang X Y, et al. Characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) IL-17D: Molecular cloning, functional implication and signal transduction[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 42(2): 220-228.
- [31] Du L Y, Feng S Y, Yin L C, et al. Identification and functional characterization of grass carp IL-17A/F1: An evaluation of the immunoregulatory role of teleost IL-17A/F1[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2015, 51(1): 202-211.
- [32] Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members[J]. Immunity, 2011, 34(2): 149-162.

Cloning, expression and pro-inflammatory effect of interleukin-17N in *Cyprinus carpio*

ZHANG Lei¹, SHEN Ze'en¹, LI Hongxia^{1, 2}, XU Yuxin¹, LI Yingbin¹, YU Juhua^{1, 2}

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: Interleukin-17 (IL-17) plays an important role in inflammation and host defense in mammals. To investigate the biological function of CcIL-17N, two CcIL-17N genes were identified from the common carp (Cyprinus carpio) whole-genome using BLAST and gene cloning performed by genomics, named as CcIL-17Na and CcIL-17Nb, respectively. They were encoded by the complementary sequence of intron 2 of the TOP3B gene. Synteny analysis indicated that SDF2L and PPM1F were present on both sides of IL-17N, except for Takifugu rubripes. These two IL-17N isoforms encoded 136 amino acids, including 3 exons, and exhibited 97.1% similarity in sequence. The similarity between CcIL-17Na and CcIL-17Nb of common carp with other teleosts were estimated to be 65.3%–97.1%, 64.7%–96.3%, and of 32.9%–51.4%, 31.4%–50.7% in comparison with other IL-17 family members in common carp. The phylogenetic tree of teleost IL-17 family members showed that 7 members constitute 6 credible branches, of which IL-17A/F1 and IL-17A/F3 constitute a branch, and the remaining six members form a branch separately. IL-17N of common carp was clustered with zebrafish and grass carp with a bootstrap of 95%, with medaka, T. rubripes, tilapia, etc. clustered with a bootstrap of 84%, with Lepisosteus osseus IL-17N with a bootstrap of 70%, and finally coelacanth IL-17N with a bootstrap of 97%. CcIL-17Ns expression level at 0.5 and 12 h after fertilization was significantly higher than that at 25, 35, 60, 120 h, and larval fish stage (P < 0.01). CcIL-17Ns expression in the brain of summerlings and adult fish was the highest, which was significantly higher than other tissues (P < 0.05 or P < 0.01). CcIL-17Ns expression in all tissues was up-regulated under Aeromonas hydrophilis infection. CcIL-17Ns expression in the brain was significantly up-regulated for 6 h after infection (P < 0.05). At 1 d, CcIL-17Ns expression in other tissues was significantly up-regulated, and the expression was decreased for 3 d and 7 d after infection, with no significant difference from the control group (P>0.05). Recombinant prokaryotic expression plasmid pMAL-c2X-17N was constructed and transformed into Escherichia coli Transetta (DE3) for prokaryotic expression. Soluble recombinant common carp IL-17N protein (rccIL-17N, MBP-17N) was obtained by Ni-NTA. Under the induction of different concentrations of MBP-17N protein (0.1, 1, 10, and 100 ng/mL), kidney tissue was incubated for 8 h. qPCR indicated that $IL-1\beta$ and NF- κB was significantly up-regulated at 0.1, 1, 10, and 100 ng/mL of MBP-17N. IFN- γ was significantly up-regulated under 1 and 10 ng/mL MBP-17N, whereas IL-6 was significantly up-regulated at 0.1 and 1 ng/mL. CCL20 was significantly up-regulated at 1, 10, and 100 ng/mL. Furthermore, TRAF6 gene significantly upregulated at 1 ng/ml than that of the control group. In conclusion, this study revealed that ccIL-17N was highly conserved in evolution. Meanwhile, ccIL-17N is involved in inflammatory response based on its role in A. hydrophila infection and rccIL-17N function.

Key words: *Cyprinus carpio*; interleukin-17; gene expression; prokaryotic expression; inflammatory response Corresponding author: YU Juhua. E-mail: yujh@ffrc.cn