

文章编号: 1000-0615(2017)07-1028-08

DOI: 10.11964/jfc.20160210278

## IL-8在LPS诱导的草鱼炎症过程中的表达特征

柳昭君, 赵杰, 卜云璇, 肖兰莹, 时凯丽, 宋学宏\*

(苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123)

**摘要:** 采用原核表达获得草鱼白细胞介素-8(IL-8)重组蛋白, 并以腹腔与皮下组织交替注射的方法免疫小鼠, 制备抗草鱼IL-8的多克隆抗体。采用免疫印迹(Western blot)和酶联免疫吸附(ELISA)技术检测抗体的特异性与效价, 运用流式细胞术分析健康草鱼及细菌脂多糖(LPS)刺激后草鱼各免疫相关组织中IL-8的表达特征。结果显示, 草鱼IL-8多克隆抗体效价可达1:40 000。健康草鱼的胸腺、头肾、肝脏、肠道、鳃、脾脏、体肾等组织均表达IL-8蛋白, 其中, 头肾和鳃中表达量较高。LPS刺激后, 各组织IL-8蛋白表达量均显著升高, 其中, 肠道、肝脏、肾脏在LPS刺激4 h后IL-8蛋白上调达最高峰, 头肾、脾脏、鳃于LPS刺激后12 h时表达量最高, 胸腺则在24 h时达最高峰。研究表明, IL-8参与了草鱼炎症应答; IL-8表达量的升高, 可作为早期炎症监测指标, 应用于养殖鱼类炎症性疾病的预警指标。

**关键词:** 草鱼; 白细胞介素-8; 多克隆抗体; 细菌脂多糖; 组织表达; 炎症应答

**中图分类号:** Q 785; S 941

**文献标志码:** A

白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)是一种多源性趋化细胞因子, 由白细胞介素-1(IL-1)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)诱导中性粒细胞、T细胞、嗜酸性粒细胞、成纤维细胞、上皮细胞等产生<sup>[1-2]</sup>。目前, 鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、鲫(*Carassius auratus*)、花鲈(*Lateolabrax maculatus*)、黑线银鲛(*Chimaera phantasma*)、黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)等多种鱼类的IL-8及其受体基因已被分离鉴定<sup>[3-9]</sup>。2008年, Harun等<sup>[10]</sup>利用原核表达的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)重组IL-8蛋白, 首次分析了鱼类重组IL-8蛋白的功能。迄今, 基于重组表达技术, 已对黑鲷、鲤、赤虹(*Dasyatis akajei*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等多种硬骨鱼类的IL-8蛋白进行了功能分析, 发现不同鱼类重组IL-8蛋白在促进细胞迁移、炎症发生和引发呼吸爆发等方面发挥着关键的作用<sup>[11-14]</sup>。但到目前为止, 鱼类组织IL-8蛋

白的识别以及炎症发生前后IL-8蛋白的表达差异分析研究相对较少。

先前的研究曾克隆了草鱼IL-8(gcIL-8)基因, 并证实了原核表达的重组草鱼IL-8蛋白(rcIL-8)具有趋化活性<sup>[9]</sup>。在此基础上, 本实验通过腹腔与皮下组织交替免疫的方法获得草鱼IL-8多克隆抗体, 应用流式细胞术检测健康或经细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导后的草鱼各组织中IL-8蛋白的表达情况, 为探讨草鱼炎症反应的发生机制提供基础数据, 也为炎症性疾病的早期诊断提供思路。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

实验用草鱼为江苏省草鱼良种基地苏州市吴江区水产养殖场提供的健康草鱼种。规格为(30±5) g, 暂养于直径75 cm、水深60 cm的28 °C恒温水族箱中, 并间歇式充氧, 每天投喂商品

收稿日期: 2016-02-03 修回日期: 2016-09-04

资助项目: 江苏省自然科学基金(BK2011285); 苏州市应用基础(SYN201505)

通信作者: 宋学宏, E-mail: songxh@suda.edu.cn

草鱼饲料, 投喂量为体质量的1%, 每天换水1次, 每次更换约1/3体积水量。

6周龄的雌性BALB/c小鼠, 购自苏州大学实验动物中心。每天投喂商业鼠饲料, 每天更换垫料以保持其自身干净, 防止病原物污染。

## 1.2 草鱼IL-8的原核表达与蛋白纯化

将本实验室先前构建的pET32a(+)-IL-8重组质粒<sup>[9]</sup>, 转化大肠杆菌BL21表达菌株, IPTG诱导表达; 经SDS-PAGE法验证诱导表达效果后, 采用割胶回收、电洗脱纯化rgcIL-8, BCA法测蛋白浓度, SDS-PAGE法进行蛋白纯度分析。

## 1.3 鼠抗草鱼IL-8多克隆抗体的制备

以纯化的rgcIL-8为抗原, 免疫4只6周龄的BALB/c小鼠, 免疫前眼静脉取血, 作为后续实验对照。采取腹腔注射与皮下多点注射交替的方式进行免疫, 共免疫4次, 间隔时间为3周, 每次每只小鼠免疫剂量为50~100 μg抗原。第一、二次分别将抗原与弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂等体积混合并乳化后免疫, 第三、四次免疫纯抗原。第四次免疫小鼠后7 d, 眼静脉采血, 采用双向免疫扩散法<sup>[15]</sup>初步鉴定血清抗体的纯度与效价, 达到预定效价后摘眼球取血, 采集的血液经4 °C静置过夜后, 6500 r/min离心30 min, 收集上清, 分装后于-80 °C保存。

## 1.4 Western blot检测抗体的特异性

分别将含rgcIL-8、载体蛋白(Trx)的大肠杆菌BL21菌体蛋白进行SDS-PAGE电泳并转膜, 依次加入鼠抗草鱼IL-8抗血清(1:500稀释)、羊抗鼠IgG-HRP (Bioworld公司)、DAB (Solarbio公司)显色后观察结果。同时, 分别将抗血清与Trx总蛋白、纯化的rgcIL-8蛋白预结合后, 再次进行Western blot检测, 检测其特异性。

## 1.5 间接ELISA检测抗体的效价

用0.05 mol/L的pH 9.6碳酸盐包被缓冲液稀释纯化的rgcIL-8蛋白为抗原包被溶液, 采用棋盘滴度法将rgcIL-8蛋白稀释为9、3、1、0.33、0.11 μL/mL, 包被于96孔酶标板(Corning公司), 每孔100 μL。4 °C过夜后用0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)洗涤2次, 用含5%脱脂奶粉的PBS-0.05%Tween 20封闭, 每孔350 μL, 37 °C; 2 h, PBST洗涤3次。用PBS稀释正常血清(1:5000)和抗血清(分别按1:5000、1:10000、1:20000、1:40000、

1:80000倍比稀释)作为一抗, 羊抗鼠IgG-HRP (Bioworld公司, 用PBS 1:500稀释)为二抗, 37 °C依次湿孵, 加入底物邻苯二胺(Solarbio公司)和显色液避光显色, 每次每孔100 μL试剂, 最后每孔加入50 μL的2 mol/L硫酸(国药集团化学试剂有限公司)终止反应, 酶标仪(Biotek公司)测定490 nm处吸光值, 并计算出阳性血清与阴性血清之比P/N值。其公式为:  $P/N = (\text{抗血清OD} - \text{空白对照OD}) / (\text{阴性对照血清OD} - \text{空白对照OD})$ , 当 $P/N \geq 2.1$ 时, 检测结果呈阳性。

## 1.6 流式细胞术分析草鱼相关组织细胞IL-8表达量的变化

向(30±5) g的草鱼腹腔注射LPS (Sigma公司, 货号: Sigma-L2880)(10 μg/尾), 注射后4 h、12 h和24 h分别采集脾脏、肝脏、肠道、体肾、胸腺、鳃、头肾组织, 剪碎组织并用细胞过滤器(Bioworld公司)过滤, 制备单细胞悬液, 以未注射的健康草鱼相应组织制备单细胞悬液作为对照。单细胞悬液经PBS洗涤2~3次后重悬, 血球计数板计数, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^7$  个/mL。处理组和对照组均设置3个平行。

分别取上述细胞悬液离心收集细胞, 4%多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司)固定, 0.1% Triton X-100(Sigma公司)增加渗透性, 10%胎牛血清(Gibco公司)封闭非特异性抗体结合部位。然后依次加入PBS稀释的一抗(分别为抗血清、正常血清, 稀释度均为1:2000, 并以PBS为空白对照)、羊抗鼠IgG-FITC (Bioworld公司, 稀释至1:100)孵育。离心洗涤2次, 将细胞重悬于PBS中, 上流式细胞仪(Becton Dickinson公司)检测。

## 1.7 数据分析

以SPSS 13.0软件的One-Way ANOVA统计分析数据, 统计显著水平为 $P < 0.05$ , 极显著水平为 $P < 0.01$ , GraphPad Prism 5.0软件作柱状图。

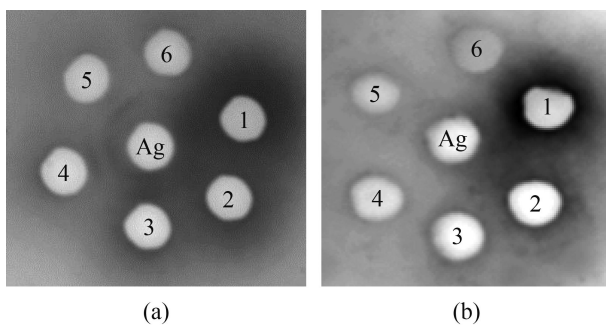
## 2 结果

### 2.1 抗草鱼IL-8抗体的特异性

用PBS对抗血清进行倍比稀释, 采用双向免疫扩散法检测抗血清(抗rgcIL-8抗体)的特异性(图1)。结果显示, 在抗原抗体加样孔之间出现两条沉淀线(图1-a), 一条沉淀线靠近抗原孔, 终止于1:64抗血清孔, 说明抗IL-8抗体效价较

高；另一沉淀线靠近抗体孔，终止于1:32抗血清孔，显示效价相对较低。造成两条沉淀线的可能原因是，SDS-PAGE电泳凝胶回收rgcIL-8时可能掺入少量杂蛋白，以该蛋白为免疫原免疫小鼠后，可能产生除IL-8抗体外的其他抗体。与抗血清的检测结果不同，用PBS倍比稀释后的不同浓度正常血清均未形成沉淀线(图1-b)。因而，本研究制备的抗草鱼IL-8多抗的特异性与效价均较高。

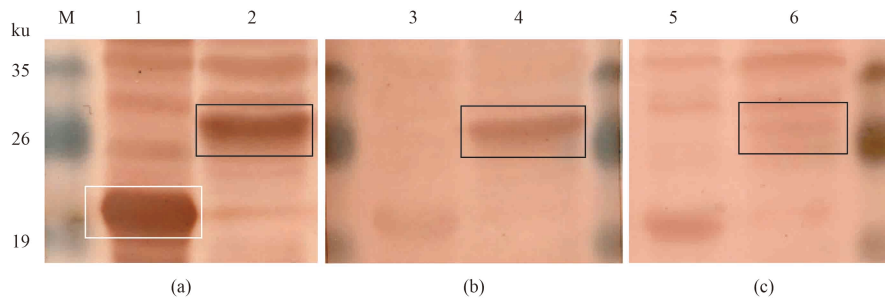
Western blot检测结果显示，以制备的抗血清作为一抗时，能分别检测到pET32a(+)-IL-8及



**图1** 双向免疫扩散法测定抗rgcIL-8抗体的特异性  
(a)抗血清；(b)正常血清。Ag: 抗原溶液(纯化的rgcIL-8)；孔1-6分别含1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64倍比稀释的血清溶液

**Fig. 1** Double-immunodiffusion assay for detecting anti-rgcIL-8 antibody

The central wells (Ag) contain antigen solution (purified rgcIL-8), wells 1-6 contain serum solution by serial twofold dilution at 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, respectively. (a) antiserum; (b) normal serum



**图2** Western blot鉴定抗rgcIL-8抗体的特异性

(a)抗血清处理组；(b)Trx蛋白与抗血清预结合后的处理；(c)rgcIL-8蛋白与抗血清预结合后的处理。泳道1、3、5，IPTG诱导的含空载体pET32a(+)-IL-8的大肠杆菌BL21表达产物；泳道2、4、6，IPTG诱导的含pET32a(+)-IL-8的大肠杆菌BL21表达产物。黑色和白色长方形框分别表示rgcIL-8蛋白和Trx蛋白

**Fig. 2** Western blot analysis for determining the specificity of anti-rgcIL-8 antibody

(a) Treatment with antiserum alone; (b) Treatment with antiserum pre-incubated with total Trx protein; (c) Treatment with antiserum pre-incubated with rgcIL-8 protein. Lanes 1, 3 and 5, IPTG-induced lysate from *E. coli* BL21 carrying empty pET32a(+)-IL-8; Lanes 2, 4 and 6, IPTG-induced lysate from *E. coli* BL21 carrying recombinant construct pET32a(+)-IL-8. The bands of rgcIL-8 and Trx proteins are indicated in black and white rectangle boxes, respectively

pET32a(+)-IL-8诱导表达的产物rgcIL-8(约28 ku)和Trx(约22 ku)(图2-a)，但也存在较浅的杂带，表明该抗血清除含有抗rgcIL-8和Trx蛋白的抗体外，还存在能够识别其他蛋白的抗体，这与双向免疫扩散实验结果一致。不同的是，当以Trx蛋白与抗血清预结合后的样本作为一抗时，仅于28 ku左右出现一条明显的条带(图2-b)，表明Trx总蛋白能够封闭抗血清中除抗rgcIL-8抗体外的其他抗体；当以rgcIL-8蛋白与抗血清预结合后的样本作为一抗时，在28和22 ku左右的条带都基本消失，即rgcIL-8封闭了抗血清中抗rgcIL-8和抗Trx的抗体(图2-c)。这从两方面证明了抗血清中存在能够特异性识别rgcIL-8蛋白的抗体，且制备的抗rgcIL-8蛋白的抗体特异性较高。

## 2.2 抗草鱼IL-8抗体的效价

间接ELISA检测结果显示，随着抗血清浓度降低，OD<sub>490</sub>值越来越小，当稀释浓度至1:80 000时，P/N<2.1(表1)。因此，本实验制备的rgcIL-8多克隆抗体效价为1:40 000。

## 2.3 健康草鱼免疫相关组织中IL-8的表达

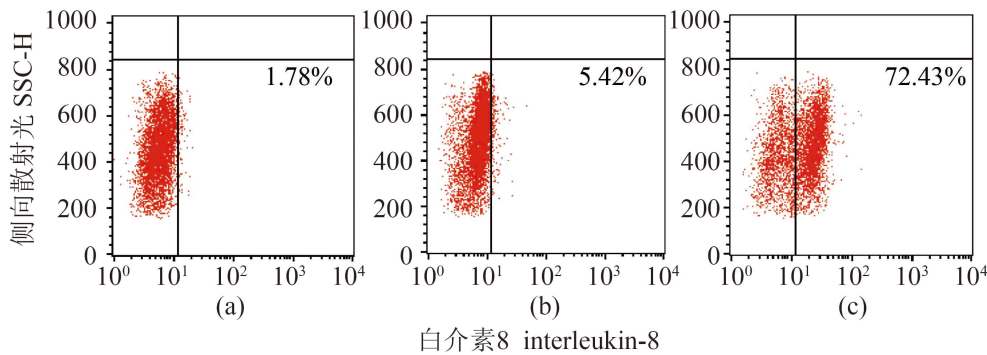
用鼠抗草鱼IL-8抗血清作为一抗，羊抗鼠IgG-FITC作为二抗，在流式细胞仪上检测健康草鱼头肾、脾脏、肝脏、肠道、体肾、胸腺、鳃组织细胞中IL-8阳性细胞比例，并以正常血清处理组为阴性对照，以PBS处理组为空白对照。以头肾组织检测结果为例(图3)，空白对照组IL-8阳性细胞百分比为1.78%，阴性对照组其百分比为5.42%；而用抗血清处理组为72.43%。说明我们

**表 1** 间接ELISA检测的抗草鱼IL-8抗血清的效价  
**Tab. 1** The titer of anti-rgcIL-8 antiserum determined by indirect ELISA

抗血清稀释倍数 dilution ratio of antiserum	OD <sub>490</sub>			P/N
	抗血清 antiserum	阴性对照 negative control	空白对照 blank control	
1 : 5000	3.88	0.35	0.049	+
1 : 1 0000	2.77	0.35	0.049	+
1 : 2 0000	1.42	0.35	0.049	+
1 : 4 0000	0.86	0.35	0.049	+
1 : 8 0000	0.56	0.35	0.049	-

制备的抗rgcIL-8抗体能特异性地识别出草鱼天然IL-8。扣除本底(即扣除阴性对照组的非特异性结合反应)后,草鱼头肾组织在正常生理状态下IL-8阳性细胞百分比为67.01%。

以同样方法检测草鱼免疫相关组织中IL-8阳性细胞比例,IL-8在健康草鱼脾脏、肝脏、肠道、体肾、胸腺、鳃、头肾组织中均呈组成型表达,其中鳃与头肾组织中阳性细胞比例最高( $P<0.01$ ),分别为 $69.23\% \pm 3.29\%$ 和 $68.70\% \pm 3.48\%$ ;其次是胸腺组织中为 $56.63\% \pm 6.78\%$ ,显著高于其他器官( $P<0.05$ ),而在脾脏、肝脏、肠道、体肾中表达差异不大(图4)。

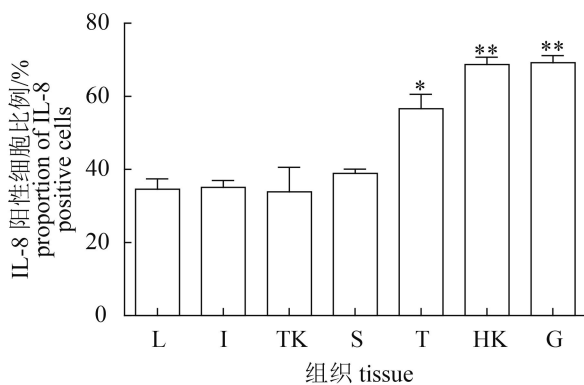


**图 3** 流式细胞术检测健康草鱼头肾细胞的IL-8表达水平

(a)空白对照; (b)阴性对照(普通血清处理); (c)抗rgcIL-8的抗血清处理

**Fig. 3** The IL-8 levels from grass carp head kidney cells assessed by flow cytometry

(a) blank control; (b) negative control (treatment with normal serum); (c) treatment with anti-rgc IL-8 serum



**图 4** 健康草鱼免疫相关组织中IL-8蛋白表达差异

\*表示差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示差异极显著( $P<0.01$ )。L. 肝脏; I. 肠道; TK. 体肾; S. 脾脏; T. 胸腺; G. 鳃; HK. 头肾。下同

**Fig. 4** Differences in expression level of IL-8 protein in healthy grass carp immune-related tissues

Statistically significant differences are indicated by asterisks (\*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ). L. liver; I. intestine; TK. trunk kidney; S. spleen; T. thymus; G. gill; HK. head kidney. The same below

**2.4 LPS刺激后不同时间段草鱼免疫相关组织细胞中IL-8的表达**

在28 °C水温条件下,给实验草鱼每尾腹腔注射10 μg LPS,注射后6 h草鱼体色稍有发黑、游动缓慢,12 h时出现明显炎症症状,鱼体表有充血点,肛门轻微红肿,鳃、体肾、肝胰腺、脾脏呈不同程度发紫、水肿症状。取LPS刺激草鱼后4 h、12 h、24 h的肝脏、肠道、体肾、脾脏、胸腺、鳃、头肾等免疫相关组织,以抗草鱼IL-8抗体标记,采用流式细胞术检测相关组织中的IL-8的表达量变化。以头肾组织为例,检测出头肾组织中IL-8阳性细胞比例分别从刺激前的73.58%(图5-a)提高至87.48%、96.31%和83.45%(图5-b、c、d),显著高于对照组,刺激后12 h达最高值,呈先增高后下降的趋势。

与上述头肾组织细胞类似,LPS刺激后4 h、12 h和24 h,草鱼各免疫相关组织IL-8阳性细胞

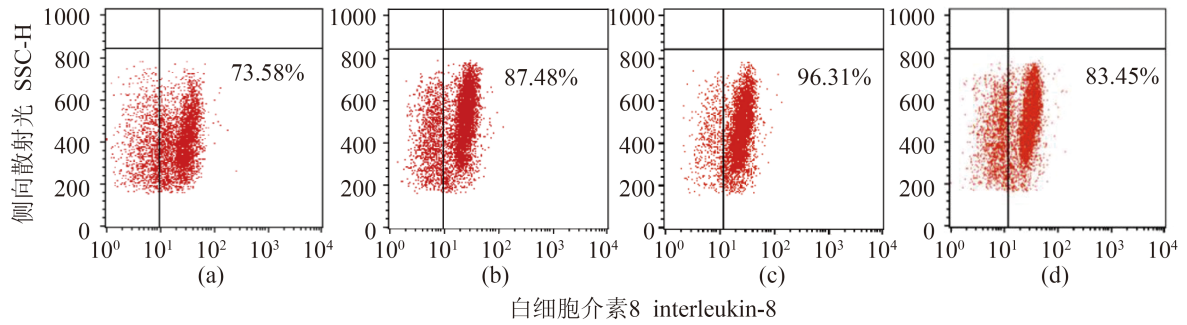


图5 LPS刺激后不同时间草鱼头肾细胞中IL-8阳性细胞比例的变化

(a)无LPS刺激对照; (b)(c)(d)分别为LPS刺激后4 h、12 h、24 h的IL-8阳性细胞比例

Fig. 5 The time-course of IL-8 production in grass carp head kidney cells after LPS stimulation

(a) Control without LPS stimulation; (b)(c)(d) 4 h, 12 and 24 h after LPS stimulation, respectively

比例均显著升高(图6)。其中,刺激后4 h体肾、肝脏中IL-8阳性细胞数量迅速升高至最高值,并分别于12 h、24 h显著下降;肠道中IL-8也在刺激后4 h显著升高,直至24 h其表达水平仍无显著下降;而头肾、鳃和脾脏等组织则在刺激后12 h达到最高值,24 h开始降低;胸腺则在刺激后4 h、12 h无明显变化,24 h时显著升高。

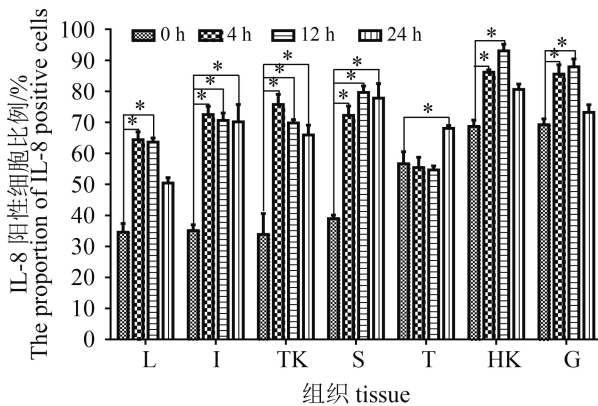


图6 LPS刺激后不同时间草鱼免疫相关组织中IL-8的表达变化

\*表示差异显著(P<0.05)

Fig. 6 Differential expression of IL-8 in grass carp immune-related tissues after LPS stimulation

Statistically significant differences are indicated by asterisks (\*) (P<0.05)

### 3 讨论

流式细胞术是一种在功能水平上对单细胞或其他生物粒子进行定量分析和分选的检测手段,它通过荧光抗原抗体检测技术对细胞中及表面的抗原分子进行分析,进行细胞分类和亚

群分析。这一技术对于人与动物细胞免疫功能的评估以及各种疾病的诊断和治疗有重要作用。本研究以纯化的rgcIL-8为免疫原制备了草鱼IL-8多克隆抗体,以此多抗为标记,采用流式细胞术检测草鱼相关组织细胞IL-8蛋白表达量差异。结果显示,健康草鱼脾脏、肝脏、肠道、体肾、胸腺、鳃、头肾等组织均可产生IL-8蛋白,这与基于Real-time PCR技术分析的草鱼IL-8 mRNA表达情况一致<sup>[9]</sup>。这也进一步表明IL-8在鱼类组织中组成型表达的特点<sup>[16]</sup>。但是,需要指出的是,草鱼IL-8在各组织中转录水平的表达量<sup>[9]</sup>与本研究显示的蛋白水平表达量并不一致,转录水平上肝脏、胸腺的表达高于鳃和头肾等组织,而在蛋白水平上,鳃和头肾中IL-8表达高于胸腺、肝脏等组织。这可能意味着不同组织中IL-8的转录后调节存在差异<sup>[17-18]</sup>,或不同组织存在着表达水平不同的IL-8亚型<sup>[19]</sup>,也或IL-8活性基团在不同部位的修饰方式不同,从而导致制备的抗体失去识别能力而显示蛋白水平与转录水平表达量不一致,其具体机制有待进一步研究。

LPS是革兰氏阴性细菌细胞壁中最丰富的组分<sup>[20]</sup>,由细胞膜产生<sup>[21]</sup>,它可刺激动物多种免疫细胞分泌IL-8和其他炎性细胞因子,引起炎症反应<sup>[22-23]</sup>。多项研究也已证实,LPS可诱导鲤、黑线银鲈、虹鳟等鱼类的炎症反应<sup>[16, 24-25]</sup>。IL-8被认为是炎症过程中最关键的中性粒细胞趋化因子之一<sup>[17]</sup>,可在炎症反应期趋化中性粒细胞、T淋巴细胞及嗜碱粒细胞到达病灶。本研究采用腹腔注射LPS处理草鱼,诱导草鱼炎症,在蛋白水平上观察炎症过程早期IL-8在草鱼不同组织

中的表达特点。本研究显示, LPS刺激后各时段草鱼相关组织细胞IL-8蛋白表达量均有所升高, 但随着时间的推移各组织中IL-8蛋白表达量的变化趋势并不一致。IL-8蛋白表达高峰出现的先后依次为体肾、肠道、肝脏、脾脏、鳃、头肾、胸腺。其中, 肠道、肝脏、体肾在4 h时表达量达最高, 且肠道在4~24 h内一直保持较高水平, 这与肠道组织在24 h出现肉眼可见的炎症相一致, 也证实了肠道是应答外界各种刺激(包括病原入侵)的首要器官<sup>[26]</sup>, IL-8与肠道炎症的发生直接关联, 对鱼体的免疫反应起一定的调节作用; 而作为肠肝系统及排泄系统的肾是鱼类重要的免疫器官, 是鱼类对抗外来刺激的主要门户, 本研究表明IL-8参与了这些器官的免疫应答。脾脏、头肾是鱼类主要免疫器官, 而鳃是重要的黏膜免疫器官, 这些组织中IL-8蛋白表达在LPS刺激后12 h达到最高峰, 到24 h时有所下降。胸腺是淡水鱼类发育最早的免疫器官, 位于鳃的基部, 胸腺基底是致密结缔组织, 表面有一层上皮细胞膜与咽腔相隔, 有效地防止了抗原性或非抗原性物质通过咽腔直接进入胸腺组织中<sup>[27-28]</sup>, 外界微生物或颗粒物质只有通过鳃腔后才能进入胸腺<sup>[29]</sup>, 因此, 胸腺处在相对稳定的内环境中, 本研究中, 草鱼胸腺中IL-8蛋白出现最晚, 表达量上升幅度较小, 也证实了这一点; 同时, 随着性成熟和鱼龄增长, 鱼类胸腺会发生脂肪性退化并伴随着生理性萎缩<sup>[30]</sup>。胸腺中IL-8表达上升不高的另一可能原因是实验鱼为二龄草鱼, 且在实验室暂养1个多月, 投饵量为1%, 处理半饥饿状态, 其胸腺已开始出现了非年龄性胸腺退化<sup>[28]</sup>。

综上所述, 草鱼IL-8参与了抵抗外来物入侵的有关活动过程, 在免疫调节中起作用。基于LPS刺激诱导的炎症过程中IL-8的表达特征, 采用本研究获得的高效价IL-8多克隆抗体, 可在分子水平上对草鱼炎症性疾病进行早期检测和预警, 从而及时采取预防及治疗措施, 最大程度上减少炎性疾病的大规模暴发。

#### 参考文献:

- [1] Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines[J]. *Advances in Immunology*, 1993, 55: 97-179.
- [2] Huising M O, Stolte E, Flik G, *et al.* CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003, 27(10): 875-888.
- [3] 王俊丽, 雒燕婷, 郝光, 等. 淇河鲫IL-8cDNA克隆及组织表达分析[J]. *水产学报*, 2013, 37(9): 1281-1289.
- Wang J L, Luo Y T, Hao G, *et al.* Cloning and tissue expression analysis of the interleukin 8 gene from crucian carp (*Carassius auratus*) in Qihe River[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(9): 1281-1289(in Chinese).
- [4] Inoue Y, Endo M, Haruta C, *et al.* Molecular cloning and sequencing of the silver chimaera (*Chimaera phantasma*) interleukin-8 cDNA[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 15(3): 269-274.
- [5] 邱丽华, 江世贵, 张汉华, 等. 花鲈白细胞介素8基因的克隆与序列分析[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(2): 201-207.
- Qiu L H, Jiang S G, Zhang H H, *et al.* Molecular cloning and characterization of interleukin 8 from Japanese sea perch (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(2): 201-207(in Chinese).
- [6] 谭业平, 孙晓义, 卢强, 等. 鲤鱼白细胞介素-8全长cDNA的克隆、鉴定及其差异表达分析[J]. *中国兽医学报*, 2008, 28(6): 667-671.
- Tan Y P, Sun X Y, Lu Q, *et al.* Cloning, identification and differential expression analysis of the interleukin-8 full-length cDNA from carp[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2008, 28(6): 667-671(in Chinese).
- [7] 陈吉刚, 杜海韬, 熊娟, 等. 鲈鱼白细胞介素-8 cDNA序列的克隆与原核表达[J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(4): 447-451.
- Chen J G, Du H T, Xiong J, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of *Lateolabrax japonica* interleukin-8 cDNA[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2010, 19(4): 447-451(in Chinese).
- [8] 胡云凤, 孙军, 林小涛, 等. 斜带石斑鱼白细胞介素8基因的克隆与表达分析[J]. *暨南大学学报(自然科学版)*, 2010, 31(3): 324-330.
- Hu Y F, Sun J, Lin X T, *et al.* Gene cloning and expression of interleukin-8 (IL-8) from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Journal of Jinan University (Natural Science)*, 2010, 31(3): 324-330(in Chinese).
- [9] Wang T T, Song X H, Bao G M, *et al.* Molecular characterization, expression analysis, and biological

- effects of interleukin-8 in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(5): 1421-1432.
- [10] Harun N O, Zou J, Zhang Y A, *et al.* The biological effects of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant interleukin-8[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(6): 673-681.
- [11] Cai Z H, Gao C P, Zhang Y, *et al.* Functional characterization of the ELR motif in piscine ELR<sup>+</sup> CXC-like chemokine[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(4): 505-512.
- [12] Sun J S, Zhao L, Sun L. Interleukin-8 of *Cynoglossus semilaevis* is a chemoattractant with immunoregulatory property[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(6): 1362-1367.
- [13] Hu Y H, Chen L, Sun L. CXCL8 of *Scophthalmus maximus*: Expression, biological activity and immunoregulatory effect[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(10): 1032-1039.
- [14] van der Aa L M, Chadzinska M, Golbach L A, *et al.* Pro-inflammatory functions of carp CXCL8-like and CXCL8 chemokines[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 36(4): 741-750.
- [15] Hornbeck P. Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies[M]//Coligan J E. *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley and Sons, Inc., 2003.
- [16] Corripio-Miyar Y, Bird S, Tsamopoulos K, *et al.* Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*)[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(6): 1361-1373.
- [17] Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, *et al.* Multiple control of interleukin-8 gene expression[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002, 72(5): 847-855.
- [18] Villarete L H, Remick D G. Transcriptional and post-translational regulation of interleukin-8[J]. *The American Journal of Pathology*, 1996, 149(5): 1685-1693.
- [19] Jundi K, Greene C M. Transcription of interleukin-8: How altered regulation can affect cystic fibrosis lung disease[J]. *Biomolecules*, 2015, 5(3): 1386-1398.
- [20] Sweet M J, Hume D A. Endotoxin signal transduction in macrophages[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1996, 60(1): 8-26.
- [21] Schroers V, van der Marel M, Neuhaus H, *et al.* Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Aquaculture*, 2009, 288(3-4): 184-189.
- [22] de Oliveira S, Reyes-Aldasoro C C, Candel S, *et al.* CXCL8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response[J]. *The Journal of Immunology*, 2013, 190(8): 4349-4359.
- [23] Chiariotti L, Coretti L, Pero R, *et al.* Epigenetic alterations induced by bacterial lipopolysaccharides [M]//Minarovits J, Niller H H. *Patho-Epigenetics of Infectious Disease: Advances in Experimental Medicine and Biology*. Switzerland: Springer, 2016: 91-105.
- [24] van der Aa L M, Chadzinska M, Tijhaar E, *et al.* CXCL8 chemokines in teleost fish: Two lineages with distinct expression profiles during early phases of inflammation [J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12384.
- [25] Ribas L, Roher N, Martínez M, *et al.* Characterization and expression of the transcription factor PU.1 during LPS-induced inflammation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(1): 35-45.
- [26] Ringø E, Myklebust R, Mayhew T M, *et al.* Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry[J]. *Aquaculture*, 2007, 268(1-4): 251-264.
- [27] Etlinger H M, Hodgins H O, Chiller J M. Evolution of the lymphoid system II. Evidence for immunoglobulin determinants on all rainbow trout lymphocytes and demonstration of mixed leukocyte reaction[J]. *European Journal of Immunology*, 1977, 7(12): 881-887.
- [28] 卢全章. 草鱼胸腺组织学的研究[J]. *水生生物学报*, 1991, 15(4): 327-332.
- Lu Q Z. Studies on the histology of thymus of the grass carp[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1991, 15(4): 327-332(in Chinese).
- [29] Zapata A, Amemiya C T. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures[M]//Pasquier L D, Litman M D G W. *Origin and Evolution of the vertebrate immune system: Current topics in microbiology and immunology*. Berlin Heidelberg: Springer, 2000: 67-107.
- [30] Chiltonczyk S. The thymus in fish: Development and possible function in the immune response[J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1992, 2: 181-200.

## Expression patterns of IL-8 protein during bacterial LPS-induced inflammatory response in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

LIU Zhaojun, ZHAO Jie, BO Yunxuan, XIAO Lanying, SHI Kaili, SONG Xuehong\*

(School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** In order to investigate the expression characteristics of IL-8 during the lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory process in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), recombinant grass carp IL-8 (rgcIL-8) was generated in prokaryotic expression system, and an anti-rgcIL-8 polyclonal antibody was prepared by immunizing mice with the purified rgcIL-8 alternately via intraperitoneal and subcutaneous injections. The polyclonal antibody was validated for specificity and titer by Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and was used to detect IL-8 in immune-related tissues from healthy and/or LPS-stimulated grass carp by flow cytometry analysis. Results showed that the antibody titer peaked at 40 000. Flow cytometry analysis confirmed that IL-8 protein was expressed constitutively in all tested tissues of healthy fish, with higher levels in head kidney and gill. Moreover, the expression of IL-8 protein was found to be significantly up-regulated by LPS stimulation in all tested fish tissues, the protein levels peaked in intestine, liver and trunk kidney at 4 h, in head kidney and spleen at 12 h, and in thymus at 24 h following LPS stimulation, respectively. Our results provide further evidence that IL-8 is a key player in host inflammatory responses. Therefore, it is proposed that an elevated expression level of IL-8 protein could be used as a marker for monitoring the early inflammation, and be considered as a risk indicator for inflammatory diseases in aquaculture.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; interleukin-8 (IL-8); polyclonal antibody; bacterial lipopolysaccharide; tissue expression; inflammatory response

**Corresponding author:** SONG Xuehong. E-mail: songxh@suda.edu.cn

**Funding projects:** Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2011285); Basic Application Foundation of Suzhou (SYN201505)