



尼罗罗非鱼白细胞介素 21 基因 (*OnIL-21*) 及其受体基因 (*OnIL-21R*) 克隆及表达分析

李 兰, 高阿龙, 陈建林, 雷 阳, 吴丽婷*, 叶剑敏*

(华南师范大学生命科学学院, 现代水产养殖科学与工程研究院,
广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东广州 510631)

摘要: 为研究白细胞介素 21 (IL-21) 及其受体 IL-21R 在鱼类抵御病原菌的免疫应答过程中的作用及在机体炎症中的分子机制, 实验利用反转录 PCR (RT-PCR) 技术成功克隆了尼罗罗非鱼 IL-21 基因 (*OnIL-21*) 及其受体 IL-21R 基因 (*OnIL-21R*), 对其进行生物信息学分析, 并利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测其 mRNA 的表达水平。结果显示, *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 的开放阅读框分别为 420 bp 和 1 548 bp, 分别编码 139 和 515 个氨基酸。经氨基酸序列预测分析, *OnIL-21* 为分泌型蛋白, 具有多个保守的磷酸化位点和一个 Ig-like 结构域; 而 *OnIL-21R* 是跨膜蛋白, 具有典型的 γ -c 链, 氨基酸序列都具有多个保守的磷酸化位点和糖基化位点。系统进化树结果表明, IL-21 与 IL-21R 的氨基酸序列在物种进化过程中具有一定的保守性, 尼罗罗非鱼 IL-21 和 IL-21R 的氨基酸序列均与斑马拟丽鱼 IL-21 和 IL-21R 的亲缘关系最近。组织差异性表达分析发现, *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 在健康尼罗罗非鱼的多种组织中均有表达, 但具有明显的组织差异性。*OnIL-21* 在皮肤和心脏组织中表达量较高, 在肌肉中较低; 而 *OnIL-21R* 在鳃和脾脏组织中表达量最高, 在肌肉中最低。无乳链球菌和嗜水气单胞菌体内感染和体外刺激白细胞后, 头肾和脾脏中 *OnIL-21* 和 *OnIL-21R* 表达量均呈现显著上调, 并在 72 h 内维持较高的表达水平, 说明 *OnIL-21* 和 *OnIL-21R* 可能参与尼罗罗非鱼病原菌感染的免疫应答过程。此外, 重组蛋白 (r)*OnIL-21* 刺激脾脏白细胞后, *OnIL-21R* 和炎症相关因子基因 (*IL-1 β* 、*TNF- α* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *IL-10*) 的表达均发生显著上调, 表明 *OnIL-21* 可调控其受体基因 *OnIL-21R* 的表达及参与调控机体的炎症反应。上述研究结果阐述了尼罗罗非鱼 IL-21 与 IL-21R 的分子生物学特征, 并初步阐明了二者参与机体病原菌感染的免疫应答过程, 为进一步探究 IL-21 通过其受体 IL-21R 调控机体免疫反应的作用机制和信号通路提供了重要参考。

关键词: 尼罗罗非鱼; IL-21; IL-21R; 基因克隆; 免疫应答

中图分类号: S 942

文献标志码: A

免疫细胞指的是参与机体免疫应答或与免疫应答相关的细胞, 是免疫系统的基本组分, 在机体免疫防御中发挥重要作用。免疫细胞功能的发

挥受到多种因素调节, 其中细胞因子最为关键。细胞因子具有多种生物学功能, 包括调节细胞生长、分化, 参与免疫应答和炎症反应等^[1]。白细

收稿日期: 2021-06-15 修回日期: 2021-07-06

资助项目: 国家自然科学基金 (31972818); 中国博士后科学基金 (2019M662959)

第一作者: 李兰 (照片), 从事鱼类免疫学研究, E-mail: 845232441@qq.com

通信作者: 吴丽婷, 从事鱼类免疫学研究, E-mail: ltingwu@m.scnu.edu.cn;

叶剑敏, 从事鱼类免疫学研究, E-mail: jmye@m.scnu.edu.cn



胞介素 21(interleukin 21, IL-21) 是一个四螺旋簇细胞因子, 属于 I 类细胞因子家族 (包括 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 和 IL-15 等), 与 IL-2、IL-4 和 IL-15 具有高度同源性^[2]。IL-21 主要是由活化的 CD4⁺ T 细胞和自然杀伤 T 细胞 (NKT 细胞) 产生, 是机体免疫系统的重要细胞因子, 能够促进 T 细胞增殖分化、调节 B 细胞增殖分化与凋亡、增强 NK 细胞的细胞毒性作用和产生 IFN- γ 的能力, 并介导主动免疫与被动免疫之间的转换等, 在机体抵御病原菌的免疫应答中发挥重要作用^[3]。哺乳动物研究表明, IL-21R 是 IL-21 的专一性功能受体, 其中 IL-21 的生物学效应主要通过 IL-21R 介导^[4]。IL-21 分子与免疫细胞表面的 IL-21R 结合后, 胞质区的酪氨酸激酶信号转导子 (JAK) 被磷酸化, 继而磷酸化转录激活子 (STAT) 形成同源二聚体或异源二聚体, 然后二聚体进入细胞核后调控相关基因的转录与表达^[5]。

哺乳动物 IL-21 及 IL-21R 已被广泛研究, 相关的分子结构与介导的信号通路, 以及所参与的免疫相反应都已经基本明确^[6]; 但是其在硬骨鱼中的研究尚浅。目前为止, 关于鱼类 IL-21 的研究主要包括 2005 年 Bird 等^[7] 在红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 中利用比较基因组学的方法鉴定出 IL-21 的同源基因, 表明 IL-21 在鱼类中已经出现; 而后在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 和牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*) 中相继研究了 IL-21, 结果发现, 鱼类 IL-21 的结构与哺乳动物 IL-21 具有较高同源性, 表明 IL-21 在进化过程中较为保守^[8]。目前, 硬骨鱼 IL-21 及其受体 IL-21R 在机体炎症中的作用和分子机制尚不明确, 有待进一步研究。

尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 属于鲈形目 (Percomorpha) 丽鱼科 (Cichlidae) 罗非鱼属 (*Oreochromis*), 是一种世界性的商业养殖鱼类, 其中中国是世界最大的罗非鱼养殖国。由于养殖环境的限制, 鱼类细菌病害频发, 深入解析尼罗罗非鱼对病原体感染的免疫应答可为细菌感染的预防和控制提供理论基础^[9]。本实验已开展的部分工作: ①尼罗罗非鱼的 IL-21 和 IL-21R 的基因克隆及结构分析; ②不同健康组织中 *OnIL-21* 和 *OnIL-21R* 的表达水平; ③不同病原菌体内感染和体外应激, *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 的动态表达趋势; ④重组 IL-21 蛋白 [(r)OnIL-21] 应激免疫白细胞后炎症因子的表达变化。以上研究将阐述尼罗罗非

鱼 IL-21 与 IL-21R 的分子生物学特征, 以及初步阐明二者参与机体抵御病原菌感染的免疫反应中的作用, 并为进一步研究 IL-21 调控鱼类免疫系统的机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料、感染以及样本的收集

尼罗罗非鱼 (100 ± 10) g 购于广东省罗非鱼省级良种场, 暂养于华南师范大学生物园水产养殖基地。所有实验鱼均在养殖温度为 (28 ± 2) °C 的循环水系统中饲养至少 3 周, 使其适应养殖环境。随机选取 3 尾健康的尼罗罗非鱼, 置于含 0.05% 麻醉剂 MS-222 (Sigma-Aldrich, 美国) 的清水中进行麻醉, 并用 75% 乙醇对鱼体进行消毒, 分别独立收集脑、胃、皮肤、肌肉、鳃、心脏、头肾、脾脏、胸腺、肝脏、外周血及肠, 共 12 种组织, 分别放入无 RNase 的 1.5 mL 离心管后快速放入液氮中, 后储存于 -80 °C 超低温冰箱, 用于检测 *OnIL-21* 和 *OnIL-21R* 在健康组织中的表达差异。感染实验是随机挑选 54 尾健康的尼罗罗非鱼, 分为 3 组, 18 尾/组, 进行腹腔注射, 其中实验组分别每尾注射 100 μ L 具有活力的无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (1 × 10⁷ CFU/mL) 或嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) (1 × 10⁷ CFU/mL), 对照组注射等量的无菌 1 × PBS^[10-11]。于注射后 3、6、12、24、48 和 72 h, 分别独立采集头肾和脾脏组织放入无 RNase 的 1.5 mL 离心管, 快速放于液氮, 随后转移至 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

1.2 尼罗罗非鱼 *IL-21* 和 *IL-21R* 克隆及序列分析

从美国国立生物信息中心 (The National Center for Biotechnology Information, NCBI) 网站分别搜索 *OnIL-21* (XP_025765791.1) 及 *OnIL-21R* (XM_003443042.5), 根据获得预测序列的蛋白编码区设计特异性引物 (表 1)。根据 TRIzol (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 使用说明书提取尼罗罗非鱼脾脏和头肾组织总 RNA, 通过反转录试剂 (上海翊圣生物科技有限公司) 使用说明书将 RNA 反转录为 cDNA, 用于 *OnIL-21* 和 *OnIL-21R* PCR 扩增。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带, 切胶后用琼脂糖胶回收试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 纯化回收 PCR 产物, 并将目的片段与 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 日本) 连接, 转化至大肠

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiment

引物名称 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')	应用 application
IL-21-F	ATGAAGCTGATCGTTTTTTGCC	RT-PCR
IL-21-R	TCAGATTCTGCTTATACCCCTTT	RT-PCR
IL-21r-F	ATGGCTCCCCAACATGTGTTCTT	RT-PCR
IL-21r-R	AAGCAGTGGATGATAATGTAG	RT-PCR
eIL-21-F	CCGGATATCTCACCTTTGGAGCGCAAAAACTAC	构建重组质粒 construction of recombinant plasmid
eIL-21-R	CCGGAATTCGATTCTGCTTATACCCCTTTGAACC	构建重组质粒 construction of recombinant plasmid
qIL-21-F	AATGCTCAAACGCGACCTTC	qRT-PCR
qIL-21-R	GAGTGGCAGGTTGAGCAGTT	qRT-PCR
qIL-21r-F	CCACAGCATGAAAACCGCAT	qRT-PCR
qIL-21r-R	CAGGTCCACATGAGGGTAGC	qRT-PCR
qIL-1 β -F	GTTACCAGCAGGGATGAGATT	qRT-PCR
qIL-1 β -R	TGCGGTCTTCACTGCCTCC	qRT-PCR
qTNF- α -F	GGTCATCTGGAGTGGAGGAA	qRT-PCR
qTNF- α -R	AGCCGTGGTCTGAGAAGCTA	qRT-PCR
qIFN- γ -F	CACATCAACCTGACCAAAT	qRT-PCR
qIFN- γ -R	GCCTGTTGGCAGCACC	qRT-PCR
qIL-6-F	ACAGAGGAGGCGGAGATG	qRT-PCR
qIL-6-R	GCAGTGCTTCGGGATAGAG	qRT-PCR
qIL-10-F	TGGAGGGCTTCCCGTCAG	qRT-PCR
qIL-10-R	CTGTCGGCAGAACCGTGTC	qRT-PCR
β -actin-F	AAGCCCATCAGCCTGGTGGAGAGAT	qRT-PCR
β -actin-R	GTTGCCCTGTTGGTTTTCTTCATC	qRT-PCR

杆菌 (*Escherichia coli*) TOP10 感受态细胞 [天根生化科技 (北京) 有限公司], 挑选阳性克隆送至深圳华大基因科技有限公司进行测序。根据相关网站和软件对测序结果进行生物信息学分析, 包括序列翻译 ExPASy: <https://web.expasy.org/translate/>, 蛋白质理化性质 ProtParam: <https://web.expasy.org/protparam/>, 跨膜结构域分析 TMHMMServer: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>, 信号肽预测 SignalP: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, 功能位点分析 Motif-Scan: <https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif-scan>, 多序列比对分析软件 DNAMAN, 和系统进化树构建软件 MEGA 6.0。

1.3 qRT-PCR 检测

根据目的基因序列分别设计 qRT-PCR 特异性引物, 选择罗非鱼的 β -actin 作为荧光定量反应的内参基因 (表 1)。从上述各种组织样品中提取

总 RNA, 然后逆转录成 cDNA。qRT-PCR 根据荧光定量试剂盒 SYBR[®]Green Master Mix(上海翊圣生物科技有限公司)说明书开展实验, 每个样品设置 3 个独立平行。

1.4 尼罗罗非鱼头肾及脾脏白细胞的分离和体外应激

选取健康的尼罗罗非鱼麻醉后, 用 75% 乙醇对其体表进行消毒, 在无菌环境下解剖鱼体取出头肾和脾脏组织, 置于添加 1% 青霉素链霉素双抗 (Gibco, 美国) 的 RPMI-1640 培养基 (Gibco, 美国) 的细胞培养皿中, 用无菌注射器反复轻柔吹打, 使细胞从组织中释放, 用 200 目滤网过滤获得的细胞悬液, 叠加于同体积的 Histopaque[®]-1077 (Sigma, 美国) 白细胞分离液上方, 4 °C, 500 × g 离心 40 min, 获得白细胞。用 0.4% 台盼蓝进行细

胞计数后, 用添加 10% 胎牛血清 (FBS)(Gibco, 美国) 和 1% 双抗的 RPMI-1640 培养基将细胞悬液稀释成 1×10^7 个/mL, 随后细胞铺于 96 孔细胞培养板 (Thermo, 美国), 每孔 100 μ L 培养。置于 25 $^{\circ}$ C 细胞培养箱 (Thermo, 美国) 中 2 h 使其稳定后, 每孔加入 10 μ L 的应激源, 实验组应激源分别是 5% 甲醛溶液灭活的无乳链球菌和嗜水气单胞菌 (1×10^7 CFU/mL), 空白对照组为加入等体积的无菌 $1 \times$ PBS。将细胞置于 25 $^{\circ}$ C 继续培养, 分别于应激后 3、6、12、24、48 和 72 h 收集细胞, 4 $^{\circ}$ C, $500 \times g$ 离心 10 min, 弃上清液后加入 1 mL TRIzol 裂解细胞, 将其保存于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱用于后续的 qRT-PCR 分析。以此探究应激源刺激尼罗罗非鱼头肾及脾脏白细胞后, IL-21 和 IL-21R 的 mRNA 表达情况。

1.5 重组蛋白 (r)OnIL-21 的表达与纯化

根据成功克隆获得的 *OnIL-21* 序列及其蛋白序列分析结果, 设计带有限制性酶切位点的特异性引物对去除信号肽的 *OnIL-21* 开放阅读框进行克隆 (表 1), 将获得的序列与表达载体 pET-32a 连接, 构建 pET-32a-*OnIL-21* 重组表达质粒, 利用大肠杆菌原核表达系统进行重组蛋白的表达, 并采用 Ni-NTA 亲和层析法进行目的蛋白纯化。重组蛋白的表达与纯化具体步骤参考已有文献^[10-11]。

1.6 重组蛋白 (r)OnIL-21 应激脾脏白细胞

分离脾脏白细胞, 具体方法同“尼罗罗非鱼头肾及脾脏白细胞的分离和体外应激”部分, 将得到的脾脏白细胞稀释成 1×10^7 个/mL 铺于 96 孔细胞培养板 (Thermo, 美国), 每孔 100 μ L, 25 $^{\circ}$ C 培养 2 h 使其稳定后, 分别用浓度为 1 μ g/mL 的 (r)OnIL-21 和对照蛋白 Trx 应激细胞^[12], $1 \times$ PBS 作为空白对照。分别于应激后不同时间 (3、6、12、24、48 和 72 h) 收集细胞, 4 $^{\circ}$ C, $500 \times g$ 离心 5 min, 弃上清液后加入 1 mL TRIzol 裂解细胞, 快速冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.7 数据分析

qRT-PCR 熔解曲线由 CFX96 Touch PCR 系统 (BioRad, 美国) 软件分析, 其中 mRNA 在组织和细胞分布的荧光定量实验数据用 $2^{-\Delta C_t}$ 法分析, 体内感染和细胞应激用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析^[13]。Graphpad prism 8.0 软件用于数据统计分析及作图, 测量数据用平均值 \pm 标准误 (mean \pm SD) 表示, 单因素方

差分析和邓肯氏多重比较法测试组间差异性, 差异显著性用*表示, 其中*为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$, ***为 $P < 0.001$ 。

2 结果

2.1 *OnIL-21* 和 *OnIL-21R* 的克隆及序列分析

OnIL-21 的开放阅读框为 420 bp, 编码 139 个氨基酸 (aa)(图 1-a); ProtParam 在线软件预测 *OnIL-21* 氨基酸相对分子量为 16.03 ku, 理论等电点为 8.83; SignalP 预测 N 端前 19 个氨基酸编码信号肽, 无跨膜结构; SMART 在线软件分析, *OnIL-21* 氨基酸序列包含 2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、2 个 N-糖基化位点和 1 个微体 C 端定位信号 (137~139 aa) (图 1-a)。*OnIL-21R* 的开放阅读框为 1 548 bp, 编码 515 aa (图 1-b); ProtParam 在线软件预测 *OnIL-21R* 氨基酸相对分子量为 59.00 ku, 理论等电点为 4.66; SignalP 预测 N 端前 22 个氨基酸编码信号肽; TMHMMServer 2.0 在线预测 *OnIL-21R* 为 1 次跨膜蛋白; Motif-Scan 在线软件分析, *OnIL-21R* 蛋白序列包含 10 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、8 个 N-糖基化位点、4 个 N-酰基化位点、3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、1 个酪氨酸磷酸化位点和 2 个 III 型黏连蛋白结构域 (fibronectin type III domain) (D1: 117~212 aa, D2: 118~207 aa)(图 1-b)。

通过分析软件 DNAMAN 对 *OnIL-21/OnIL-21R* 氨基酸序列与已知的人 (*Homo sapiens*)、鼠 (*Mus musculus*)、鸡 (*Gallus gallus*) 和非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 等物种的 IL-21 与 IL-21R 氨基酸序列进行多序列比对, 结果表明, IL-21 与其受体 IL-21R 的氨基酸序列在物种进化过程中具有一定的保守性 (图 2)。进一步分析尼罗罗非鱼 IL-21 和 IL-21R 与其他物种 (包括哺乳动物、两栖类和硬骨鱼) 之间的进化关系, 结果显示, 硬骨鱼类的 IL-21 和 IL-21R 各自聚为一支, 另外尼罗罗非鱼 IL-21 和 IL-21R 均与斑马拟丽鱼 (*Maylandia zebra*) 亲缘关系最接近 (图 3)。

2.2 尼罗罗非鱼 *IL-21* 与 *IL-21R* 组织表达分析

以 β -actin 为内参基因, 通过 qRT-PCR 检测 *OnIL-21* 与 *OnIL-21R* 在健康尼罗罗非鱼脑、胃、皮肤、肌肉、鳃、心脏、头肾、脾脏、胸腺、肝脏、外周血及肠 12 个组织的表达情况。结果显示,

```

1 ATGAAGCTGATCGTTTTTTCCTTTTCACAGTCTACTGTGCTCTTTGGTCAAAGCATCA
1 M K L I V F C L F T V Y C C S L V K A
61 CCTTTGGAGCGCAAAAACACAAAGTCTTAGAGAGCTGAAAATGCTCAAACCGGAC
P L E R K K I O E V I R F I K M L K R D
121 CTTCGCAACACAGAACTAATGATGAATACTCCACCAAGGATATAGAGGACTGCTGTTGT
41 L P N T E L M M N T P P K D I E D C C C
181 CTGACAGCCTTAACCTTGCTTTCCGGGAGACTCTGCTTGAACATTTGGCATAAGTGGAAAA
61 L T A L T C F R E T L L E H F G I S G K
241 TACCAGAAAAAATTTACAAGAGTCTTAATCATACCCCTTACTATCAATGGACTGAACTTT
81 Y Q K K L Y K S L N H T L T I N G L N F
301 TGTAACACAGAACTTCTACGAACAACCTGCTCAACCTGCCACTCATCCTAAGGAAAA
101 C N T E T S T N N C S T C H S H P K E K
361 GCATCAGAGTTTTTCAACAGACTGGAGTCTCTGGTTCAAAGGGTATAAGCAGAACTCTGA
121 A S E F F N R L E S L V Q R G I S R I *

```

(a)

```

1 ATGGCTCCCAACATGTTCTTTTGTCTGGAGCCTCACTCTTTTCCTTCAAGGATCTGCATCATTTGCAATGTCACTGCTGG
1 M A P O H V F F L L W S L T L F L H G A S A S F C N V T C W
91 ACAGACTACGAAGAGTGTGAACTGTTCGTCCGACGCTCTGTGCCGATGAATCCCTTAACATCAGTGTCAATTTGCAGGGGTGAAGAT
T D Y E E L L N C S C A A S V P M N P L N I S V I C R G E D
181 GCAGAGTGTGAGCAGCTGTGTTATCCGACCGCTCAGTCTGGTGTCAAATTAAGAGCTTTGAGGATGTGCATCAGTGGAAACA
A D V D G S C V I R P P Q S W C Q I N K S F E D V A S V G T
271 GTCTGGACACGACAGTCAAGTGAAGAAGCAGCTCATTCAATAAGTACTCCAGCTGGAACTGAGTGAAGTGGTAACTTAAGCCT
V C D T T V S E E G S S F I N D S S S W N L S E V V K L K P
91 CCTTTAAAGCTTCAAGTAGAAAAAGCAGCGAATTCACAAATAACCTGGAGCCATGAGAGCCGTGACACCGACTGCCTCAGATACAGA
P L N V O V E K A A E F Y N I T W S H E S A D T D C L R Y R
121 GTCCGATAAAGAACGAGCGAAAACCTGTTGAAGGATCCAGTTTCTCCAAGGAAAGAGTGTGAGAAATGCACATTTGTATAAACACCAAT
V R I R T S E N L L K D P V F S K E R V S E M H I L I N H N
151 GAACTACAACCATATACCGATTACTGTGGATGTTCAAGCCACATTTTGTCTAAATAAGCCCTTCAAGGTCATGGAGTGAATGGAGT
E L O P Y T D Y T V D V O A T F C P K Y A L O G P W S E W S
181 TCCAATAAAAACAGGAAACAGCGGTTAAATGTCAAAGTACTTGGTGGCGGCTTCTGCGCCGTCATTTTCTTCAATTTTGTG
S T T N W K T Q A L N V K G T W W R V F L P V I F F F I F V
211 CTGGTCTGTGTTATTCACAGAAAACGTGTGGCAGAAAACCTTGGAGTATTACGTACATCCCGAGTCCGGATGAGTTTTTCAAACCC
L G L C Y S O K T C W Q R K L E V I T Y I P S P D E F F K P
241 CTGTATCACAACACGAAAGGAACTCAAGGAATGGTGAAGCCTGTATTCAAGTGAATGATTAAGTGAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
L Y H N Y E G N F K E W V K P V F S E Y D Y L K I S P N V Q
271 ATGATGAGTGAGAAAACAGCAGCATCCTTCACTGGAGCAGCAGAAAGCAGCAGCAATGAGGACAAATGAGACGAATCAAGTGGCGAC
M M S E K Q H D I L H W S D E K Q R D N E D N E T N Q G G D
301 ATCCACCACATGCTGCAGCTCACAGCAACATGCTGCTGCACTTCCAGATGGTGACAGTTCACAAGGCAACAGCCACTCCACTGGACAC
I H H M L Q P H S N M L L H F P D G D S S Q G N S H S T G H
331 ATCTCCATCCATCTGTAACCTTATCTGGAGAAGTTTTGATGAGGAAGTTACATCACAGAGCTCCCTCAGAAGTTACCAAGATGGAGAA
I S I H T V T L S G E D F D E E V T S Q S S L R S Y Q D G E
361 AGCTTGGGCTCCTTTGAGGAAGACAACAGAGAGCATGCCAGCTATGATTTAGAGGAGCCTCACATGTCCAGAATGGACAGCAAAAGTGGG
S L G S F E E D N R E H A S Y D L E E P H M S R M D R Q S G
1 171 GTATTACCAGCATGAAAACCCATATCCAATGACCTTCTAGTGGAAAACCTAAACTCCAGCTCATGATGATTTAATGAACACAGAG
V L P Q H E N R I S N D L L V E N L N F Q P H D Q F N E P E
421 AGGGTATCCCTTACTGATTTGAGCAGTCAAGATGGCTACCTCATGTGGACCTGGACACAATGATAGTGGTTTTGGGGAGTGTGGA
R V S L D S F E Q S E D G Y P H V D L D T I D S G F G E C G
451 AGCCCCGAGCATCAGACCAATACAGCAGATCAGATCAACTCTGATTTTATTCATGAGCACCGGAACTCAAATTCAAATTTATGCAAG
1 441 S P G A S D P N T A D Q I N S D L F H E H A N S N S N Y V K
481 CAGTGGATGATAATGTAG
1 531 Q W M I M *
511

```

(b)

图 1 尼罗罗非鱼 *IL-21(a)* 与 *IL-21R(b)* 的核酸序列和氨基酸序列

浅色阴影覆盖的为 N 糖基化位点；下划线为酪氨酸激酶磷酸化位点；深色阴影覆盖为蛋白激酶 C 磷酸化位点；下划波浪线为信号肽；下划双波浪线为核定位信号；下双划线为纤连蛋白 III 型结构域；终止密码子以*标出

Fig. 1 The nucleotide and amino acid sequences of the *OnIL-21 (a)* and *OnIL-21R (b)*

N glycosylation sites are covered by light shade; underlined are tyrosine kinase phosphorylation sites; phosphorylation sites of protein kinase C are covered by dark shade; the corrugated line below represents the signal peptide; double wavy line is drawn down for nuclear localization signal; the underlined domain is fibronectin type III; the termination codon is marked with *

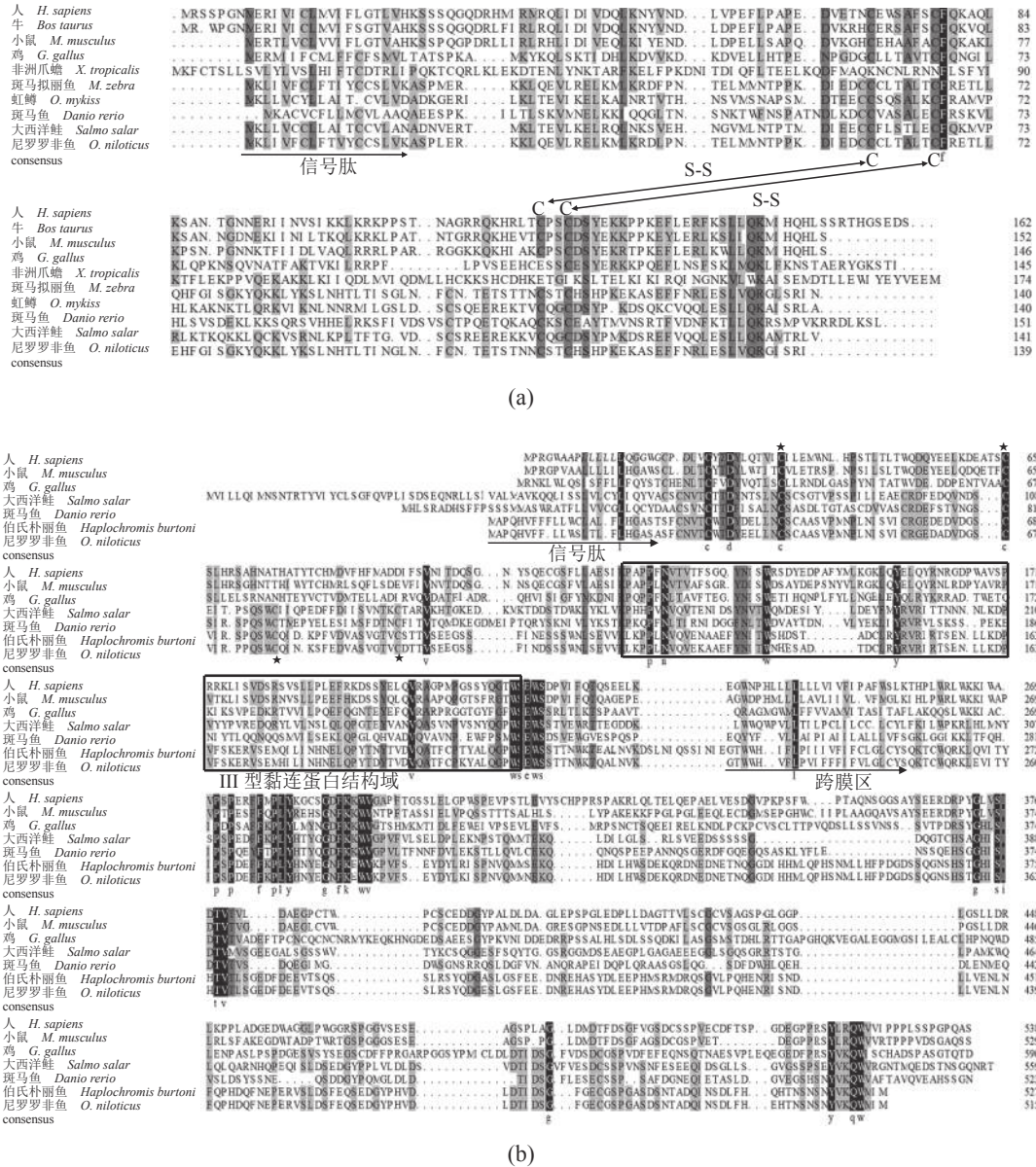


图 2 尼罗罗非鱼 IL-21(a) 和 IL-21R(b) 与其他物种 IL-21 和 IL-21R 的多序列比较

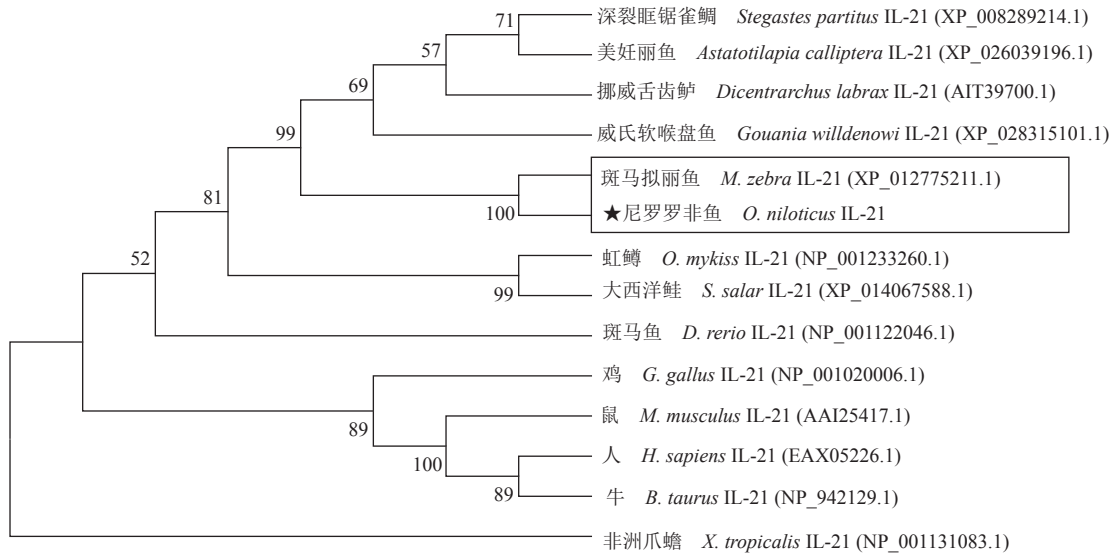
黑色阴影表示一致序列, · 表示缺失氨基酸, 保守的半胱氨酸以*标注, 保守的氨基酸残基和结构域已经特别指出; 物种的 Genbank ID: 人 IL-21(EAX05226.1), 小鼠 IL-21(AAI25417.1), 鸡 IL-21(NP_001020006.1), 非洲爪蟾 IL-21(NP_001131083.1), 牛 IL-21(NP_942129.1), 斑马拟丽鱼 IL-21(XP_012775211.1), 虹鲫 IL-21(NP_001122046.1), 大西洋鲑 (XP_014067588.1), 人 IL-21R(AAH04348.1), 小鼠 IL-21R(AAG29347), 鸡 IL-21R(XP_025010868.1), 伯氏朴丽鱼 IL-21R(XP_005923740.1), 斑马鱼 IL-21R(NP_001106982.2), 大西洋鲑 IL-21R(XP_014059715.1)

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequences of *OnIL-21* (a) and *OnIL-21R* (b)

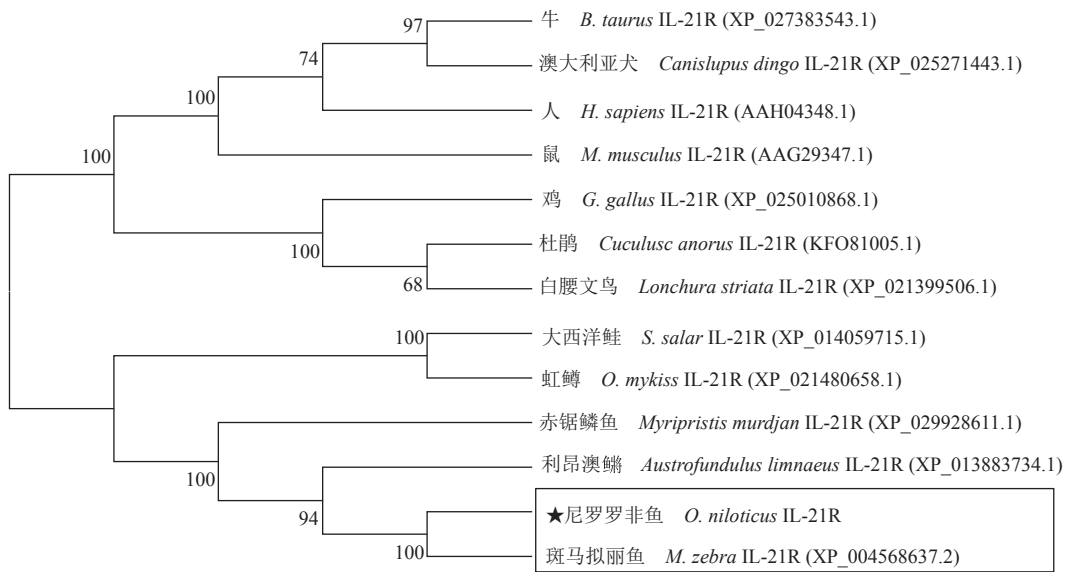
The identical amino acids among different animals are shown with black shadow, and the dot (·) represents missing amino acid; conservative cysteine sites is marked with *, conserved amino acid residues and domains have been specifically identified, *H. sapiens* IL-21 (EAX05226.1), *M. musculus* IL-21 (AAI25417.1), *G. gallus* IL-21 (NP_001020006.1), *X. tropicalis* IL-21 (NP_001131083.1), *Bos taurus* IL-21 (NP_942129.1), *M. zebra* IL-21 (XP_012775211.1), *O. mykiss* IL-21 (NP_001122046.1), *Salmo salar* IL-21 (XP_014067588.1), *H. sapiens* IL-21R (AAH04348.1), *M. musculus* IL-21R (AAG29347), *G. gallus* IL-21R (XP_025010868.1), *Haplochromis burtoni* IL-21R (XP_005923740.1), *Danio rerio* IL-21R (NP_001106982.2), *Salmo salar* IL-21R (XP_014059715.1)

OnIL-21 在被检测的各个组织中均有表达, 其中肝脏中的表达量最高, 心脏次之, 头肾、脾脏和外周血中也有较高水平的表达, 肌肉组织中表达

量最低 (图 4-a)。 *OnIL-21R* 在鳃、脾脏、外周血和胸腺中表达水平较高, 在肠和皮肤中表达量较低, 在肌肉组织中几乎不表达 (图 4-b)。



(a)



(b)

图 3 基于已知物种 IL-21(a) 和 IL-21R(b) 的氨基酸序列构建系统进化树

节点处的数字为 1 000 次引导值中该节点的自举置信水平，星号标记为尼罗罗非鱼 IL-21 和 IL-21R

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on IL-21 (a) and IL-21R (b) amino acid sequences of known species

Numbers at each branch indicate the percentage bootstrap values on 1 000 replicates; the IL-21 and IL-21R of *O. niloticus* are highlighted with asterisks

2.3 体内感染对 *OnIL-21* 和 *OnIL-21R* 分子表达的调控作用

病原菌感染机体后，qRT-PCR 检测尼罗罗非鱼头肾和脾脏免疫器官 *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 的 mRNA 相对表达情况检测。结果显示，无乳链球菌或嗜水气单胞菌感染鱼体后，头肾组织 *OnIL-*

21 的表达水平均出现显著上调，且在 48 h 达到峰值，分别为正常生理状态的 19.5 倍和 16 倍(图 5-a)；脾脏组织 *OnIL-21* 的 mRNA 相对表达量具有类似的变化趋势，在感染后均保持较高水平表达，于 48 h 达到峰值，分别为正常生理状态的 12.5 倍和 14 倍(图 5-b)。*OnIL-21* 的受体，*OnIL-21R* 在无乳

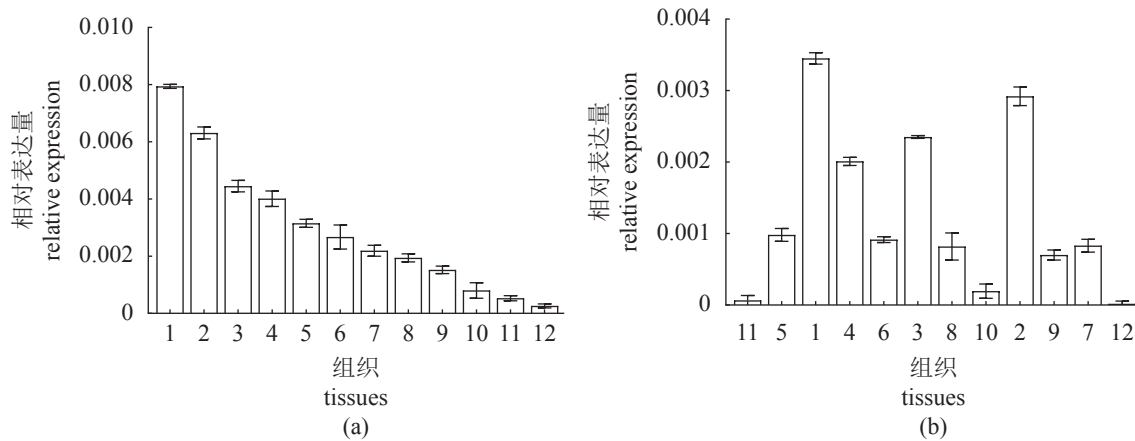


图 4 尼罗罗非鱼 *IL-21*(a) 与 *IL-21R*(b) 在不同健康组织表达水平

1. 皮肤, 2. 心脏, 3. 鳃, 4. 胸腺, 5. 肝脏, 6. 外周血, 7. 头肾, 8. 肠, 9. 脾脏, 10. 胃, 11. 脑, 12. 肌肉

Fig. 4 Constitutive levels of transcription of *OnIL-21* (a) and *OnIL-21R* (b) in healthy tissues

1. skin, 2. heart, 3. gills, 4. thymus, 5. liver, 6. peripheral blood, 7. anterior kidney, 8. intestines, 9. spleen, 10. stomach, 11. brain, 12. muscle

链球菌和嗜水气单胞菌感染 6 h 后, 头肾组织的表达水平出现显著上调, 于 48 h 达到峰值, 为正常生理状态的 8 倍 (图 5-c); 脾脏组织在无乳链球菌和嗜水气单胞菌应激后, *OnIL-21R* 的相对表达量变化趋势与头肾相似, 于 6 h 后 *OnIL-21R* 的表达水平显著上调, 在 48 h 达到峰值, 为正常生理状态的 7.5 倍 (图 5-d)。

2.4 体外应激白细胞对 *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 表达的影响

灭活的无乳链球菌和嗜水气单胞菌应激罗非鱼头肾和脾脏白细胞 3、6、12、24、48 和 72 h 后, 检测细胞 *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 的相对表达变化情况。结果显示, 在头肾白细胞中, 无乳链球菌应激 3 h 后, *OnIL-21* 的表达水平出现显著上调, 其中 12 h 表达水平最高, 为对照组的 12 倍, 12 h 后表达量相对降低, 72 h 表达量为对照组的 3 倍 (图 6-a); 在嗜水气单胞菌应激 3 h 后, *OnIL-21* 的 mRNA 的表达水平出现显著上调, 于 48 h 达到峰值, 为对照组的 16 倍, 48 h 内维持较高水平的表达 (图 6-a)。在脾脏白细胞中, 无乳链球菌和嗜水气单胞菌应激后, *OnIL-21* 的 mRNA 相对表达显著上调, 在 24 h 达到峰值, 分别为对照组的 11.5 倍和 16 倍 (图 6-b)。头肾白细胞中, 无乳链球菌和嗜水气单胞菌应激 48 h 内, *OnIL-21R* 维持较高水平的表达, 于 12 h 达到峰值, 分别为对照组的 6.5 倍和 6 倍 (图 6-c), 而 48 h 后表达量相对下降。脾脏白细胞中, 无乳链球菌和嗜水气单胞菌应激 3 h 后 *OnIL-21R* 的 mRNA 表达水平出现显

著上调, 其中 12 h 达到峰值, 分别为对照组的 4.2 倍和 5.8 倍 (图 6-d)。

2.5 重组蛋白 (r)*OnIL-21* 的表达与纯化

通过原核表达方法构建重组表达质粒 pET32a-*OnIL-21*, 测序结果显示, 重组质粒中含有完整的 *OnIL-21* 成熟肽序列, 且无移码或碱基突变等情况。成功转化重组质粒的 BL21 感受态细胞, 在异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)(Sigma, 美国) 的诱导作用下高效表达重组蛋白。预测 *OnIL-21* 表达蛋白大小约为 13 ku, 而本底表达 Trx 蛋白约为 21 ku, 因此重组蛋白 (r)*OnIL-21* 约为 34 ku。SDS-PAGE 胶图结果显示, 原核系统成功表达了重组蛋白 (r)*OnIL-21*, 大小约为 34 ku, 随后利用 His 标签对重组蛋白进行纯化, SDS-PAGE 电泳对纯化前后产物检测发现纯化效果良好 (图 7)。

2.6 重组蛋白 (r)*OnIL-21* 体外应激对炎症因子表达的影响

对重组蛋白 (r)*OnIL-21* 应激脾脏白细胞后炎症相关细胞因子的表达变化进行检测, 结果表明, 脾脏淋巴细胞在 (r)*OnIL-21* 刺激后, 细胞中的 *IL-21R*、白细胞介素 1 β (*IL-1 β*)、肿瘤坏死因子 α (*TNF- α*)、干扰素 γ (*IFN- γ*)、白细胞介素 6(*IL-6*) 和白细胞介素 10(*IL-10*) 在 mRNA 水平表达量均发生显著上调。其中, (r)*OnIL-21* 刺激 12 h 后, *IL-21R* 的相对表达量出现显著上调, 并在 48 h 内维持较高水平的表达 (图 8-a)。*IL-1 β* 和 *IFN- γ* 在 mRNA 表达水平在应激 24 h 后表达水平达到峰值, 分别

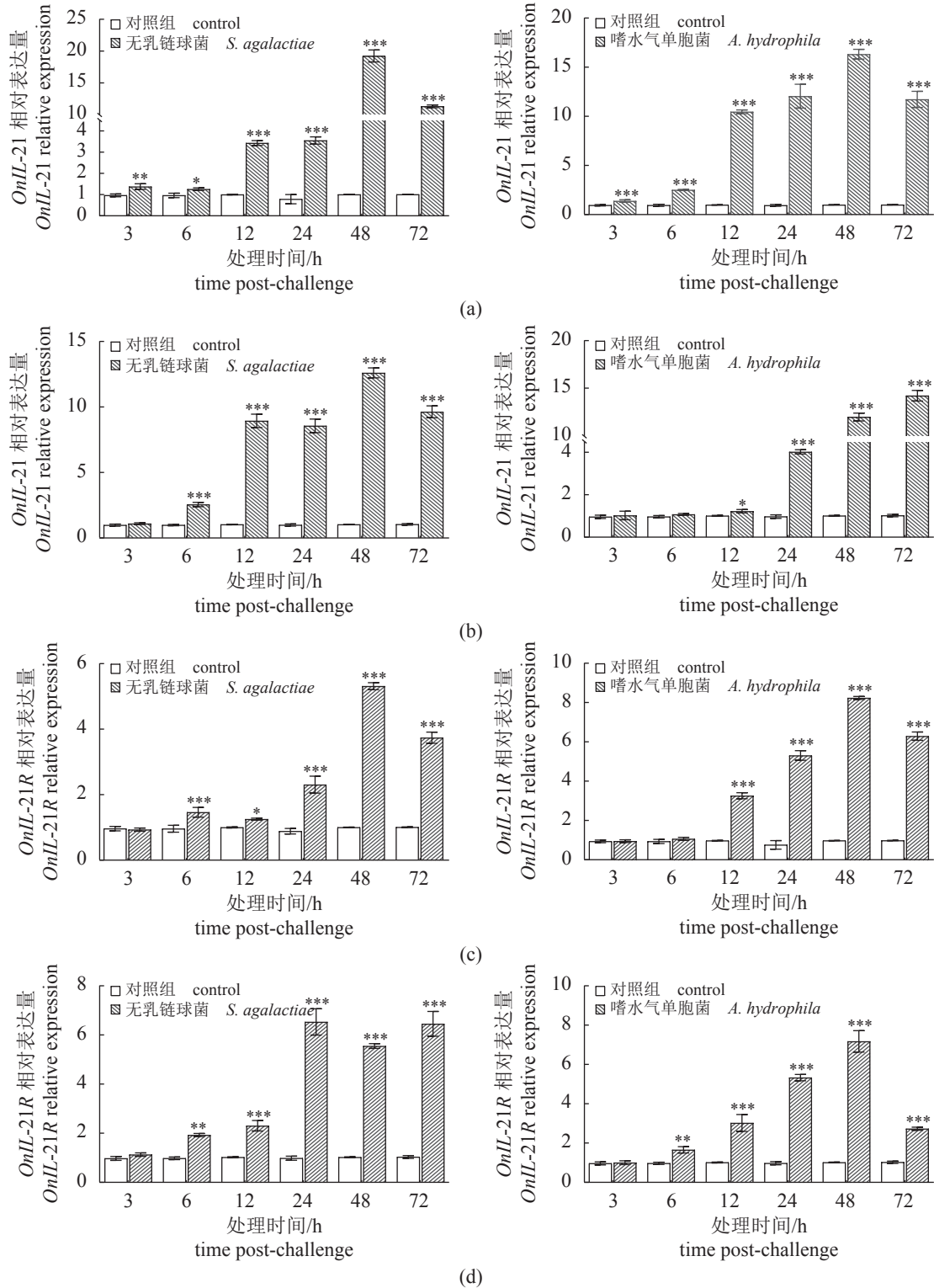


图 5 无乳链球菌和嗜水气单胞菌感染鱼体后 *OnIL-21*(a, b) 和 *OnIL-21R*(c, d) 在头肾和脾脏的 mRNA 表达情况 (a) 头肾, (b) 脾脏, (c) 头肾, (d) 脾脏; 数据用平均值±标准误表示 (n=9); 图中*代表实验组与对照组的显著性差异, **P*< 0.05, ***P*< 0.01, ****P*< 0.001; 下同

Fig. 5 mRNA expression patterns of *OnIL-21* (a, b) and *OnIL-21R* (c, d) in spleen and anterior kidney after *S. agalactiae* and *A. hydrophila* challenge

(a) anterior kidney, (b) spleen, (c) anterior kidney, (c) spleen; all data are shown as mean ± SE (n = 9); asterisks indicate a significant difference between the control group and the challenge group. **P*< 0.05, ***P*< 0.01, ****P*< 0.001; the same below

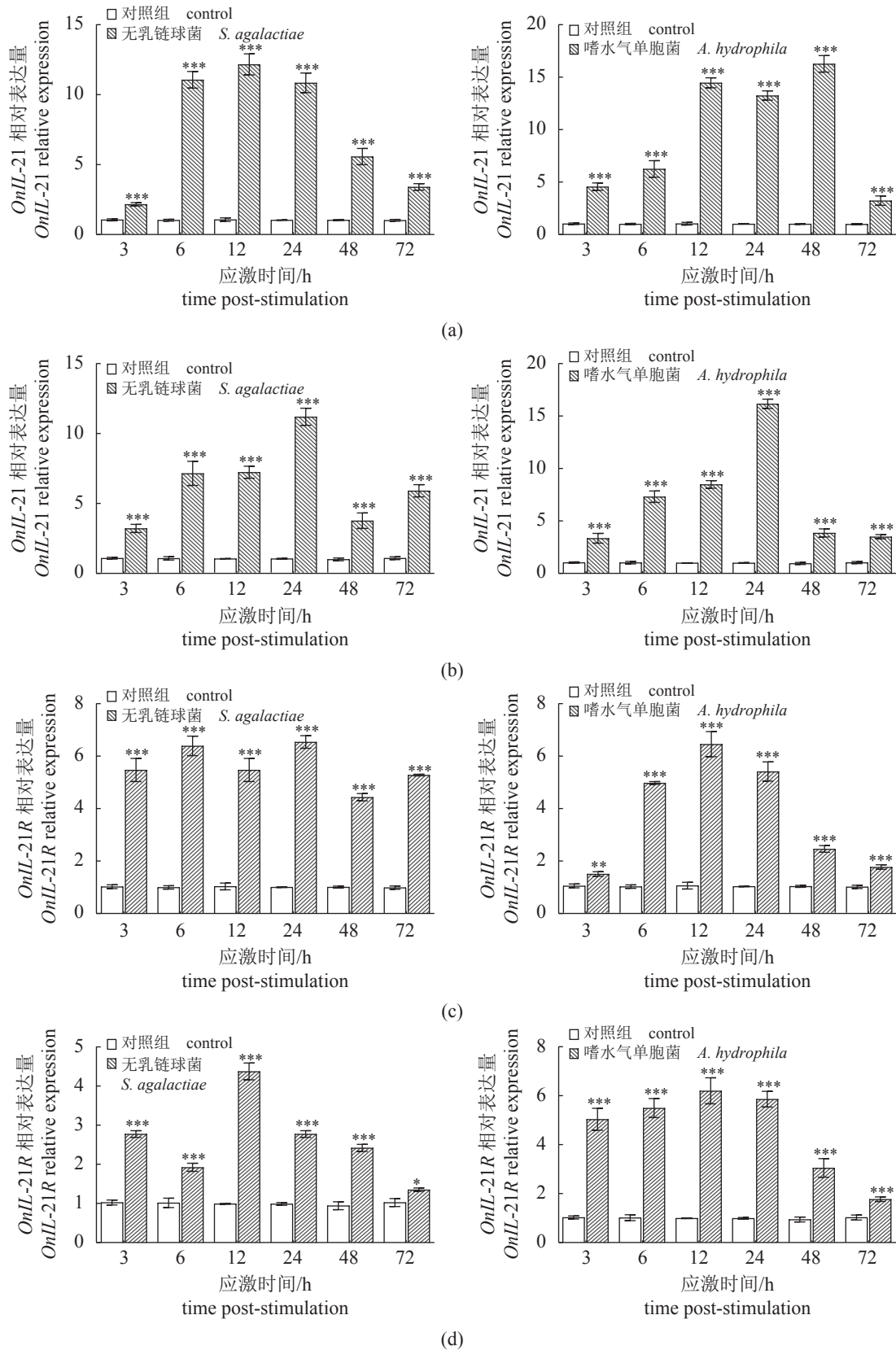


图 6 无乳链球菌和嗜水气单胞菌对尼罗罗非鱼头肾和脾脏白细胞 *OnIL-21*(a, b) 和 *OnIL-21R*(c, d) 表达的影响

Fig. 6 The effects of *S. agalactiae* and *A. hydrophila* stimulation on the mRNA expression of *OnIL-21* (a, b) and *OnIL-21R* (c, d) in anterior kidney and spleen leukocytes

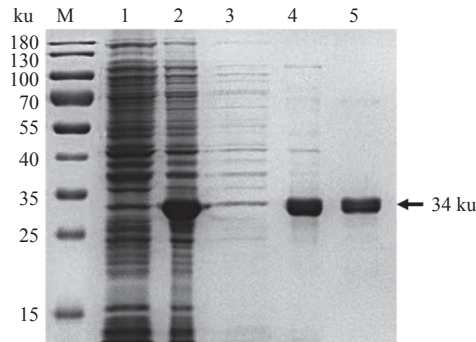


图7 重组蛋白(r)OnIL-21表达与纯化

M. 蛋白分子量标准, 1. 诱导前, 2. 诱导后, 3. 上清, 4. 沉淀, 5. 纯化后

Fig. 7 Expression and purification of (r)OnIL-21

M. protein marker; 1. the bacteria before IPTG induced; 2. the bacteria induced with 1 mmol/L IPTG at 37 °C for 6 h; 3. the soluble fractions after bacteria disruption; 4. the insoluble fractions after bacteria disruption; 5. the purified IL-21 fusion

为对照组的 11.5 倍(图 8-c)和 12 倍(图 8-d); *IL-6* 的 mRNA 表达水平在 48 h 后表达水平最高, 为对照组的 7 倍(图 8-e); *TNF- α* 在 (r)OnIL-21 应激 12 h 后表达水平达到峰值, 为对照组的 11.5 倍, 12 h 后相对表达量逐渐降低(图 8-b); *IL-10* 的相对表达量在应激 12 h 后显著上调, 并且持续上调, 在 48 h 表达水平高达对照组 16.5 倍(图 8-f)。

3 讨论

白细胞介素 IL-21 是一种多效性细胞因子, 与细胞表面的高亲和力受体结合后, 引起细胞和组织多种反应, 调节炎症和免疫反应期间免疫细胞的生长、分化和活化等, 在机体的先天性免疫和获得性免疫中发挥着重要作用^[14]。目前, IL-21 及其受体的相关研究主要集中在哺乳动物, 在鱼类中的研究相对较少, 而关于罗非鱼 IL-21 及其受体 IL-21R 的研究至今尚未见报道。

本实验率先在尼罗罗非鱼中克隆得到 *IL-21* 及受体基因 *IL-21R* 的 cDNA 序列, 并对序列进行了生物信息学分析。跨膜结构域分析预测结果显示 OnIL-21 是一个分泌型蛋白, 其氨基酸序列中存在着多个预测的蛋白激酶磷酸化位点和糖基化位点(图 1)。研究表明, 蛋白磷酸化能够高效调控自身在细胞膜上的快速插入(或解离)而调节其转运能力, 增强自身活性和信号的转导^[15], OnIL-21 氨基酸序列中存在多个预测的 N-糖基化位点, 对蛋白质翻译后修饰和维持蛋白的结构和功能可能发挥重要作用。此外, OnIL-21 氨基酸序列中具

有多个保守的半胱氨酸残基, 对于自身形成二硫键, 维持蛋白空间结构起到重要作用(图 2-a)。IL-21R 是 IL-21 的功能受体, 由特异的 IL-21 配体识别亚单位和 γ -c 信号传导亚单位组成^[2]。尼罗罗非鱼 IL-21R 胞外区包含多个 N-糖基化位点和 1 段 I 型细胞因子受体家族特有的 WSXWS 高度保守基序(图 2-b), 这是形成 γ -c 链所必需的^[16]。IL-21 与 γ -c 亚基结合可使 γ -c 亚基活化而激活相关信号通路, 如酪氨酸激酶信号转导子和转录激活子途径 (JAK-STAT)、丝裂原蛋白活化激酶途径 (MAPK)、磷脂酰肌醇 3 激酶途径 (PI3K) 等, 从引起下游一系列信号变化促使 IL-21 发挥生物学功能^[17]。此外, OnIL-21R 氨基酸序列具有 2 个 III 型黏连蛋白结构域 (D1 / D2), 可组成 V 型结构, V 型结构底部可能是其配体 OnIL-21 结合的区域。系统进化树结果显示, OnIL-21 及 OnIL-21R 均与斑马拟丽鱼亲缘关系最近, 且硬骨鱼类、哺乳类和两栖类的 IL-21 及 IL-21R 均各自聚为一支。以上蛋白结构和同源性分析均表明, 尼罗罗非鱼 IL-21 与其受体 IL-21R 在进化程度上具有一定的保守性, 推测 *IL-21* 与 *IL-21R* 基因在不同物种间可能发挥相似的生物学功能。

qRT-PCR 检测发现, *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 在健康尼罗罗非鱼的多种组织中均有表达, 但具有明显的组织差异性。其中, *OnIL-21* 在各个组织中均有较高水平的表达(图 4-a), 分布情况与其他鱼类和哺乳动物中的研究结果基本一致^[12,18]。在哺乳动物中, IL-21R 广泛分布于脾脏、胸腺、外周血和淋巴结等淋巴组织中, 另外淋巴组织含有大量的 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞等重要免疫细胞类群, 表明其配体 IL-21 对机体的细胞免疫和体液免疫均具有调节作用^[19-21]。在尼罗罗非鱼中, *OnIL-21R* 也在多种组织中广泛表达, 其中在鳃中表达量最高, 在脾脏、胸腺、头肾和外周血等重要免疫组织均有较高的表达(图 4-b)。OnIL-21R 分布的广泛性提示了 OnIL-21 生物学效应的多样性和 OnIL-21R 在先天免疫系统和适应性免疫系统中信号传导的重要作用。

头肾和脾脏是硬骨鱼重要的免疫器官, 在先天性免疫和获得性免疫中发挥着重要的作用^[22-23]。为探究外来病原菌感染后, *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 是否参与尼罗罗非鱼抵御病原菌感染的免疫反应, 实验开展无乳链球菌和嗜水气单胞菌体内感染实验, 检测头肾和脾脏 *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 的 mRNA

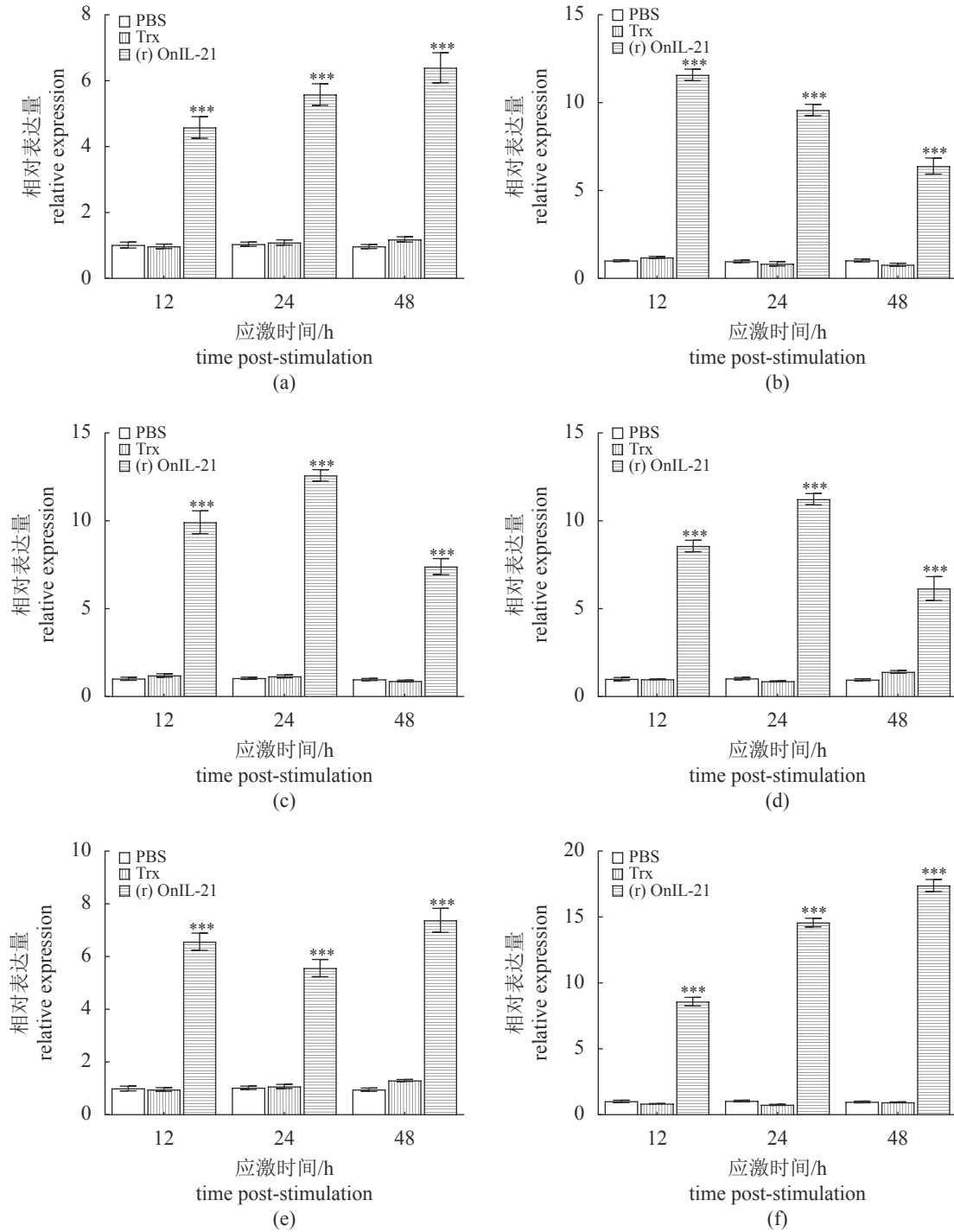


图 8 重组 OnIL-21 蛋白应激脾脏白细胞 IL-21 和相关炎症因子的表达变化

(a) OnIL-21R, (b) TNF-α, (c) IL-1β, (d) IFN-γ, (e) IL-6, (f) IL-10; 数据用平均值±标准误表示 (n=9); 图中*代表实验组与对照组的显著性差异, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

Fig. 8 Effect of (r)OnIL-21 stimulation of spleen leukocytes on IL-21R and inflammation-related cytokine expression at different time

(a) OnIL-21R; (b) TNF-α; (c) IL-1β; (d) IFN-γ; (e) IL-6; (f) IL-10; all data are shown as mean ± SE (n = 9); asterisks indicate a significant difference between the control group and the stimulation group. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

的动态表达变化。结果表明, 2 种不同的病原菌感染鱼体后, 头肾和脾脏中的 *OnIL-21* 及 *OnIL-*

21R mRNA 相对表达量均发生显著变化, 在 72 h 内维持较高的表达水平(图 5), 即病原体感染尼罗

罗非鱼后能够明显促进机体内 *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 的表达, 表明 *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 参与机体抵御病原菌感染的免疫应答反应且可能发挥着重要作用。进一步研究 *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 在尼罗罗非鱼抵御病原菌感染中所起的作用, 用灭活的无乳链球菌和嗜水气单胞菌体外应激头肾和脾脏白细胞后, 检测 *OnIL-21* 和 *OnIL-21R* 的表达, 结果显示, 不同病原菌应激后, 头肾和脾脏白细胞中 *OnIL-21* 和 *OnIL-21R* 的表达均显著上调 (图 6), 进一步说明了 *OnIL-21* 及 *OnIL-21R* 在尼罗罗非鱼机体病原菌感染的免疫应答过程发挥着重要作用。值得注意的是, 在哺乳动物的相关研究中, *IL-21R* 是作为 *IL-21* 的专一性功能受体发挥作用。在尼罗罗非鱼体内应激过程中, *OnIL-21* 的表达在应激 12 h 内便出现显著上调, 而 *OnIL-21R* 的表达出现显著上调的时间相对延迟, 可能暗示着 *OnIL-21R* 是作为 *OnIL-21* 的功能受体发挥作用。机体在感染早期, 先天性免疫系统相对于获得性免疫系统能更快地发挥抵御作用, 在本研究中, *OnIL-21* 和 *OnIL-21R* 的表达在机体感染早期发生显著上调, 并且在 72 h 仍维持较高水平的表达, 表明 *IL-21* 作为一种多效性细胞因子, 可能在固有免疫和适应性免疫中都发挥着重要作用。

在哺乳动物中, *IL-21* 是一个多效性调节因子, 具有广泛的免疫调节功能, 如活化 Th1 淋巴细胞, 上调 *TNF- α* 和 *IFN- γ* 等细胞因子的分泌, 增强细胞毒活性, 促进 B 细胞的增殖和分化等^[19,24], 在炎症的起始和应答过程中发挥着重要作用。在硬骨鱼中, 有研究报道 *IL-21* 能够通过调节相关细胞因子的表达参与机体的炎症反应, 如虹鳟 *IL-21* 可以诱导头肾白细胞中 *IFN- γ* 、*IL-10* 和 *IL-22* 的快速和持久表达^[12], 另外牙鲆 *IL-21* 可以诱导炎症反应, 在机体对病原菌的免疫防御中发挥重要作用^[25]。为了研究 *OnIL-21* 在免疫系统中参与的炎症反应, 我们利用原核表达系统成功获得的重组蛋白 (r)*OnIL-21* 进行体外应激脾脏白细胞, 并检测相关炎症因子的表达。结果发现, 在 (r)*OnIL-21* 刺激后, 白细胞中的 *IL-21R*、*IL-1 β* 、*TNF- α* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *IL-10* 的 mRNA 表达均发生显著上调 (图 8), 表明 *OnIL-21* 可能通过其受体基因 *OnIL-21R* 参与机体的炎症反应, 从而在免疫应答中发挥作用。此外, 研究发现, 在哺乳动物中, *IL-21* 是诱导 B 细胞分化的有效细胞因子^[26]。*IL-21R* 以 α 和 γ 2 条链形成的同源二聚体位于 B

细胞表面, 该受体受 *IL-21* 及共刺激分子作用后, 主要激活 B 细胞下游 JAK/STAT 信号通路, 诱导 B 细胞增殖分化和免疫球蛋白产生^[27], 并且可以刺激 B 细胞在感染早期表达和分泌颗粒酶而获得细胞毒性的新功能^[28]。在鱼类中, 现有的研究表明 *IL-21* 可以促进 *IgM⁺* B 细胞增殖和 *IgM* 的分泌^[29], 关于鱼类 *IL-21* 参与调控 B 细胞功能的免疫应答机制和相关信号通路值得深入探究。

综上所述, 本研究系统分析了尼罗罗非鱼 *IL-21* 及其受体 *IL-21R* 的序列结构特点、组织表达差异性、病原菌应激后的表达模式以及在免疫系统中参与的炎症反应中的影响, 初步阐明了 *IL-21* 与 *IL-21R* 参与了机体病原菌感染的免疫应答过程, 为进一步探究 *IL-21* 与 *IL-21R* 调控机体免疫反应的信号通路和作用机制提供了重要参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Benigni F, Fantuzzi G, Sacco S, et al. Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1[J]. *Blood*, 1996, 87(5): 1851-1854.
- [2] Parrish-Novak J, Dillon S R, Nelson A, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function[J]. *Nature*, 2000, 408(6808): 57-63.
- [3] Yi J S, Cox M A, Zajac A J. Interleukin-21: a multifunctional regulator of immunity to infections[J]. *Microbes and Infection*, 2010, 12(14-15): 1111-1119.
- [4] Mehta D S, Wurster A L, Grusby M J. Biology of *IL-21* and the *IL-21* receptor[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 202(1): 84-95.
- [5] Chen B, Liu Y, Zhang Y Q, et al. *IL-21* is positively associated with intervertebral disc degeneration by interaction with *TNF- α* through the JAK-STAT signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2017, 40(2): 612-622.
- [6] Spolski R, Leonard W J. Interleukin-21: Basic biology and implications for cancer and autoimmunity[J]. *Annual Review of Immunology*, 2008, 26: 57-79.
- [7] Bird S, Zou J, Kono T, et al. Characterisation and expression analysis of interleukin 2 (*IL-2*) and *IL-21* homologues in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*, following their discovery by synteny[J]. *Immunogenet-*

- ics, 2005, 56(12): 909-923.
- [8] 薛婷婷, 郑津辉, 周密, 等. 褐牙鲷白细胞介素21基因克隆及表达分析[J]. *水产科学*, 2020, 39(2): 151-159. Xue T T, Zheng J H, Zhou M, *et al.* Cloning and expression of interleukin 21 gene in bastard halibut *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fisheries Science*, 2020, 39(2): 151-159 (in Chinese).
- [9] Gan Z, Wang B, Lu Y S, *et al.* Molecular characterization and expression of Lck in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to *Streptococcus agalactiae* stimulus[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(5): 2376-2389.
- [10] Gao A L, Li L, Yan F F, *et al.* Nile tilapia CXCR4, the receptor of chemokine CXCL12, is involved in host defense against bacterial infection and chemotactic activity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 114: 103836.
- [11] Mu L L, Yin X X, Liu J, *et al.* Identification and characterization of a mannose-binding lectin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 244-253.
- [12] Wang T H, Diaz-Rosales P, Costa M M, *et al.* Functional characterization of a nonmammalian IL-21: rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* IL-21 upregulates the expression of the Th cell signature cytokines IFN- γ , IL-10, and IL-22[J]. *Journal of Immunology*, 2011, 186(2): 708-721.
- [13] 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.
- [14] Tohid, Gharibi, Jafar, *et al.* Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases[J]. *Immunobiology*, 2016, 221(2): 357-367.
- [15] Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses[J]. *The FASEB Journal*, 1995, 9(7): 484-496.
- [16] Rochman Y, Spolski R, Leonard W J. New insights into the regulation of T cells by γ_c family cytokines[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(7): 480-490.
- [17] Asao H, Okuyama C, Kumaki S, *et al.* The common γ -chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex[J]. *Journal of Immunology*, 1950, 167(1): 1-5.
- [18] Wurster A L, Rodgers V L, Satoskar A R, *et al.* Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon γ -producing Th1 cells[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2002, 196(7): 969-977.
- [19] Coquet J M, Kyparissoudis K, Pellicci D G, *et al.* IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 178(5): 2827-2834.
- [20] Monteleone G, Pallone F, Macdonald T T. Interleukin-21 (IL-21)-mediated pathways in T cell-mediated disease[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009, 20(2): 185-191.
- [21] Konforte D, Simard N, Paige C J. IL-21: an executor of B cell fate[J]. *Journal of Immunology*, 1950, 182(4): 1781-1787.
- [22] Geven E J W, Klaren P H M. The teleost head kidney: integrating thyroid and immune signalling[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 66: 73-83.
- [23] Bromage E S, Kaattari I M, Zwollo P, *et al.* Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues[J]. *The Journal of Immunology*, 2004, 173(12): 7317-7323.
- [24] Akamatsu N, Yamada Y, Hasegawa H, *et al.* High IL-21 receptor expression and apoptosis induction by IL-21 in follicular lymphoma[J]. *Cancer Letters*, 2007, 256(2): 196-206.
- [25] Yu C, Zhang P, Li X P, *et al.* Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* interleukin 21 induces inflammatory response and plays a vital role in the immune defense against bacterial pathogen[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 364-373.
- [26] Konforte D, Paige C J. Identification of cellular intermediates and molecular pathways induced by IL-21 in human B cells[J]. *The Journal of Immunology*, 2006, 177(12): 8381-8392.
- [27] Wu Y K, Van Besouw N M, Shi Y Y, *et al.* The biological effects of IL-21 signaling on B-cell-mediated responses in organ transplantation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 319.
- [28] Hagn M, Schwesinger E, Ebel V, *et al.* Human B cells secrete granzyme B when recognizing viral antigens in the context of the acute phase cytokine IL-21[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 183(3): 1838-1845.
- [29] Cui Z W, Zhang X Y, Chen X H, *et al.* Splicing variants of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) IL-21: functions in IgM⁺ B cell proliferation and IgM secretion[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 110: 103728.

Identification and expression analysis of interleukin 21 (IL-21) and its receptor (IL-21R) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

LI Lan, GAO Along, CHEN Jianlin, LEI Yang, WU Liting*, YE Jianmin*

(Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, Institute of Modern Aquaculture Science and Engineering, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Interleukin 21 (IL-21) is a kind of pleiotropic cytokine, mainly through its specific receptor (IL-21R) to exercise immunomodulatory function, including promoting T cells proliferation, regulating B cells differentiation and enhance the cytotoxicity of natural killer cells (NK), and play an important role in the immune response to pathogen infection. In order to study the role of IL-21 and its receptor IL-21R in the immune response of fish against pathogenic bacteria, homologs of IL-21 and IL-21R in *Oreochromis niloticus* were identified, and their roles in bacterial infection and the regulation of inflammatory response were investigated. The open reading frame of *OnIL-21* and *OnIL-21R* are 420 bp and 1 548 bp, encoding 139 and 515 amino acids, respectively. The deduced OnIL-21 is a secreted protein containing an Ig-like domain. OnIL-21R is a transmembrane protein, contains two conserved cysteine residues, a FNIII domain and a highly conserved WSXWS motif of the type I cytokine receptor family. Both OnIL-21 and OnIL-21R contained multiple conserved phosphorylation sites and glycosylation sites. Expression analysis indicate that the *OnIL-21* exhibited constitutive expression in the examined tissues, with the highest expression in skin. *OnIL-21R* was also widely expressed in multiple tissues, with the highest expression in gill and spleen. In addition, the *OnIL-21* and *OnIL-21R* expressions are significantly up-regulated in spleen and anterior kidney following challenges of *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas hydrophila* *in vivo* and *in vitro*, and maintained high expression level within 72 h, which suggested that *OnIL-21* and *OnIL-21R* may get involved in host defense against bacterial infection. Further, after being stimulated with recombinant protein (r)OnIL-21 *in vitro*, the expressions of *OnIL-21R* and inflammation-related cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 10 (IL-10) were up-regulated significantly in spleen lymphocytes, which indicated that *OnIL-21* and *OnIL-21R* may play an important role in immune response. Taken together, the molecular biological characteristics of *OnIL-21* and its receptor *OnIL-21R* were described systematically. It also preliminarily clarified that *OnIL-21* and *OnIL-21R* were likely involved in host defense against bacterial infection and may have an important effect on the inflammation response of *O. niloticus*, which may provide an important reference for further exploring the mechanism and signaling pathway of IL-21 regulating the immune response of the inflammatory responses through its specific receptor IL-21R.

Key words: *Oreochromis niloticus*; IL-21; IL-21R; gene cloning; immune response

Corresponding authors: WU Liting. E-mail: ltingwu@m.scnu.edu.cn;

YE Jianmin. E-mail: jmye@m.scnu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31972818); China Postdoctoral Science Foundation (2019M662959)