

鲤和草鱼 *IL17*受体基因家族的全基因组识别、起源进化及表达分析

董传举^{1,2}, 张江凡¹, 李胜杰³, 吕红皂¹, 聂国兴¹, 李学军^{1*}

(1. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007;

2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 淡水鱼类育种国家
与地方联合工程实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;

3. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要: 为了研究鲤科鱼类最具代表性的二个物种—鲤和草鱼 *IL17*受体基因家族的起源进化, 实验采用比较基因组学和生物信息学的方法, 分别在鲤和草鱼基因组数据库进行序列比对和注释, 然后对得到的基因进行结构域和系统发育学分析, 最后在12个不同组织中进行基因表达分析研究。结果显示, 在鲤和草鱼中分别注释得到9个和5个 *IL17*受体基因家族成员。系统发育分析显示, 该基因家族不存在鱼类特有的基因, 在硬骨鱼类中具有一定的保守性。比较基因组学结果显示, 与四足动物相比, 大多数硬骨鱼类中 *IL17*受体基因没有明显增多。鲤与草鱼等其他硬骨鱼类相比, 除 *IL17RB*以外, 其余 *IL17*受体基因家族成员均加倍。不同组织的表达分析结果显示全基因组复制后不同基因拷贝的功能发生了分化。研究表明, 虽然硬骨鱼经历第三轮全基因组复制, 但是由于复制发生时间久远, 大多数基因已经发生改变或退化, 进而在基因组中丢失。而鲤第四轮基因组复制时间发生在820万年前, 复制发生时间较近, 故复制后的基因基本得以保留。但是对于一些具有特殊功能的高度保守基因(例如 *IL17RB*), 也会发生在极短时间内出现丢失现象。鲤和草鱼健康组织的表达谱分析结果同样表明, 鲤 *IL17*受体基因的不同拷贝之间已经发生了快速进化及亚功能化, 并且这种现象在鲤四倍体基因组中普遍存在。

关键词: 鲤; 草鱼; *IL17*受体; 全基因组复制; 基因分化

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

*IL17*主要由Th17细胞分泌, *IL17*基因家族在哺乳动物中至少包含6个成员(*IL17A*、*IL17B*、*IL17C*、*IL17D*、*IL17E*和*IL17F*)。 *IL17*可诱导多种炎症相关的趋化因子、细胞因子及抗菌蛋白的产生, 在机体的宿主防御中发挥重要作用^[1]。因此, *IL17*与多种自身免疫疾病和炎症疾病密切相关^[2-3]。同样, *IL17*受体基因(*IL17R*)在宿主防御和免疫损伤等方面也具有重要作用。因此, *IL17*受体基因家族信号转导机制及其生理和病理功能

研究对于多种疾病的预防和治疗具有一定的积极作用。

*IL17*受体基因家族包括五个成员(*IL17RA*、*IL17RB*、*IL17RC*、*IL17RD*和*IL17RE*)^[4], 均为I型单次跨膜蛋白, 一般具有胞内SEF/*IL17R*(SE-FIR结构域)和胞外纤维连接蛋白III结构域的保守序列基序。 *IL17RA*是最早发现的家族成员, 具有最大的分子量和胞质尾区, 在造血组织中高表达, 同时在成骨细胞、内皮细胞和上皮细胞中

收稿日期: 2018-03-01 修回日期: 2018-05-27

资助项目: 国家自然科学基金(31801032); 国家大宗淡水鱼产业技术体系建设项目(CARS-45-04); 淡水渔业育种国家地方联合工程实验室开放课题(KF-2016-03); 河南省科技攻关(172102210348, 182102210081); 河南师范大学博士启动课题(qd16159)

通信作者: 李学军, E-mail: xjli@htu.edu.cn

也有所表达^[5]。*IL17RC*主要在非免疫细胞中表达,如前列腺、肝脏、肾脏、甲状腺和关节等组织^[6]。*IL17RA*和*IL17RC*复合物共同组成了*IL17A*和*IL17F*的识别受体^[7]。*IL17RA*和*IL17RB*复合物介导细胞对*IL17E*反应且在肝脏肾脏和其他内分泌组织中广泛表达^[8]。*IL17RD*是该基因家族最古老的成员,对其配体的研究还不够透彻^[9]。目前对于*IL17RE*的了解也非常有限,有研究认为*IL17C*有可能是其配体^[10]。

在一些硬骨鱼类中也发现了与人类同源的*IL17*受体基因,如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、日本牙鲆(*Takifu rubripes*)以及斑马鱼(*Danio rerio*)等^[11-13]。Wu等根据多种鱼类*IL17RC*及*IL17RE*的进化和共线性研究推测:在基因大规模复制之前,仅存在*IL17RA*及*IL17RD*两种受体基因。而在古老的脊椎动物进化过程中,由于发生了部分基因或者全基因组复制,因此产生了新的*IL17*受体基因,即*IL17RC*。然后从硬骨鱼类的*IL17RC*分化出*IL17RE*和*IL17REL*^[14]。而Ding等人通过对大黄鱼*IL17*受体基因进行进化研究发现,软骨鱼类姥鲨的*IL17REL*与高等脊椎动物*IL17REL*的亲缘关系更接近,并且与硬骨鱼类的*IL17REL*发生分离。于是将脊椎动物*IL17*受体基因家族分为2个分群:*IL17RA/RB/RD*和*IL17RC/RE/REL*^[15-16]。因此,目前*IL17*受体基因的起源与进化还存在一定的争论。

鲤科鱼类是世界上最重要的硬骨鱼类之一,具有重要的食用价值和观赏性。鲤(*Cyprinus carpio*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是鲤科鱼类中最具代表性的鱼类,在全球淡水养殖产业中占有很高比重,具有非常重要的商业价值^[17-18]。另外,鲤作为一种重要模型物种,也广泛应用于环境毒理学、发育生物学、生理学、免疫学以及进化基因组学等领域的研究。因此,在过去十几年间,大量鲤基因组资源被广泛开发,包括遗传标记^[19]、遗传图谱^[20]、BAC数据库^[21]、ESTs以及转录组序列^[22-23]等。草鱼基于其特殊的食性,在过去的几年间也得到广泛研究,包括:遗传连锁图谱的构建^[24],基因和EST序列的发掘^[25-26]等。目前关于草鱼免疫系统^[27-28],食物摄取控制^[29]以及营养和生长相关基因调控^[30-31]的研究也有了很大进展。近期,测序并组装完成的鲤和草鱼全基因组,均表明这二个物种在长

期历史进化中均呈现出一定的特殊性^[32-33]。尤其是鲤作为异源四倍体,与草鱼等硬骨鱼类相比,经历了一轮额外的全基因组复制。这为全基因组复制后基因对环境的适应性改变研究提供了很好的材料基础。

本实验应用基因组数据,在鲤和草鱼中分别识别并确定了9个和5个*IL17*受体基因家族成员,然后序列比对和进化分析对基因进行注释和命名。通过*IL17*受体基因在鲤和草鱼健康组织中的表达模式差异,对*IL17*受体基因的功能分化进行了分析研究。本实验为重要免疫相关基因的发掘以及鱼类生理性适应和基因组演化机制的研究提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 基因的识别与命名

分析用到的10个物种(智人*Homo sapiens*、小家鼠*Mus musculus*、家马*Equus caballus*、佛州文昌鱼*Branchiostoma floridae*、斑点叉尾鲷、尼罗罗非鱼*Oreochromis niloticus*、斑马宫丽鱼*Maylandia zebra*、青鳉*Oryzias latipes*、大西洋鲑和斑马鱼)的*IL17R*基因序列和氨基酸序列均来自公共数据库Ensembl(<http://asia.ensembl.org/>),GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)和UniProt(<http://www.uniprot.org/>)。应用人类和斑马鱼的*IL17*受体基因作为参考序列,使用blast工具在鲤和草鱼基因组数据库中进行比对,然后进行双向Blast搜索以验证候选基因的准确性。最终得到的序列在NCBI上比对,确定鲤和草鱼*IL17R*基因的可靠性。根据比对结果和系统进化的拓扑结构对鲤和草鱼*IL17*受体基因命名。对于含有多个直系同源拷贝的*IL17*受体基因,在后面附加-1或-2表示不同的基因拷贝。

1.2 基因结构与系统进化分析

采用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对*IL17R*基因的结构域进行预测,并用NCBI保守结构域预测软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi/>)验证。采用上述10个物种的*IL17*受体氨基酸序列进行系统进化分析。应用clustalw2(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)比对*IL17*受体氨基酸序列(共59条),然后手动调整比对位点序列。在MEGA 6

软件中应用相近邻接法进行系统进化分析, boots-traps 值设为 1 000^[34]。

1.3 健康组织的表达分析

取健康成年鲤和草鱼 12 种组织(肠、鳃、脑、性腺、血液、皮肤、肌肉、肾脏、头肾、脾脏、肝脏和心脏)保存于 TRIzol(Life Technologies, NY, USA)试剂中, 提取总 RNA。然后, 应用 SuperScript III Synthesis System(Life Technologies)反转录成 cDNA。根据不同基因的特异性设计引物, 并进行 PCR 扩增。PCR 反应过程如下: 首先 94 °C 变性 5 min; 94 °C(30 s)、55 °C(30 s)、72 °C(30 s), 该过程 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。在各组织中, 应用 β -actin(F: 5'-tgcaagccg-gattcgctgg-3'; R: 5'-agttggtgacaataccgtgc-3')为对照, 进行 PCR 扩增。扩增反应产物用凝胶电泳(1.5%琼脂糖凝胶于 150 V)分离, 在紫外光下观察并拍照。

2 结果

2.1 *IL17* 受体基因识别和命名

应用多重比对方法, 在草鱼数据库中识别

到 5 个 *IL17* 受体基因, 与其他脊椎动物的 4~5 个 *IL17* 受体基因相比, 没有明显数量变化。在鲤基因组数据库中识别到 9 个 *IL17* 受体基因, 分布在 9 条不同染色体上。鲤 *IL17* 受体基因数量明显多于其他物种, 例如: 佛州文昌鱼具有 2 个, 尼罗罗非鱼具有 4 个, 智人具有 5 个。研究发现, 脊椎动物的祖先经历了二轮全基因组复制, 硬骨鱼类经历了第三轮全基因组复制, 而鲤经历过第三轮全基因组复制后, 又发生了第四轮全基因组复制。在系统进化分析中鲤 *IL17* 受体基因明显增多, 而草鱼基因组没有明显变化。通过序列比对和系统进化分析结果来命名鲤和草鱼的 *IL17* 受体基因时, 含有多个直系同源基因的 *IL17* 受体基因, 在后面加上 -1 或 -2 来表示基因的不同个数。在鲤基因组中, 除 *IL17B* 为单拷贝, 所有 *IL17* 受体基因均有二个拷贝, 故分别命名为 *CCIL17RA-1*, *CCIL17RA-2*; *CCIL17RC-1*, *CCIL17RC-2*; *CCIL17RD-1*, *CCIL17RD-2*; *CCIL17RE-1*, *CCIL17RE-2*。而在草鱼基因组中, 所有 *IL17* 受体基因均为单拷贝, 故分别命名为 *CIL17RA*, *CIL17RB*, *CIL17RC*, *CIL17RD* 和 *CIL17RE*。具体位置、编码序列长度、外显子数目和数据库收录编号等详细信息见表 1。

表 1 鲤和草鱼 *IL17* 受体基因家族基本信息

Tab. 1 Summary of *IL17R* family in grass carp and common carp genome

基因名称 gene name	编码区/bp CDS	编码区/aa CDS	编码区状态 CDS situation	外显子数目 no. of exons	收录编号 accession no.
<i>CIL17RA</i>	2 268	755	Complete	10	MF803024
<i>CIL17RB</i>	1 407	468	Complete	10	MF803025
<i>CIL17RC</i>	2 163	720	Complete	15	MF803026
<i>CIL17RD</i>	2 208	736	Complete	13	MF803027
<i>CIL17RE</i>	1 212	403	Complete	13	MF803028
<i>CCIL17RA1</i>	2 460	819	Complete	11	GI:1028223719
<i>CCIL17RA2</i>	2 394	797	Complete	11	GI:1028223721
<i>CCIL17RB</i>	1 095	364	Complete	11	GI:1028223723
<i>CCIL17RC1</i>	1 854	617	Complete	12	GI:1028223725
<i>CCIL17RC2</i>	1 791	596	Complete	15	GI:1028223727
<i>CCIL17RD1</i>	2 211	736	Complete	13	GI:1028223729
<i>CCIL17RD2</i>	1 956	651	Complete	12	GI:1028223731
<i>CCIL17RE1</i>	1 188	395	Complete	14	GI:1028223733
<i>CCIL17RE2</i>	1 293	430	Complete	15	GI:1028223735

2.2 *IL17*受体基因家族的结构域分析

根据鲤和草鱼*IL17*受体基因的氨基酸序列预测其功能结构域。大多家族成员都具有SEFIR结构域,该结构域靠同源结构域相互作用形成二聚体(SEFIR-SEFIR),在免疫防御和发育调控中发挥重要作用^[35]。由于SEFIR结构域在生物体内的重要作用,因此具有一定的保守性,所以在大多数*IL17*受体基因中均具有该结构域。但是,在鲤和草鱼*IL17RE*中却缺少SEFIR结构域(图1)。

2.3 *IL17*受体基因家族的系统进化分析

研究认为,脊椎动物在进化过程中可能经历了数次全基因组复制^[36]。目前比较成熟的理论是四足动物经历了二轮全基因组复制,即“1-2-4规则”^[37]。因此,在高等真核生物进化过程中,全基因组复制现象普遍存在,这使得基因数量成倍增加,但随后往往伴随着基因的丢失,这个周期进程在高等动物进化中往复出现^[38]。

不同物种间基因家族成员的比较研究常用来探究全基因组复制领域的诸多问题^[37]。因此不同物种*IL17*受体基因家族的比较研究,可用以分析鲤和草鱼基因组进化情况以及不同物种间的系统进化关系。本实验收集到12个物种(包括智人、小家鼠、家马、佛州文昌鱼、斑点叉尾鲷、尼罗罗非鱼、斑马宫丽鱼、青鳞、大西洋鲑、斑马鱼、鲤和草鱼),共59个*IL17*受体基因。通过基因的蛋白序列构建系统进化树,分析鲤和草鱼*IL17*受体基因的系统进化关系。草鱼和鲤的*IL17*受体直系同源基因聚类关系较近,且均与其他物种的直系同源基因聚类,表明所有*IL17*受体基因均具有一定保守性且不存在鱼类特异的*IL17*受体基因(图2)。由拓扑结构可知,*IL17*受体基因家族分为二支即二个亚家族:亚家族I,包括*IL17RA*、*IL17RB*和*IL17RD*;亚家族II,包括*IL17RC*和*IL17RE*。在头索动物佛州文昌鱼基因组中发现了二个*IL17*受体基因(*IL17RA*和*IL17RD*)^[14],然后经历二轮全基因组复制,形成

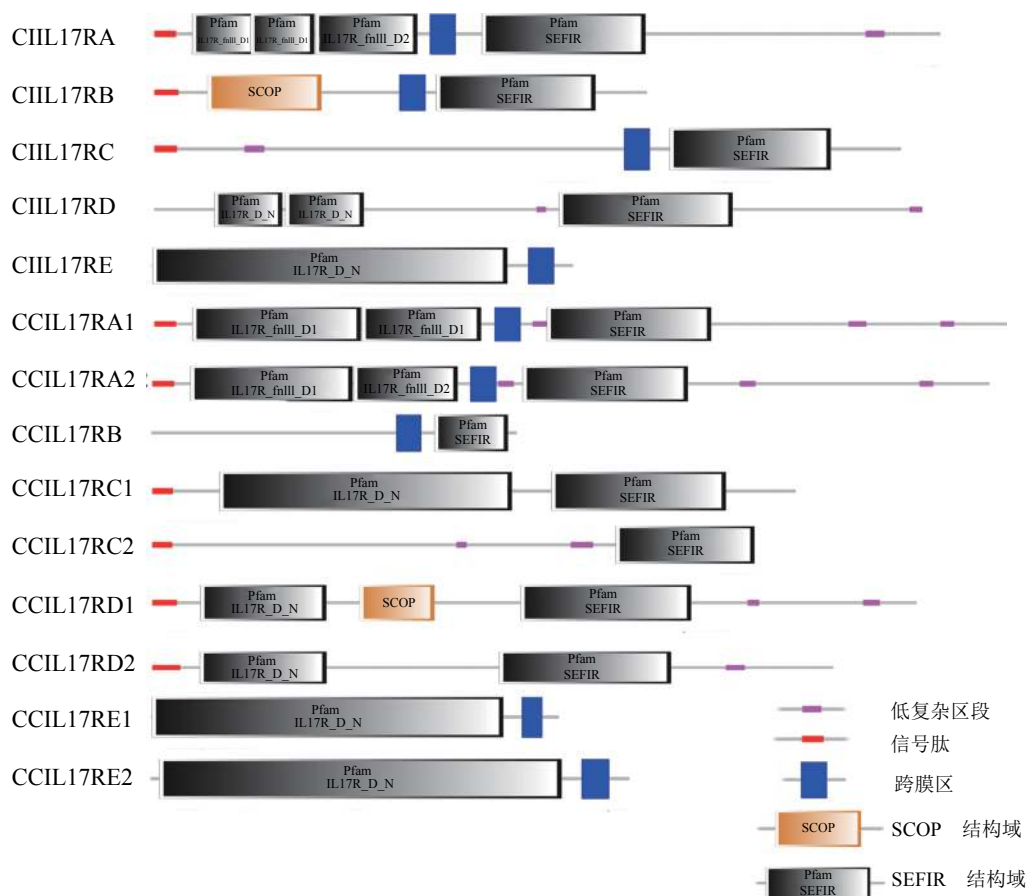


图1 鲤和草鱼的*IL17R*基因结构域示意图

Fig. 1 Schematic representation of the domain architecture of *IL17R* genes in grass carp and common carp

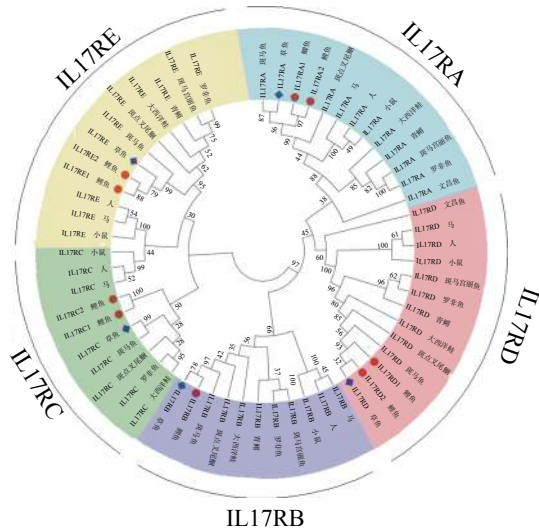


图 2 基于NJ法构建的12个物种 *IL17* 受体基因蛋白序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *IL17R* genes

The phylogenetic tree was constructed using NJ algorithm as described in detail in Materials and Methods section. Numbers around the nodes correspond to bootstrap support values in percentages.

目前的5个基因(*IL17RA-E*)。上面提到的古老 *IL17RA*和*IL17RD*基因相对比较保守, 因此在大多数物种基因组中均能发现, 而复制后生成的

IL17RB、*IL17RC*和*IL17RE*等3个基因在基因组的进化过程中, 不断发生变化, 因此出现了不同程度的丢失。

2.4 *IL17*受体基因的表达分析

探索*IL17*受体基因的表达方式有助于其功能的预测。因此, 通过设计特异性引物(表2), 应用RT-PCR方法, 可以检测*IL17*受体基因在鲤和草鱼不同健康组织中的相对表达差异。草鱼 *IL17*受体基因家族成员在不同组织中的表达存在较大差异。例如, *IL17RD*在所有的组织中均有较高表达, 而*IL17RA*、*IL17RB*、*IL17RC*和*IL17RE*等4个基因在不同组织中均存在不同的特异性表达(图3)。草鱼*IL17RA*、*IL17RB*和*IL17RC*的表达模式基本一致, 但与其他二个基因相比, *IL17RB*基因在肌肉中也有一定的表达水平。鲤*IL17*受体基因家族也具有独特的组织表达方式。大多数鲤*IL17*受体基因在各组织中广泛表达, 除在鳃中均具有较高表达水平外, 其他组织中的表达水平不规律(图4)。此外, 鲤*IL17RA1*、*IL17RA2*和*IL17B*在肠和肝中表达量较高, 其他基因在肠和肝脏中表达量较低。一些*IL17*受体基因拷贝间的

表 2 草鱼和鲤 *IL17*受体基因家族RT-PCR表达的特异性引物(CI代表草鱼, CC代表鲤)

Tab. 2 Specific primers of RT-PCR expression analysis of *IL17R* genes family in 12 tissues of grass carp and common carp(CI represents grass carp, CC represents common carp)

基因 gene	正向引物 (5'-3') primer F (5'-3')	反向引物 (5'-3') primer R (5'-3')	退火温度/°C annealing temperature	产物大小/bp product size
<i>CIIL17RA</i>	CGATGTGCCGTCTATG	GATTGGGAGTCCGTTG	50	339
<i>CIIL17RB</i>	CCCTTCACCCATACACG	TTCCATCGGACTTTAGC	48	228
<i>CIIL17RC</i>	TCAGATACTGGCTTCG	CCTCACCTCGTCTAAT	54	305
<i>CIIL17RD</i>	CGTCAGCAAACGCAACTA	GACAGACTCAGCGAACAAAG	54	271
<i>CIIL17RE</i>	TTACAATCTCAGGCTCT	GACGGTTTCATCTCAC	48	512
<i>CCIL17RA1</i>	CCGTCTACAGTGGCTTGA	CGTCCTTCCGATACCC	54	394
<i>CCIL17RA2</i>	GGCTACAGTGGCTTGA	TCCCTGCTGATACTTCTC	52	358
<i>CCIL17RB</i>	ACCGACTGATGGAGCG	GAGGTGGTGAGATGAGGAG	50	143
<i>CCIL17RC1</i>	GAACATAACCAAGGCAGAG	AGCCAAAGACACGGACA	54	423
<i>CCIL17RC2</i>	GTGATGGCAGTGGTGAT	GGACAATACTCGGTTTCG	52	600
<i>CCIL17RD1</i>	TCTTCCGCCATCTTT	GACATCTGACCCTGCTTA	48	496
<i>CCIL17RD2</i>	AGGGTCAGATGTCGTGG	AGGAGGGAGGCGTTTA	52	550
<i>CCIL17RE1</i>	AGGCTCTGCCATAAAC	CCCTCTGGACCTTGAT	48	239
<i>CCIL17RE2</i>	GGCTCTGCCATAAACG	GCAAAGCATTGGGTGT	48	379

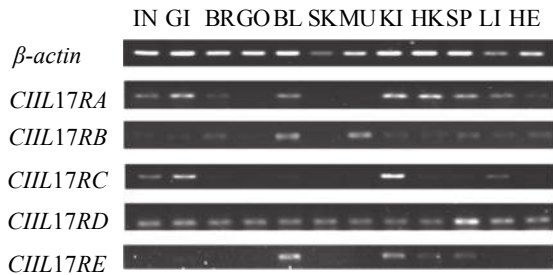


图3 草鱼*IL17R*基因家族在12组织中的RT-PCR表达
IN.肠, GI.鳃, BR.脑, GO.性腺, BL.血液, SK.皮肤, MU.肌肉, KI.肾脏, HK.头肾, SP.脾脏, LI.肝脏, HE.心脏, 以下图注释同此

Fig. 3 RT-PCR based expression analysis of *IL17R* genes family in 12 tissues of grass carp

β -actin was used as an internal control, gene names are indicated on the left of the panel IN.intestine, GI.gill, BR.brain, GO.gonad, BL.blood, SK.skin, MU. Muscle, KI. Kidney, HK. Head-kidney, SP. Spleen.LI.liver, HE.heart, the same below

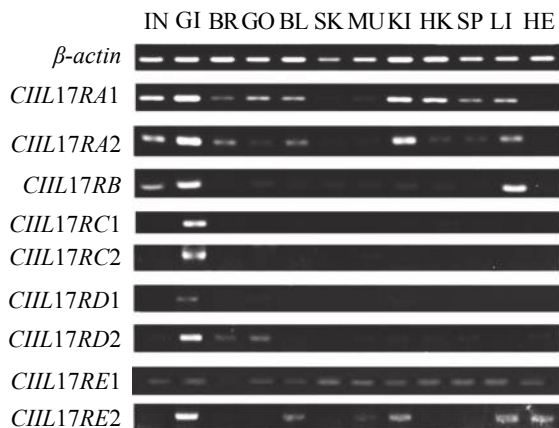


图4 鲤*IL17R*基因家族在12组织中的RT-PCR表达

Fig. 4 RT-PCR based expression analysis of *IL17R* genes family in 12 tissues of common carp

表达存在显著差异, 其中一个拷贝在某些组织中表达量较高, 而另一个拷贝表达量却相对较低。例如: 鲤*IL17RD1*在肌肉、头肾、脾脏、心脏中几乎不表达, 而*IL17RD2*在上述组织中均有一定表达; *IL17RE1*在性腺、皮肤、头肾和脾脏中均有较高表达, 而*IL17RE2*在性腺、皮肤、头肾和脾脏中的表达量均较低。然而, 在*IL17RA*和*IL17RC*中, 2个不同拷贝的表达模式却基本一致。

3 讨论

*IL17*基因受体一般具有SEFIR结构域, 但在脊椎动物中也存在缺少SEFIR结构域基因, 基于序列相似性, 命名为*IL17REL*^[14]。对鱼类和哺

乳类进行选择压力分析显示*IL17RE*受到进化选择, 这与*IL17REL*基因的显性关系一致, 故推测*IL17REL*的功能在进化中也较保守。*IL17*受体基因家族的分析, 尤其是新结构域和亚家族的鉴定对进一步了解*IL17*受体的功能提供了一定参考^[39]。但是, 对鲤和草鱼进行的结构域研究, 发现这2个物种的*IL17RE*基因都缺少SEFIR结构域。因此, 推测*IL17RE*为了获取新的功能, 在一些物种染色体的复制和整合过程中, 丢失了SEFIR结构域。

全基因组复制和基因复制是脊椎动物进化的主要驱动力, 在早期脊椎动物中, 全基因组复制导致了基因大规模的扩增, 各种基因家族的比较分析研究也为该假设提供了有力依据。例如: 对*Hox*基因家族的研究, 证明了上述观点并发现现存硬骨鱼类的共同祖先又经历了额外的一轮全基因组复制, 也叫硬骨鱼特有全基因组复制(TSWG)或第三轮全基因组复制^[40]。一些基因的起源时间和共显性的研究也支持“在辐鳍鱼进化历程中发生了一次全基因组复制事件”这一假说^[41-42]。通过大量基因家族的比较基因组学分析, 发现与高等脊椎动物相比硬骨鱼类通常具有较多的基因拷贝, 这与上述研究结果一致^[43], 即硬骨鱼类的进化史上全基因组复制频繁发生并且在新基因的产生中起到重要作用^[44]。

按照上述理论, 经历第三轮全基因组复制的硬骨鱼类基因家族成员数量应该远多于其他四足动物。但在本研究中, 发现草鱼、斑马鱼和青鳞等硬骨鱼类的*IL17*受体基因家族成员并不多于人类和小鼠等四足动物, 相反某些硬骨鱼类的基因数量还偏少。首先应该从复制后的基因命运来分析。全基因组复制或其他原因导致的基因加倍为基因新功能演化提供了重要模板, 进而为物种进化和多样性提供了原始素材和动力^[45]。但复制后的基因并非一成不变, 它们往往有4种不同命运: ①新功能化, 即衍化出了新功能; ②亚功能化, 即分割祖先基因的部分功能; ③假基因化或丢失, 即不断积累有害突变, 进而从基因组中消失; ④功能保守, 即保持原功能不变^[46-48]。因此, *IL17*受体基因复制后的2个拷贝中的1个, 理论上可以随意退化并从基因组中丢失而不产生任何影响。所以大多数全基因组复制形成的基因会在一定时间内丢失1个拷贝, 只留下单一拷贝。另外, 第三轮全基因

组复制的时间大约发生在3.5亿年前^[42], 由于时间太过久远, 大多数基因不仅发生了简单改变或者退化, 甚至在基因组中没有留下任何痕迹。因此, 在大多数硬骨鱼中, 只发现了*IL17*受体基因的单拷贝。即硬骨鱼类中大多数物种与其他四足动物相比, *IL17*受体基因并未明显增多。同样经历了第四轮全基因组复制的大西洋鲑*IL17*受体基因也未发现加倍基因, 主要原因可能是鲑科鱼类第四轮全基因组复制时间发生在8 000万年前^[49], 虽然该时间点不如第三轮全基因组复制久远, 却也足够使基因发生丢失, 故大西洋鲑*IL17*受体基因也未明显增多。

通过鲤和斑马鱼基因组的比较连锁图谱以及微卫星分析^[20, 50], 发现与其他硬骨鱼类相比, 鲤发生了第四轮全基因组复制^[51], 并导致了鲤基因组中基因数量的突然加倍。除*IL17RB*外, 鲤*IL17*受体基因家族成员与其他硬骨鱼类直系同源基因相比, 基因拷贝数均加倍(表3)。这表明第四轮全基因组复制导致了鲤*IL17*受体基因的扩增, 鲤*aqp*, *frizzled*, *bmp*等基因家族的比较基因组学研究也支持了该观点^[52-54]。基于全基因组数据集的综合估算得出鲤第四轮全基因组复制发生时间大约在820万年前^[32]。由于复制发生时间较短, 故大多数基因还未退化或者改变, 因此保留了2个拷贝。而鲤*IL17RB*基因为单拷贝的主要原因可能是该基因在脊椎动物中较为重要, 故相较其他基因更加保守。极端保守的*IL17RB*基因对鲤生存至关重要, 其编码序列和拷贝数不允许有较大变化。因此, 复制后存在的丰富拷贝基因分泌大量冗余蛋白, 积累有害突变, 进而变成假基因, 然后从基因组中删除或发生较大变化。因此, 在鲤基因组中只识别到一个*IL17RB*基因拷贝。另外一个原因也可能是因为鲤是异源四倍体, 基因组特别复杂, 不完全的基因组装配和注释导致了*IL17RB*基因的缺失。

不同基因在不同组织的功能和作用也不一致。因此, 大多数硬骨鱼的*IL17*受体基因在不同组织中的表达模式也不相同^[55]。例如: 鲤与草鱼*IL17RA*和*IL17RB*的表达模式基本一致, 即在所有组织中均有所表达。但在斑点叉尾鲴中, 只有*IL17RA*在所有组织较高表达。另外, 大黄鱼*IL17RA*在肝脏高表达, 而虹鳟在肝脏中表达水平却较低^[56]。草鱼*IL17RC*在肠和后肾中有一定表达, 而鲤*IL17RC*的2个拷贝均不表达, 斑点叉尾

表3 12种脊索动物*IL17R*基因家族数量对比Tab. 3 Comparative analysis of *IL17R* genes of 12 chordate species

基因 gene	<i>IL17RA</i>	<i>IL17RB</i>	<i>IL17RC</i>	<i>IL17RD</i>	<i>IL17RE</i>
智人 <i>H. sapiens</i>	1	1	1	1	1
小鼠 <i>M. musculus</i>	1	1	1	1	1
家马 <i>E. caballus</i>	1	1	1	1	1
佛罗里达文昌鱼 <i>B. floridae</i>	1	-	-	1	-
斑点叉尾鲴 <i>I. punctatus</i>	1	1	1	1	1
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	1	1	1	1	1
斑马宫丽鱼 <i>M. zebra</i>	1	1	-	1	1
青鳉 <i>O. latipes</i>	1	1	-	1	1
大西洋鲑 <i>S. salar</i>	1	1	1	1	1
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	1	1	1	1	1
草鱼 <i>C. idella</i>	1	1	1	1	1
鲤 <i>C. carpio</i>	2	1	2	2	2

鲴*IL17RC*除在脑中不表达, 头肾中的表达量较低以外, 在其他组织中的表达量均较高^[12]。草鱼*IL17RD*在所有组织中都有所表达, 鲤*IL17RD*的2个拷贝在血液、皮肤和肝脏中没有表达, 而斑点叉尾鲴*IL17RD*在皮肤和肝脏中表达量较高。*IL17RE*在不同物种中的表达差异更大, 鲤*IL17RE*2个拷贝在鳃、肝脏和心脏中均高表达, 而草鱼在鳃、肝脏和心脏中均不表达, 斑点叉尾鲴*IL17RE*在鳃中表达量却较高, 在脑和后肾中不表达, 而在肝脏中的表达量较低^[13]。*IL17*受体基因在不同物种不同组织中的表达量确有很大差异^[57]。因为受体可促进其配体在组织中的功能发挥, 因此这些表达量的差异可能与其配体在不同组织中的表达水平有关。总之, 基因在不同物种和不同组织中的表达模式与它们在生物体内的功能和作用密切相关^[58]。

鲤*IL17*受体基因家族具有独特的组织表达模式。鳃作为鲤主要呼吸器官, 与外界水体直接接触, 故与鲤的免疫功能也密切相关。大多数*IL17*受体基因在鳃中均有较高表达, 可能预示着*IL17*受体基因在鳃中具有一定重要作用。此外, 鲤*IL17*受体基因在皮肤和心脏中只有*IL17RE*有所表达, 可能因为*IL17RE*在皮肤和心脏中的起到更加重要的作用。*IL17RA1*、*IL17RA2*和*IL17B*在肠和肝脏中表达量较高, 表明其在鲤肠和肝脏中

特异表达并具有一定特殊功能。另外,一些*IL17*受体基因成员2个拷贝间的表达谱也存在显著差异,预示着这些新出现的拷贝基因快速的功能分化。研究表明,除非一个基因产物具有很大优势,否则2个具有相同功能的基因在基因组中一般不能维持较长时间的稳定^[59]。因此,复制基因在某些功能方面将产生差异,如亚功能化等,这样便可以在基因组中保持一定的稳定性。鲤*IL17*受体基因家族的表达模式表明拷贝基因的快速进化及亚功能化在四倍体基因组中是普遍存在。显然,这些加倍的*IL17*受体基因表达的重大差异,为全基因组复制后的亚功能化提供证据。即祖先基因能够发挥所有功能,在组织中广泛表达,而复制后的基因拷贝执行部分功能,只部分表达或在某些组织中表达。拷贝基因的功能差异减少了功能表达冗余,进而避免了潜在的适应冲突。

参考文献:

- [1] Miossec P, Korn T, Kuchroo V K. Mechanisms of disease: Interleukin-17 and type 17 helper T cells[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 361(9): 888-898.
- [2] Hwang S Y, Kim H Y. Expression of IL-17 homologs and their receptors in the synovial cells of rheumatoid arthritis patients[J]. *Molecules and Cells*, 2005, 19(2): 180-184.
- [3] Saitoh T, Tsukamoto N, Koiso H, *et al.* Interleukin-17F gene polymorphism in patients with chronic immune thrombocytopenia[J]. *European Journal of Haematology*, 2011, 87(3): 253-258.
- [4] Aggarwal S, Gurney A L. IL-17: Prototype member of an emerging cytokine family[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002, 71(1): 1-8.
- [5] Ho A W, Gaffen S L. IL-17RC: A partner in IL-17 signaling and beyond[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2010, 32(1): 33-42.
- [6] You Z B, Dong Y, Kong X T, *et al.* Differential expression of IL-17RC isoforms in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancers[J]. *Neoplasia*, 2007, 9(6): 464-470.
- [7] Toy D, Kugler D, Wolfson M, *et al.* Cutting edge: Interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex[J]. *The Journal of Immunology*, 2006, 177(1): 36-39.
- [8] Rickel E A, Siegel L A, Yoon B R P, *et al.* Identification of functional roles for both IL-17RB and IL-17RA in mediating IL-25-induced activities[J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 181(6): 4299-4310.
- [9] Gaffen S L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(8): 556-567.
- [10] 郭小芹, 韩根成, 黎燕. IL-17/IL-17R信号转导机制及功能的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2012, 35(6): 416-421.
- Guo X Q, Han G C, Li Y. Research progress in the mechanism and function of IL-17/IL-17R signal transduction[J]. *International Journal of Immunology*, 2012, 35(6): 416-421(in Chinese).
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Wang X Q, Li C, Thongda W, *et al.* Characterization and mucosal responses of interleukin 17 family ligand and receptor genes in channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 38(1): 47-55.
- [14] Wu B J, Jin M, Zhang Y, *et al.* Evolution of the IL17 receptor family in chordates: A new subfamily IL17REL[J]. *Immunogenetics*, 2011, 63(12): 835-845.
- [15] 丁扬, 敖敬群, 艾春香, 等. 大黄鱼白细胞介素17受体E-like的分子特征及进化分析[J]. *应用海洋学学报*, 2016, 35(1): 107-115.
- Ding Y, Ao J Q, Ai C X, *et al.* Molecular characterization and evolutionary analysis of IL-17REL in *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2016, 35(1): 107-115(in Chinese).
- [16] Ding Y, Ai C X, Mu Y N, *et al.* Molecular characterization and evolution analysis of five interleukin-17 receptor genes in large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 332-339.
- [17] Chilton II E W, Muoneke M I. Biology and management of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Cyprinidae) for vegetation control: A North American perspective

- ive[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1992, 2(4): 283-320.
- [18] Fao R, F I. The state of world fisheries and aquaculture 2010[J]. *State of World Fisheries and Aquaculture*, 2010, 4(1): 40-41.
- [19] Xu J, Zhao Z X, Zhang X F, *et al.* Development and evaluation of the first high-throughput SNP array for common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 307.
- [20] Zhang X F, Zhang Y, Zheng X H, *et al.* A consensus linkage map provides insights on genome character and evolution in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(3): 275-312.
- [21] Xu P, Li J T, Li Y, *et al.* Genomic insight into the common carp (*Cyprinus carpio*) genome by sequencing analysis of BAC-end sequences[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 188.
- [22] Christoffels A, Bartfai R, Srinivasan H, *et al.* Comparative genomics in cyprinids: Common carp ESTs help the annotation of the zebrafish genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7(S5): S2.
- [23] Moens L N, van der Ven K, van Remortel P V, *et al.* Gene expression analysis of estrogenic compounds in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*) using a custom cDNA microarray[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2007, 21(5): 299-311.
- [24] Li J H, Liu F, Zhu Z Y, *et al.* A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 135.
- [25] Jin C, Li C, Huang R, *et al.* Transcriptome analysis of head kidney in grass carp and discovery of immune-related genes[J]. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8: 108.
- [26] Xu B, Wang S L, Jiang Y, *et al.* Generation and analysis of ESTs from the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Animal Biotechnology*, 2010, 21(4): 217-225.
- [27] Guo T, Leng X J, Wu X F, *et al.* Cloning, molecular characterization, and expression analysis of the signal transducer and activator of transcription 3(*STAT3*) gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(5): 1624-1634.
- [28] Chen Y, Pandit N P, Fu J J, *et al.* Identification, characterization and feeding response of peptide YYb (PYYb) gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(1): 45-55.
- [29] Feng K, Zhang G R, Wei K J, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution, and ontogenetic expression of ghrelin and regulation of expression by fasting and refeeding in the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *JEZ-A Ecological and Integrative Physiology*, 2013, 319(4): 202-212.
- [30] Yu E M, Liu B H, Wang G J, *et al.* Molecular cloning of type I collagen cDNA and nutritional regulation of type I collagen mRNA expression in grass carp[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2014, 98(4): 755-765.
- [31] Zhong S S, Jiang X Y, Sun C F, *et al.* Identification of a second *follistatin* gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and its regulatory function in myogenesis during embryogenesis[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 185: 19-27.
- [32] Xu P, Zhang X F, Wang X M, *et al.* Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(11): 1212-1219.
- [33] Wang Y P, Lu Y, Zhang Y, *et al.* The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(6): 625-631.
- [34] 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.
- [35] Sønder S U, Saret S, Tang W H, *et al.* IL-17-induced NF- κ B activation via CIKS/Act1: Physiologic significance and signaling mechanisms[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(15): 12881-12890.
- [36] Ohno S. *Evolution by Gene Duplication*[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 1970.
- [37] Spring J. Vertebrate evolution by interspecific hybridisation—are we polyploid?[J]. *FEBS Letters*, 1997, 400(1): 2-8.
- [38] 周莉, 汪洋, 桂建芳. 鱼类特异的基因组复制[J]. *动物学研究*, 2006, 27(5): 525-532.
Zhou L, Wang Y, Gui J F. Fish-specific genome duplication[J]. *Zoological Research*, 2006, 27(5): 525-532(in Chinese).
- [39] Franke A, Balschun T, Sina C, *et al.* Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at

- 7q22 and 22q13(*IL17REL*)[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(4): 292-294.
- [40] Hoegg S, Meyer A. Hox clusters as models for vertebrate genome evolution[J]. *Trends in Genetics*, 2005, 21(8): 421-424.
- [41] Taylor J S, van de Peer Y, Braasch I, *et al.* Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, 2001, 356(1414): 1661-1679.
- [42] Christoffels A, Koh E G L, Chia J M, *et al.* Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 21(6): 1146-1151.
- [43] Jaillon O, Aury J M, Brunet F, *et al.* Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype[J]. *Nature*, 2004, 431(7011): 946-957.
- [44] Volff J N, Scharlt M. Evolution of signal transduction by gene and genome duplication in fish[J]. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 2003, 3(1-4): 139-150.
- [45] Abascal F, Irisarri I, Zardoya R. Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2014, 1840(5): 1468-1481.
- [46] Conrad B, Antonarakis S E. Gene duplication: A drive for phenotypic diversity and cause of human disease[J]. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2007, 8: 17-35.
- [47] des Marais D L, Rausher M D. Escape from adaptive conflict after duplication in an anthocyanin pathway gene[J]. *Nature*, 2008, 454(c): 762-765.
- [48] Hahn M W. Distinguishing among evolutionary models for the maintenance of gene duplicates[J]. *Journal of Heredity*, 2009, 100(5): 605-617.
- [49] Lien S, Koop B F, Sandve S R, *et al.* The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization[J]. *Nature*, 2016, 533(7602): 200-205.
- [50] David L, Blum S, Feldman M W, *et al.* Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20(9): 1425-1434.
- [51] Wang J T, Li J T, Zhang X F, *et al.* Transcriptome analysis reveals the time of the fourth round of genome duplication in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 96.
- [52] Dong C J, Chen L, Feng J Y, *et al.* Genome wide identification, phylogeny, and expression of aquaporin genes in Common Carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0166160.
- [53] Chen L, Dong C J, Kong S N, *et al.* Genome wide identification, phylogeny, and expression of bone morphogenetic protein genes in tetraploidized common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Gene*, 2017, 627: 157-163.
- [54] Dong C J, Jiang L K, Peng W Z, *et al.* Phylogenetic and evolutionary analyses of the frizzled gene family in common carp (*Cyprinus carpio*) provide insights into gene expansion from whole-genome duplications[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144037.
- [55] Marjara I S, Chikwati E M, Valen E C, *et al.* Transcriptional regulation of IL-17A and other inflammatory markers during the development of soybean meal-induced enteropathy in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Cytokine*, 2012, 60(1): 186-196.
- [56] Yang Q, Sun Y N, Su X R, *et al.* Characterization of six IL-17 family genes in miuiu croaker and evolution analysis of vertebrate IL-17 family[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 49: 243-251.
- [57] Pappu R, Rutz S, Ouyang W J. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines[J]. *Trends in Immunology*, 2012, 33(7): 343-349.
- [58] Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A. The interleukin-17 cytokine family: Critical players in host defence and inflammatory diseases[J]. *Immunology*, 2011, 134(1): 8-16.
- [59] Zhang J Z. Evolution by gene duplication: An update[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2003, 18(6): 292-298.

Genome-wide identification, phylogeny, and expression of *IL17* receptor genes in common carp (*Cyprinus carpio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

DONG Chuanju^{1,2}, ZHANG Jiangfan¹, LI Shengjie³, LV Hongzao¹, NIE Guoxing¹, LI Xuejun^{1*}

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. National and Local Joint Engineering Laboratory for Freshwater Fish Breeding, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: To gain a better understanding of the evolution and action mode of the *IL17R* family in common carp (*Cyprinus carpio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), the two representative species of Cyprinidae, we analyzed them with the method of comparative genomics and bioinformatics. Sequence alignment and annotation were conducted in the genome database of common carp and grass carp as well as the analysis of genetic structure and phylogeny respectively. Finally, gene expression analysis was performed in 12 different tissues of these two species. We identified and characterized nine and five *IL17R* homologues. Along with genes annotation and nomenclature, phylogenetic analysis built on amino acid sequences of the *IL17R* proteins in 12 species showed highly conservative and no specific genes in teleosts. Comparative genomics showed that there was no significant increase in *IL17* receptor genes in most teleosts compared with tetrapods. Nevertheless, except for *IL17RB* genes, all of the members showed extensive gene duplications, leading to nine *IL17R* genes in common carp. Expression analysis of different tissues showed that the functions of different gene copies were differentiated after the whole genome duplication. Studies have shown that an additional round of duplication, also named teleost-specific (TS) WGD, or the 3R WGD, took place in the common ancestor of all extant teleosts. After duplication, one of the two redundant copies of a gene should theoretically have the freedom to degenerate and become lost from the genome without consequence. Also, it was generally hypothesized that, compared to other teleost, common carp had undergone additional whole genome duplication (the 4R WGD). The comprehensive estimation based on whole genome datasets suggested that the latest WGD event occurred around 8.2 MYA. Therefore, we postulated that the significant expansion of *IL17R* genes in the common carp genome may be the result of this additional WGD, which could have caused a sudden doubling of the *IL17R* genes and the *IL17RB* had been lost in their evolution history with the reason that the functions of genes were redundant and conservative. Expression profiling showed that most of the *IL17R* genes were expressed in a more-or-less tissue-specific fashion.

Key words: *Cyprinus carpio*; *Ctenopharyngodon idella*; *IL17* receptor; whole genome duplication; gene differentiation

Corresponding author: LI Xuejun. E-mail: xjli@htu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31801032); Modern Agriculture Industry Technology System Construction Projects of China Titled as-Staple Freshwater Fishes Industry Technology System (CARS-45-04); Open Project of National and Local Joint Engineering Laboratory for Freshwater Fish Breeding (KF-2016-03); Science and Technology Research of Henan Province (172102210348, 182102210081); Ph.D. Foundation of Henan Normal University (qd16159)