



鲤 *IL-17B* 基因序列特征、表达模式、原核重组蛋白的获得及其促炎作用

王钰婧¹, 徐逾鑫¹, 冯文荣^{1,2}, 李建林^{1,2}, 李红霞^{1,2}, 苏胜彦^{1,2},
宋长友^{1,2}, 唐永凯^{1,2*}, 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: 为了解鲤白细胞介素 17B 基因 (*IL-17B*) 的功能, 实验使用同源搜索和基因克隆技术在鲤基因组中挖掘到 2 个 *IL-17Bs* 基因 (*CcIL-17B1* 和 *CcIL-17B2*), 均有 3 个外显子和 2 个内含子, 编码 198 个氨基酸, 内含 *IL-17* 家族特有的由 4 个半胱氨酸形成的 2 个二硫键, 蛋白序列一致性高达 91.92%。共线性分析显示, 在硬骨鱼类染色体加倍过程中, *IL-17B* 及其附近基因出现了丢失, 大部分硬骨鱼类有 1 个 *IL-17B*、斑马鱼 2 个 *IL-17Bs* 均丢失, 而鲤特有的染色体加倍致使存在 2 个 *CcIL-17Bs*。实时荧光定量 PCR (qPCR) 结果显示, *CcIL-17Bs* 在鲤受精卵发育早期 (0~12 h) 和成鱼性腺中高表达。使用大肠杆菌表达系统, 获得了可溶的重组蛋白 NusA-17B。肛灌不同浓度的 NusA-17B, 结果显示, 高浓度 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 组的 1 和 3 d 的鲤肠道组织肠绒毛缺损, 出现大量的杯状细胞和炎性细胞, 定量分析显示, 炎症因子基因 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6*、趋化因子 *CCL20* 和 *NF- κ B* 的表达均显著上调; 7 d 时肠道组织结构和炎症相关基因的表达均得到恢复, 与对照组无显著差异。低浓度 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 和中浓度 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 肛灌实验, 除了中浓度 1 和 3 d 鲤肠道 *TRAF6* 的表达显著上调, 其余被检测基因的表达均与对照组无显著差异。使用不同浓度 (0.1、1.0、10.0 和 100.0 ng/mL) NusA-17B 孵育鲤肾组织 8 h, 结果显示, *IL-1 β* 在 0.1、1.0 和 100.0 ng/mL 的 NusA-17B 刺激下显著上调, *IFN- γ* 和 *NF- κ B* 分别只在 10.0 和 0.1 ng/mL 的 NusA-17B 刺激下显著上调, *IL-6* 及趋化因子 *CCL20* 能够在 10.0 和 100.0 ng/mL 的 NusA-17B 刺激下显著表达, *TRAF6* 则在 0.1、1.0 和 10.0 ng/mL 的 NusA-17B 刺激下显著表达。体内和体外实验结果表明 *CcIL-17B* 参与了炎症反应。

关键词: 鲤; *IL-17B*; 基因表达; 重组蛋白; 炎症反应

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

白细胞介素 17(interleukin-17, IL-17) 是一类重要的炎症因子, 能够诱导多种炎症相关的细胞因子、趋化因子及抗菌蛋白的产生, 在机体的宿

主防御中(抵抗病原体感染和自身免疫性疾病)发挥着重要作用^[1]。自 1993 年首次发现 *IL-17A* 之后, *IL-17* 家族其他成员相继被发现, 并按照发现顺序

收稿日期: 2021-08-05 修回日期: 2021-09-09

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费 (2018HY-ZD02, 2020TD37); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-45)

第一作者: 王钰婧(照片), 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: wangyujing029@163.com

通信作者: 唐永凯, 从事鱼类育种研究, E-mail: tangyk@ffrc.cn;

俞菊华, 从事生物技术与遗传育种研究, E-mail: yujh@ffrc.cn



命名为 IL-17B~F^[2-3]。IL-17A~F 在氨基酸序列上具有同源性, 尤其是在 C 端的 4 个保守 β 折叠以及 4 个半胱氨酸和 2 个丝氨酸残基形成的半胱氨酸结节上同源性更高, IL-17B、IL-17C 和 IL-17E 的 N 端相比 IL-17A 和 IL-17F 更长^[4-5]。2006 年, Gunimaladevi 等^[6]报道克隆和鉴定了斑马鱼 (*Danio rerio*)IL-17A/F、IL-17C、IL-17D, 接着大西洋鲑 (*Salmo salar*)IL-17D^[7], 红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) IL-17 家族基因^[8], 青鳉 (*Oryzias latipes*)IL-17A/F1^[9], 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)IL-17A/F2^[10-11], 斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)IL-17A/F1、IL-17A/F2 和 IL-17A/F3^[12], 欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*)IL-17A/F、IL-17C 和 IL-17D^[13], 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)IL-17A/F1 和 IL-17D^[14-15], 鳊 (*Miichthys miui*)IL-17A/F1、IL-17A/F2、IL-17A/F3、IL-17C 和 IL-17D^[16], 鲤 (*Cyprinus carpio*)IL-17A/F1、IL-17A/F2、IL-17C、IL-17D 和 IL-17N^[17-18] 等的 IL-17 家族基因被挖掘研究。

IL-17B 最初由 Li 等^[19]基于同源性从表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 数据库中克隆获得, 随后在胎儿组织的 cDNA 文库中扩增得到^[20]。人 (*Homo sapiens*)IL-17B 是一种由 180 个氨基酸组成的非共价二聚糖蛋白, 分子量约为 41 ku, 氨基酸与 IL-17A 的一致性为 27%, IL-17A 主要在活化的 T 细胞中产生, 而 IL-17B 则可以在性腺、肠道、胰腺等多个组织中表达^[21-23]。与 IL-17A 相比, IL-17B 不能直接诱导成纤维细胞分泌 IL-6^[19], 但可通过增强肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导成纤维细胞分泌 G-CSF 和 IL-6^[24], 还可刺激 THP-1 单核细胞系中 TNF- α 和 IL-1 β 的释放^[19], 表明 IL-17B 在炎症反应中也起着重要作用。至今为止, IL-17B 已被发现与胚胎发育^[25]、组织再生^[26]、肿瘤和染色体相关疾病^[27] 等相关。尽管鱼类 IL-17 家族在近年受到重视, 但 IL-17B 仅在斑点雀鲷 (*Lepisosteus oculatus*)^[28]、斑点叉尾鲷^[14] 等少数鱼中被挖掘到。

本实验使用同源搜索和基因克隆在鲤中挖掘到了 2 个 IL-17B 基因, 对鲤 IL-17Bs 基因序列特征和鱼类 IL-17B 的共线性进行分析; 通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 揭示鲤 IL-17Bs 的表达模式; 为获得足够的鲤 IL-17B 重组蛋白测定其功能, 构建了 IL-17B 重组表达质粒 pET43.1a-IL-17B, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达系统^[29-30], 获得了 NusA-17B 重组蛋白; 参照 Song 等^[31] 肛灌 NusA-

17B, 参照已有研究^[18,32-34]用 NusA-17B 孵育鲤肾组织, 通过切片和定量 PCR 测定炎症因子的表达, 在体内和体外确定鲤 IL-17B 的促炎作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鲤及鲤早期胚胎样品均来自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地。

鲤受精卵不同发育时期及仔鱼采样方法参照张磊等^[34]研究, 分别采集受精 0.5 h (胎盘出现)、12 h (原肠中期)、25 h (肌节出现)、35 h (脑泡出现)、60 h (心脏、眼点出现) 和 90 h (即将破膜) 的受精卵以及孵化 1、4、7 和 14 d 的仔鱼。

鲤成鱼雌、雄各 3 尾, 麻醉后采集心脏、肝脏、脾脏、体肾、头肾、肠、脑、鳃、皮肤、肌肉、精巢和卵巢 12 个组织, 于 -80 °C 冰箱保存。

肛灌鲤为当年人工繁殖的同池养殖品种, 平均体重 50 g, 暂养于室内循环水养殖系统, 系统内单个养殖桶规格为 400 L, 每桶 20 尾, 每日投喂 1% 体重的鲤商品饲料, 间歇式充氧, 溶氧量 (6 ± 1) mg/L, pH 为 7.2~7.6。

1.2 实验引物

根据 Blast 和共线性分析在鲤全基因组^[35]中挖掘到的 2 个 *CcIL-17Bs* 基因序列, 设计引物对 IL-17B1-F 和 IL-17B12-R 扩增 *CcIL-17B1* 全长 cDNA, IL-17B3-F 和 IL-17B12-R 扩增 *CcIL-17B2* 全长 cDNA。IL-17B-F 和 IL-17B-R 用于构建 *CcIL-17B1* 原核重组表达载体, 5'端分别增加了 *BamH I* 和 *Sal I* 酶切位点及 6 个 His 标签。引物对 *CcIL-17B1*-DF、*CcIL-17B1*-DR 及引物对 *CcIL-17B2*-DF、*CcIL-17B2*-DR 分别为 *CcIL-17B1* 和 *CcIL-17B2* 的 qPCR 引物。鲤 IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、CCL20、NF- κ B、TRAF6 及 β -actin 定量引物见张磊等^[34]。所有引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成 (表 1)。

1.3 鲤 IL-17B 序列分析

鲤 IL-17B 基因所在连锁群信息来自 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 使用 Genomicus (v95.01)^[36] 对鱼类 IL-17B 基因进行共线性分析。使用 Exon-Intron Graphic Maker (<http://www.wormweb.org/exon-intron>) 制作基因结构示意图。使用 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析 cDNA 和蛋白的一致性。使用 DNASTar 分析蛋白的等电点 (pI)。

表 1 *CcIL-17B1* 和 *CcIL-17B2* 序列扩增、表达载体构建和 qPCR 引物

引物 primers	核苷酸序列(5'-3') nucleotide sequence (5'-3')	登录号 gene accession no.
IL-17B1-F	TGGAAGAATATATGGAATAAG	LHQP01033388
IL-17B1-R	CTACCCACGATGCACGTGCAC	
IL-17B2-F	TGAAAAATATATTGAATAAG	NC_031705.1
IL-17B-F	CGGGATCCAAATACAATAGCAAAGAAG	LHQP01033388
IL-17B-R	ACGCGT <u>CGAC</u> TTAGTGGTGATGATGATGGTGGCCCAATGCAG	
CcIL-17B1-DF	CTTTGGATGTCCAACAGTCGCAGT	LHQP01033388
CcIL-17B1-DR	TGGCCGGTGGCACAGGAC	
CcIL-17B2-DF	CTTTGGATGTCCAACAGTCGCAGC	NC_031705.1
CcIL-17B2-DR	GGTTGGCCGATGGCACATTAG	

注: 直线下划线为 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点, 波浪下划线为 6 个 His 标签。

Notes: Straight underline is *Bam*H I and *Sal* I restriction sites, and the wavy underline is 6 His tags.

SignalP 4.1 软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 NCBI 分别用于预测信号肽位置和中心结构域。

1.4 总 RNA 提取、逆转录和 qPCR

用总 RNA 抽提试剂盒 (Omega Bio-Tek, 上海) 抽提各样品总 RNA, 纯度和完整性分别用 OD_{260/280} 及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。使用 Primer Script™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa, 大连) 试剂盒合成 cDNA。qPCR 使用荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq II™ (TaKaRa, 大连)。

1.5 原核重组表达质粒的构建及表达纯化

以 *CcIL-17B1* 全长 cDNA 克隆载体为模板, P4-P5 为引物, PCR 扩增 *IL-17B1* 成熟肽片段, 使用胶回收试剂盒 (TaKaRa, 大连) 回收, 经 *Bam*H I 和 *Sal* I 限制性核酸内切酶 (TaKaRa, 大连) 酶切后, 与同样被双酶切线性化的 pET43.1a (杭州研真生物科技有限公司) 连接。连接产物转化入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 敏感态细胞 (TransGen Biotech, 北京), 使用菌液 PCR 和双酶切筛选阳性单克隆, 送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序确定。

将重组表达载体 pET43.1a-*IL-17B* 转入大肠杆菌 *Transsta*(DE3) 感受态细胞 (TransGen Biotech, 北京), 挑取单克隆于 10 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 37 °C 200 r/min 培养过夜。次日以 1:100 (体积比) 扩大培养, 37 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 值 0.6~0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 于 25 °C 诱导 8~12 h。180 r/min 离心收集

细菌, 加入非变性裂解液、PMSF (碧云天生物技术) 超声, 取总菌和上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

使用 BeyoGold™ His-tag Purification Resin (碧云天生物技术) 纯化可溶性蛋白 NusA-17B, 再使用多黏菌素 B 树脂 (G-Biosciences, 美国) 去除内毒素, 去除内毒素后用鲎试剂 (厦门鲎试剂生物科技股份有限公司) 确定无内毒素残留情况, 将去除内毒素的蛋白超滤浓缩于磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中。与不同浓度的牛血清白蛋白 (BSA 蛋白) (Sigma Aldrich, 上海) 标准品进行 SDS-PAGE 电泳, 使用凝胶成像系统 Tanon GIS imagine (天能科技有限公司) 比较灰度确定蛋白浓度。

1.6 重组蛋白的促炎作用

灌肠实验 参照 Song 等^[31] 方法, 取暂养鲤 120 尾 (平均体重 50 g), 分为 6 组。I 组不做任何处理; II 组肛灌 100 μ L 生理盐水; III 组肛灌 NusA (蛋白量/鱼体重: 500 μ g/kg); IV~VI 组肛灌 NusA-17B (蛋白量/鱼体重: 5、50 和 500 μ g/kg)。肛灌后 0、1、3 和 7 d, 每组各取 4 尾鱼, 取中肠, 提取总 RNA, 使用 qPCR 测定 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6*、*CCL20*、*NF- κ B* 和 *TRAF6* 的表达水平; 用 10% 甲醛溶液固定高浓度组中肠组织, 用石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红 (H.E) 染色, 显微观察组织炎症情况。

孵育肾组织 参照已有方法^[18,34], 用不同浓度去内毒素的 NusA-17B (0.1、1.0、10.0 和 100.0 ng/mL)、NusA (100.0 ng/mL) 和 83 °C 失活的 NusA-17B (100.0 ng/mL) 分别孵育鲤体肾组织, 每组 4

个重复, 8 h后提取总 RNA, 测定 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6*、*CCL20*、*NF- κ B* 和 *TRAF6* 的表达水平。

1.7 数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[37] 计算目标基因相对表达量。数据采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 及 Tukey 氏多重检验, 差异显著水平为 $P < 0.05$, 实验数据以平均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。

2 结果

2.1 鲤 *IL-17B* 的序列分析

鲤 *IL-17B* 的序列特征 根据 Blast 和共线性分析在鲤基因组中挖掘到 *CcIL-17B1* 和 *CcIL-*

17B2, 分别位于连锁群 LHQP01033388 和 NC_031705.1 上。PCR 扩增得到目的基因 *CcIL-17B1* 和 *CcIL-17B2* 的条带, 测序结果发现与基因库序列一致。2 个基因均由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 内含子长度分别为 84、420 和 81、851 bp; 开放阅读框均为 597 bp, 均由外显子 1 后端的 24 bp、外显子 2 的 320 bp 和外显子 3 前端的 253 bp 组成 (图 1)。2 个基因 cDNA 序列一致性为 89%, 编码 198 个氨基酸, 其中 N 端 24 个氨基酸为信号肽。成熟肽 N 端 82 个氨基酸, 保守的中心结构域 90 个氨基酸, 内有 IL-17 家族特有的 4 个半胱氨酸, 形成 2 个二硫键, C 端 2 个氨基酸。成熟肽分子量分别为 22.58 和 22.49 ku, 等电点 (pI) 分别为 9.59 和 9.83, 蛋白一致性为 91.92%。

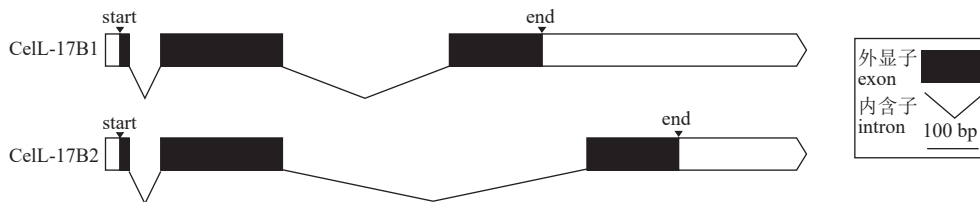


图 1 *CcIL-17Bs* 的基因结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of *CcIL-17Bs*

鱼类 *IL-17B* 的共线性分析 使用 Genomicus(v95.01) 进行雀鳊、斑点叉尾鲷、盲鱼 (*Piscis blindus*)、斑马鱼和鲤 *IL-17B* 的共线性分析。雀鳊基因组有 1 个连锁群存在 *IL-17B* 基因, 其上游基因为 *pcyox11*、*ppp2r2bb* 和 *GPR151*, 下游基因为 *rpl26* 和 *atp6v0E1*。经过 TGD (teleost genome duplication) 后, 在斑点叉尾鲷、盲鱼和斑马鱼均发现了 2 个与斑雀鳊 *IL-17B* 所在连锁群相似的连锁群, 斑点叉尾鲷 (Chr.14) 和盲鱼 (Chr.APWO 02000111.1) 上找到了 *IL-17B*, 且 *rpl26* 保守区位于其下游; 另一个连锁群则均丢失 *IL-17B*, 但 *ppp2r2bb*、*pcyox11* 和 *atp6v0E1* 存在于斑马叉尾鲷的连锁群上; *GPR151* 和 *ppp2r2bb* 基因存在于盲鱼的连锁群上。而在斑马鱼的两条相似的连锁群 (Chr.14 和 Chr.21) 上均未发现 *IL-17B* 基因, Chr.14 上有 *GPR151*、*ppp2r2bb*、*rpl26* 和 *atp6v0E1*, 丢失了 *pcyox11* 和 *IL-17B*, Chr.21 有 *ppp2r2bb* 和 *pcyox11*, 未找到 *IL-17B* 和 *rpl26*。鲤经 CcSGD (Common carp specific genome duplication) 后, 在现有的鲤基因组找到 3 个相似的连锁群, 2 条连锁群上存在 *IL-17B* 基因, 其中 1 条连锁群 *rpl26* 基因保守区位于 *IL-17B* 的下游 (图 2)。

2.2 鲤 *IL-17Bs* 基因表达

CcIL-17Bs qPCR 引物特异性验证 使用 *CcIL-17B1* 和 *CcIL-17B2* 的 qPCR 引物 (表 1) 进行 PCR 扩增, 产物经 *BseL I* 酶切后琼脂糖凝胶电泳显示 (图 3), *CcIL-17B1* 的 PCR 产物能被 *BseL I* 完全酶切成 2 条大小分别为 57 和 147 bp 的条带; *CcIL-17B2* 的 PCR 产物未被酶切, 条带大小和序列一致, 表明 2 对引物分别是 *CcIL-17B1* 和 *CcIL-17B2* 的特异性引物。

2.3 鲤 *IL-17Bs* 基因表达

使用 qPCR 测定鲤受精卵发育阶段、仔鱼阶段以及成鱼不同组织中 *IL-17Bs* 的表达。结果显示, *CcIL-17B1* 和 *CcIL-17B2* 在鲤受精后 0~12 h 的表达量显著高于受精后 25~90 h 以及出膜后 1~14 d 的表达量 ($P < 0.05$) (图 4-a, b)。 *CcIL-17B1* 和 *CcIL-17B2* 在成鱼不同组织中均能检测到有表达, 但性腺中表达量显著高于其他组织, 且在精巢中的表达量显著高于卵巢 ($P < 0.05$) (图 4-c, d)。 *CcIL-17B1* 在其他组织中的表达量为肌肉、脑、肝脏、皮肤高于肠、头肾、脾脏、鳃、心脏、体肾, 但只有肌肉显著高于肠、头肾、脾脏、鳃、心脏

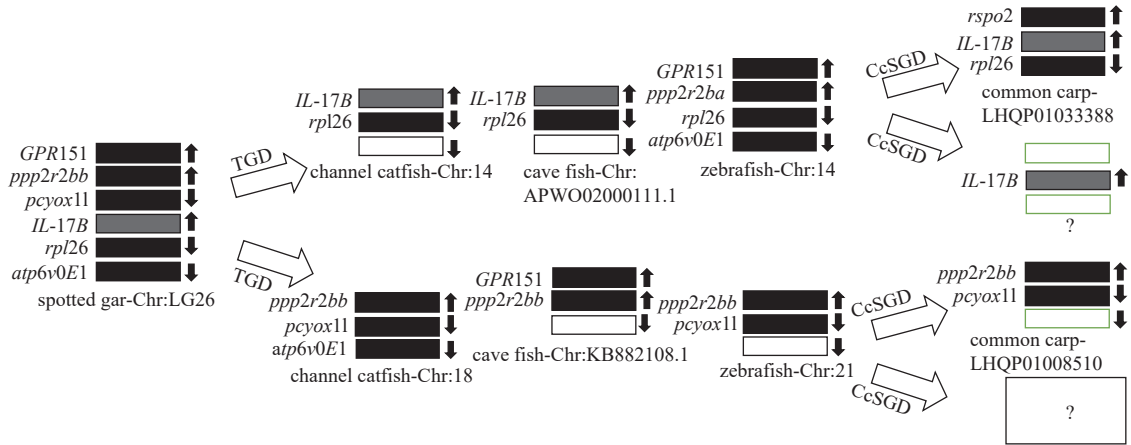


图 2 硬骨鱼类及其祖先 *IL-17B* 的共线性分析

箭头方向表示转录方向。

Fig. 2 Schematic diagram of synteny of *IL-17B* in teleosts and their ancestors

Arrows indicate the transcriptional orientation. *pcyox11*, prenylcytostine oxidase 1 like; *rpl26*, ribosomal protein L26; *rspo2*, R-spondin 2; *GPR151*, G protein-coupled receptor 151; *ppp2r2ba/b*, protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta a/b; *atp6v0E1*: ATPase H+ transporting V0 subunit e1.

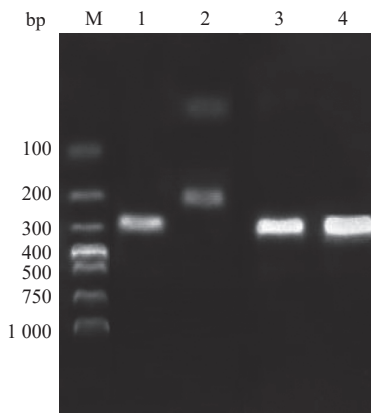


图 3 *CcIL-17Bs* qPCR 引物特异性验证

M. DL1000™ DNA marker; 1 和 2 分别为 *CcIL-17B1* 扩增片段以及 *BseI* I 酶切结果; 3 和 4 分别为 *CcIL-17B2* 扩增片段以及 *BseI* I 酶切结果。

Fig. 3 *CcIL-17Bs* qPCR primer specificity verification

M. DL1000™ DNA marker; 1 and 2 are *CcIL-17B1* amplified fragment and *BseI* I digestion results respectively; 3 and 4 are *CcIL-17B2* amplified fragment and *BseI* I digestion results, respectively.

和体肾 ($P < 0.05$), 头肾、脾脏、鳃、心脏和体肾没显著差异 ($P > 0.05$)(图 4-c); *CcIL-17B2* 在皮肤和脑的表达水平差异不显著, 但在皮肤的表达量显著高于除脑外的其他组织 ($P < 0.05$)(图 4-d)。

2.4 重组质粒的表达产物及纯化

SDS-PAGE 电泳检测, 结果显示, NusA-17B 上清液中有表达, 在分子量 81.2 ku 处有一条特异性高表达条带, 与预测 NusA-17B 蛋白的大小一致 (图 5-a), 每克总菌约获得 0.23 mg NusA-17B 蛋白 (图 5-b)。

2.5 肛灌 NusA-17B 后鲤肠道组织学观察

鲤肛灌高浓度 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) NusA-17B 后, 1 和 3 d 摄食量减少、游动缓慢、肛门红肿, 7 d 时摄食量和游动速度回复正常, 肛门红肿也基本消失。切片显示, 肛灌 1 和 3 d 的肠道组织中肠绒毛缺损, 出现大量的杯状细胞以及炎性细胞聚集的现象 (图版-2, 3); 肛灌 7 d 时, 肠道组织中的杯状细胞明显减少, 肠绒毛结构完整, 炎性细胞减少, 与对照组相似 (图版-1, 4)。

2.6 肛灌 NusA-17B 对鲤肠道 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6*、*CCL20*、*NF- κ B*、*TRAF6* 表达的影响

使用 qPCR 测定肛灌各组细胞因子的表达水平, 结果显示, NusA 组炎症因子 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6*, 趋化因子 *CCL20*, *NF- κ B* 和 *TRAF6* 的表达量与未处理组、生理盐水组无显著性差异 ($P > 0.05$)。

肛灌 5 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ NusA-17B 在 1、3 和 7 d 均不能刺激炎症因子 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6*, 趋化因子 *CCL20* 和 *NF- κ B* 的显著上调 ($P > 0.05$), 只有 *TRAF6* 在 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ NusA-17B 的刺激下 1 和 3 d 的表达量显著上调, 分别为对照组的 5.60 和 2.98 倍 ($P < 0.05$)(图 6-f)。肛灌 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ NusA-17B, 1 和 3 d 各基因均显著上调 ($P < 0.05$), 在 7 d 恢复到与对照组无明显差异 ($P > 0.05$), 炎症因子 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 在 1 和 3 d 的表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其中 1 d 的表达量分别为对照组的 1.64、3.75、14.65 倍, 3 d 时的表达量分别为对照组的 3.76、13.27 和 13.73 倍 (图 6-a~c); 趋化因子 *CCL20*

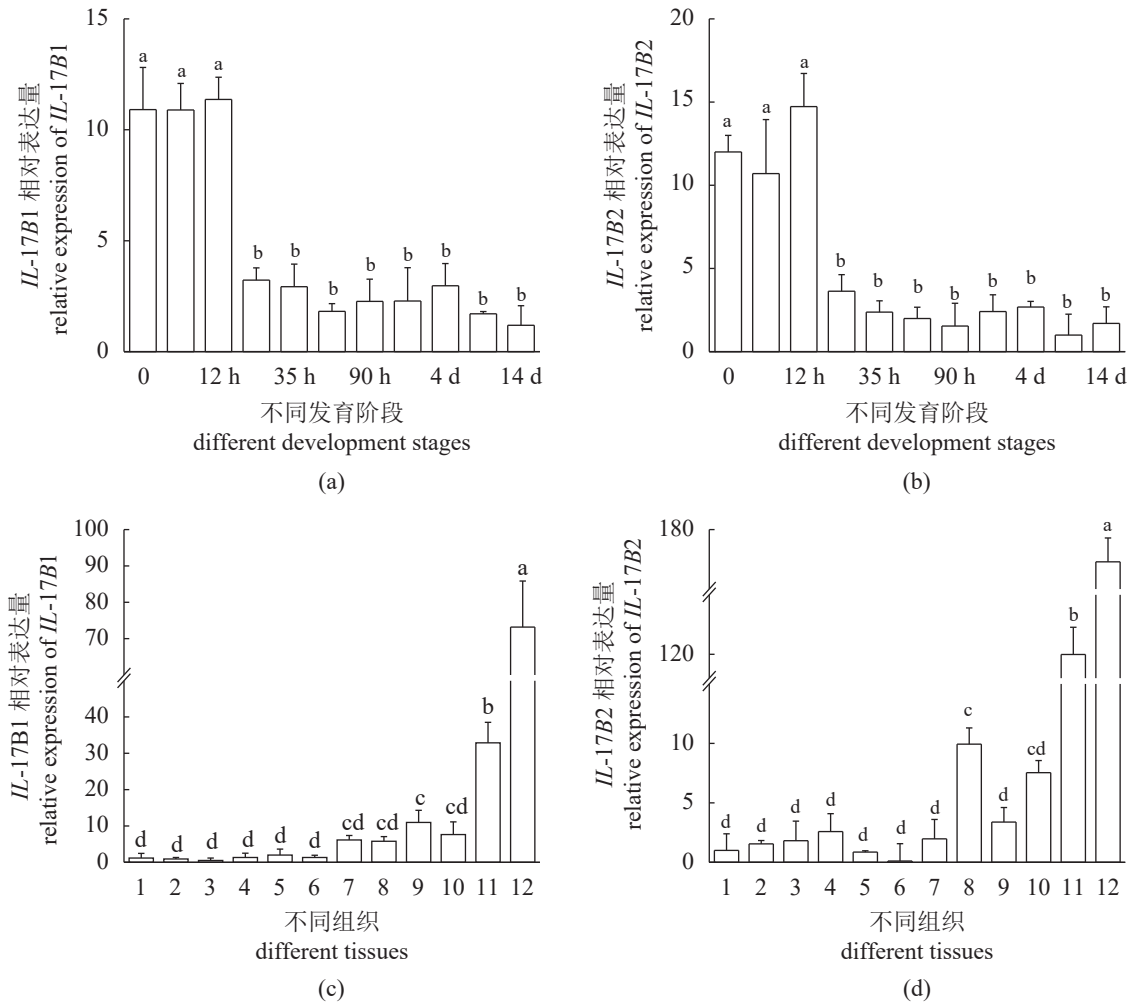


图4 *IL-17Bs* 在鲤不同发育阶段及不同组织中的表达

(a) *CcIL-17B1* 在鲤胚胎发育及幼鱼不同时期的表达; (b) *CcIL-17B2* 在鲤胚胎发育及幼鱼不同时期的表达; (c) *CcIL-17B1* 在鲤成鱼不同组织的表达; (d) *CcIL-17B2* 在鲤成鱼不同组织的表达; (a) 和 (b) 内基因相对表达量以 7 d 时 *CcIL-17B2* 的相对表达量为 1; (c) 和 (d) 内基因相对表达量以鲤脾脏中 *CcIL-17B2* 的相对表达量为 1; 高为平均值, 线长为标准差 ($n=3$); 不同小写字母表示不同组的差异显著性 ($P<0.05$)。1. 脾脏; 2. 心脏; 3. 体肾; 4. 头肾; 5. 肠; 6. 鳃; 7. 肝脏; 8. 皮肤; 9. 肌肉; 10. 脑; 11. 卵巢; 12. 精巢。

Fig. 4 Expression of *IL-17Bs* in different development stages and various tissues of *C. carpio*

(a) expression of *CcIL-17B1* in different development stages; (b) expression of *CcIL-17B2* in different development stages; (c) expression of *CcIL-17B1* in different tissues of adult *C. carpio*; (d) expression of *CcIL-17B2* in different tissues of adult *C. carpio*; data in (a) and (b) are normalized to the level of *CcIL-17B2* on 7 d; data in (c) and (d) are normalized to the level of *CcIL-17B2* on spleen; The height of column represents mean and the length of line represented SD ($n=3$); different lowercase letters indicate the significance of differences in different groups ($P<0.05$). 1. spleen; 2. heart; 3. kidney; 4. head kidney; 5. intestine; 6. gill; 7. liver; 8. skin; 9. muscle; 10. brain; 11. ovary; 12. testis.

以及 *NF- κ B* 只在 3 d 的表达量显著高于对照组 ($P<0.05$), 分别为对照组的 13.89 和 4.30 倍 (图 6-d, e)。

2.7 NusA-17B 对鲤肾组织 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6*、*CCL20*、*NF- κ B*、*TRAF6* 表达的影响

使用不同浓度的 NusA-17B 蛋白 (0.1、1.0、10.0 和 100.0 ng/mL)、NusA (100.0 ng/mL) 和 83 °C 失活的 NusA-17B (100.0 ng/mL) 孵育鲤肾组织 8 h。结果显示, NusA 组炎症因子 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6*、趋化因子 *CCL20*, *NF- κ B* 和 *TRAF6* 的表达与 83 °C

失活的 NusA-17B 组无显著性差异 ($P>0.05$)。

使用 0.1 ng/mL 的 NusA-17B 孵育鲤肾组织 8 h 后, 炎症因子 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 和 *IL-6* 以及趋化因子 *CCL20* 的表达量与对照组无显著性差异 ($P>0.05$), 只有和通路相关的因子 *NF- κ B* 和 *TRAF6* 的表达量显著上调 ($P<0.05$), 分别为对照组的 2.04 和 1.68 倍, 其中 *TRAF6* 的表达量在 1.0 和 10.0 ng/mL 的 NusA-17B 的刺激下也可以显著表达 ($P<0.05$), 分别为对照组的 3.00 和 2.04 倍 (图 7-e, f)。

炎症因子 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 和 *IL-6* 以及趋化因子

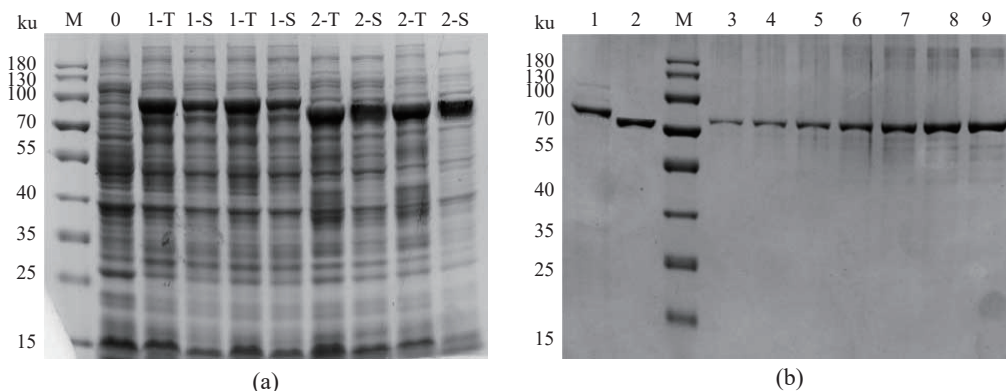
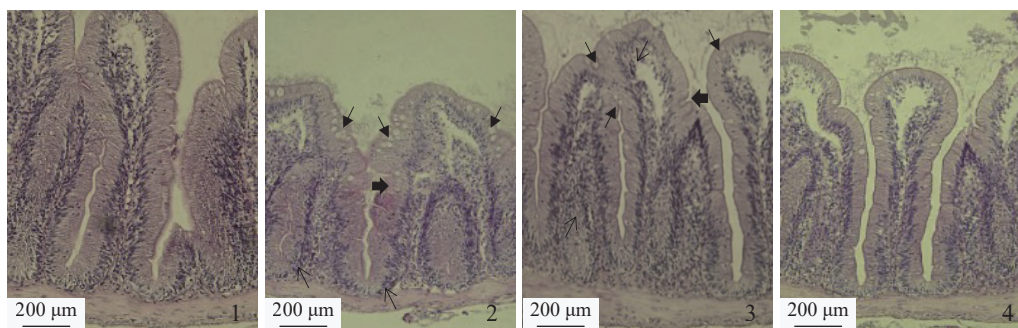


图5 NusA-17B、NusA 的表达和蛋白浓度确定

(a) M. 预染蛋白 marker; 0. 阴性对照; 1. NusA-17B; 2. NusA; T. 总菌; S. 上清液。(b) M. 预染蛋白 marker; 1. NusA-17B; 2. NusA; 3~9 分别为 0.250、0.375、0.500、1.000、2.000 和 2.500 μg BSA 标准样品。

Fig. 5 The expression of NusA-17B、NusA and determination of protein concentration

(a) M. pre-stained protein marker; 0. negative control; 1. NusA-17B; 2. NusA; T. total bacteria; S. supernatant. (b) M. pre-stained protein marker; 1. NusA-17B; 2. NusA; 3-9 are 0.250, 0.375, 0.500, 1.000, 2.000 and 2.500 μg BSA, respectively.



图版 肛灌 NusA-17B 后鲤肠道组织损伤随着时间的变化

1. 0 d; 2. 1 d; 3. 3 d; 4. 7 d; \blacktriangle 表示炎性细胞聚集; \blacktriangle 表示杯状细胞增生区; \blacktriangle 表示绒毛缺损区; 标尺为 200 μm 。

Plate Changes of common carp intestinal tissue damage over time after anal irrigation with NusA-17B

1. 0 d; 2. 1 d; 3. 3 d; 4. 7 d; \blacktriangle indicates inflammatory cell aggregation; \blacktriangle indicates areas of goblet cell hyperplasia; \blacktriangle indicates areas of villus defect; scale is 200 μm .

CCL20 的表达量在 1.0、10.0 和 100.0 ng/mL NusA-17B 的刺激下显著上调 ($P < 0.05$), 炎症因子 *IL-1 β* 在 1.0、10.0 和 100.0 ng/mL NusA-17B 的刺激下表达量显著上调 ($P < 0.05$), 分别为对照组的 3.71、7.30 和 6.24 倍 (图 7-a); *IFN- γ* 的表达量只在 10.0 ng/mL NusA-17B 的刺激下显著上调 ($P < 0.05$), 为对照组的 2.39 倍 (图 7-b); *IL-6* 和趋化因子 *CCL20* 在 10.0 和 100.0 ng/mL NusA-17B 的刺激下显著上调 ($P < 0.05$), 其中 10.0 ng/mL 时分别为对照组的 8.49 和 2.14 倍, 100.0 ng/mL 时分别为对照组的 6.17 和 1.62 倍 (图 7-c, d)。

3 讨论

3.1 鲤 *IL-17B* 基因

本实验使用同源搜索和 PCR、qPCR 挖掘到

2 个鲤 *IL-17B* 基因 (*CcIL-17B1* 和 *CcIL-17B2*), 它们均有 IL-17 家族特有的中心结构域, 内含有 4 个半胱氨酸形成的 2 个高度保守的二硫键^[38]。共线性分析揭示 TGD 过程引起了 *IL-17B* 所在连锁群基因的丢失, 导致斑点叉尾鲷和盲鱼只有 1 个 *IL-17B* 基因, 而斑马鱼中未找到 *IL-17B* 基因, 鲤经 CcSGD 后, 有 2 条连锁群存在 *IL-17B* 基因, 这表明在染色体加倍过程中出现了基因丢失, 该现象在 Kim 等^[39] 的研究中也有报道。

3.2 鲤 *IL-17B* 基因表达特征

qPCR 结果显示, *CcIL-17B1* 和 *CcIL-17B2* 在鲤受精卵发育早期阶段 (0~12 h) 表达量显著高于其后各阶段, 这与该基因主要在成鱼性腺中的表达相互印证。本实验结果与小鼠 (*Mus musculus*) 胚胎 *IL-17B* 高表达类似^[40], 但与人主要在胰腺、

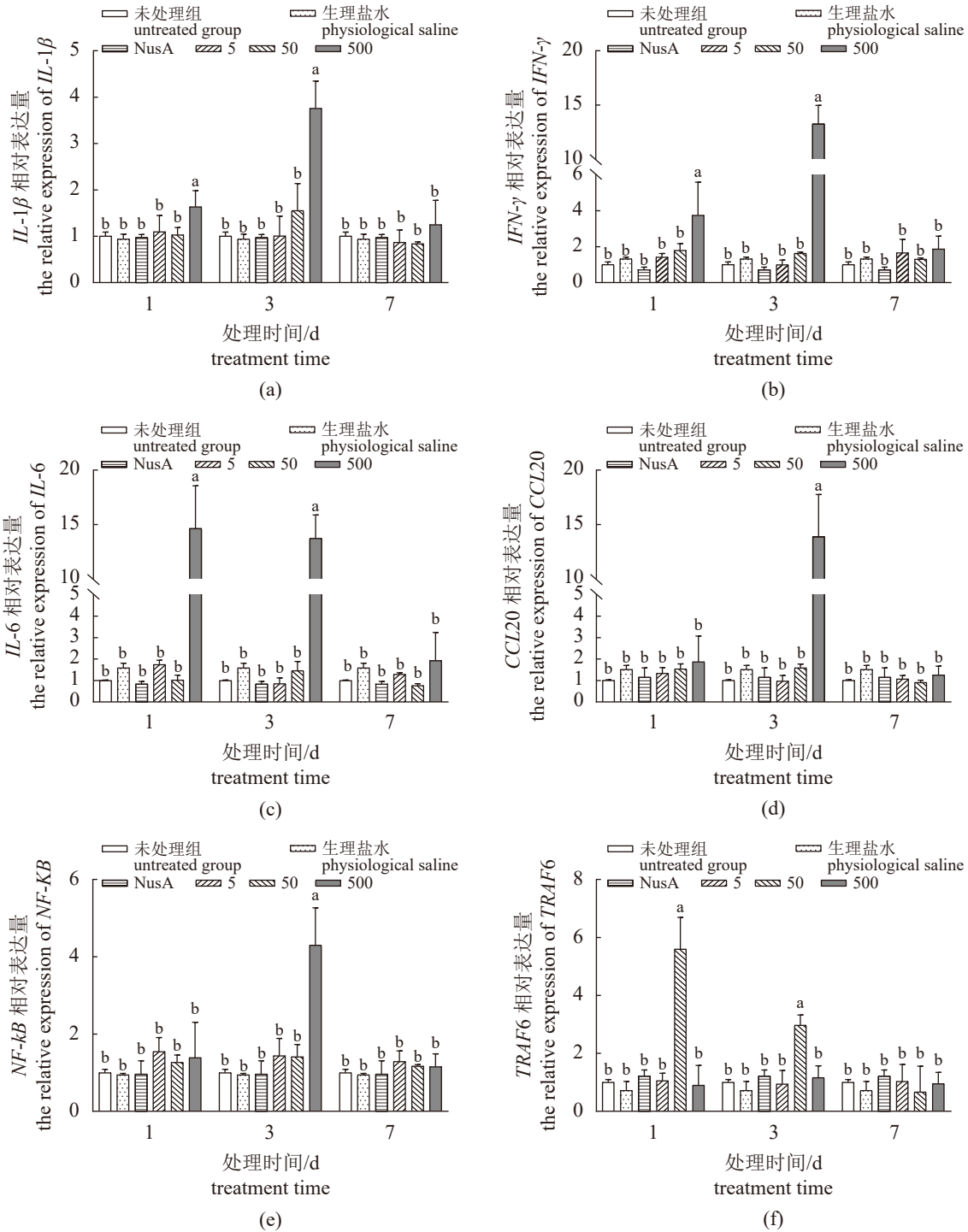


图 6 肛灌 NusA-17B 对鲤肠道 $IL-1\beta$ 、 $IFN-\gamma$ 、 $IL-6$ 、 $CCL20$ 、 $NF-\kappa B$ 和 $TRAF6$ 表达的影响

(a) $IL-1\beta$; (b) $IFN-\gamma$; (c) $IL-6$; (d) $CCL20$; (e) $NF-\kappa B$; (f) $TRAF6$; 生理盐水.100 μ L 生理盐水; NusA.500 μ g/kg NusA; 5, 50, 500 分别表示 5, 50 和 500 μ g/kg 的 NusA-17B; 以未处理组为对照组, 对照组相对表达量为 1; 高为平均值, 线长为标准差 ($n=4$); 不同小写字母表示不同组的差异显著 ($P < 0.05$); 下同。

Fig. 6 Effect of NusA-17B injection through the anus on the expression of $IL-1\beta$, $IFN-\gamma$, $IL-6$, $CCL20$, $NF-\kappa B$ and $TRAF6$ in *C. carpio* intestine

(a) $IL-1\beta$; (b) $IFN-\gamma$; (c) $IL-6$; (d) $CCL20$; (e) $NF-\kappa B$; (f) $TRAF6$; physiological saline.100 μ L physiological saline; NusA. 500 μ g/kg NusA; 5, 50, 500 respectively represent 5, 50 and 500 μ g/kg NusA-17B. Data are normalized to the expression level of the untreated group; height of column represents the mean and the length of line represents SD ($n=4$); different lowercase letters indicate the significance of differences in different groups ($P < 0.05$); the same below.

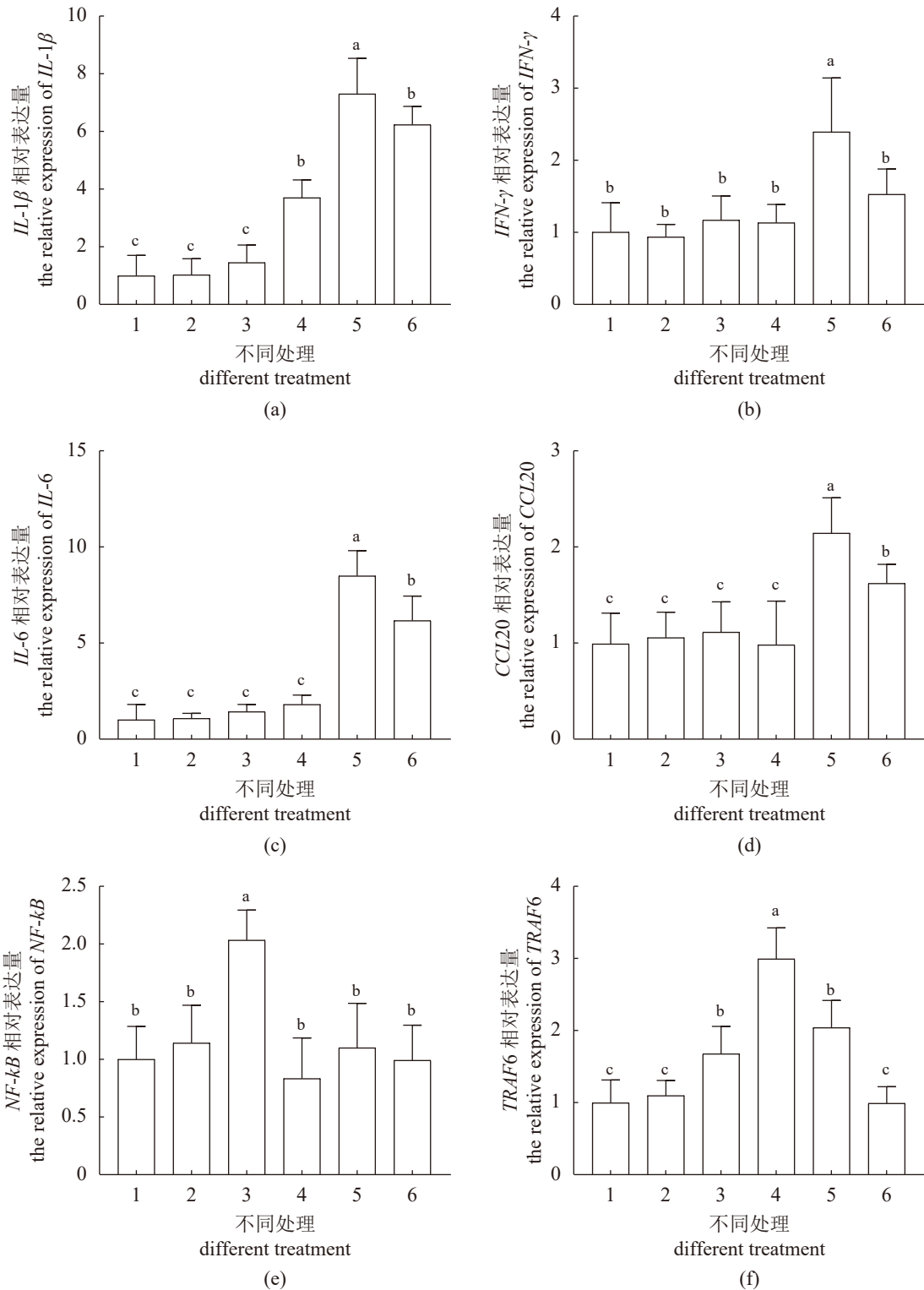


图7 NusA-17B 孵育对鲤肾组织 *IL-1β*、*IFN-γ*、*IL-6*、*CCL20*、*NF-κB* 和 *TRAF6* 表达的影响

1. 83 °C 灭活的 NusA-17B; 2. 100.0 ng/mL 的 NusA; 3-6 分别表示 0.1、1.0、10.0 和 100.0 ng/mL 的 NusA-17B; 基因相对表达量以 NusA-17B 组的相对表达量为 1; 高为平均值, 线长为标准差 ($n=4$)。

Fig. 7 Effect of NusA-17B incubation on the expression of *IL-1β*, *IFN-γ*, *IL-6*, *CCL20*, *NF-κB* and *TRAF6* in *C. carpio* kidney tissue

1. inactive NusA-17B at 83 °C; 2. 100.0 ng/mL of NusA; 3-6 represent NusA-17B with concentrations of 0.1, 1.0, 10.0 and 100.0 ng/mL, respectively. Data in (a) -(f) are normalized to the level of NusA-17B; the height of column represents the mean and the length of line represents SD ($n=4$).

小肠和胃中表达, 精巢的表达较低存在差异^[20], 可能 *IL-17B* 在不同物种的功能不完全一致。此外, *CcIL-17Bs* 主要在性腺表达与 *CcIL-17A/F2s* 主要在皮肤表达^[18], *CcIL-17Ns*^[34] 主要在脑表达也存在着差异, 显示同一家族基因出现了功能分化, 也暗示 *IL-17B* 在鲤性腺或者胚胎发育中有着重要的作用^[41]。

3.3 鲤 *IL-17B* 促炎作用

现有研究表明, 哺乳动物 *IL-17* 家族多个成员能够诱导炎性细胞因子的产生, 引发炎症反应^[22]。Kawaguchi 等^[2] 报道 *IL-17A/F* 通过诱导 *IFN- γ* 等增加了小鼠肺部炎症反应; Lee 等^[42] 报道 *IL-17E* 可以诱导 TK10 细胞产生促炎性趋化因子 *IL-8* 的产生; *IL-17B* 则在较多组织表达, 在胚胎发育、组织再生以及炎症和自身免疫性疾病等均发挥着作用^[41]。Hoang 等^[43] 表明鸡 (*Gallus gallus domesticus*) *IL-17B* 可以显著上调 HD11 和 OU2 细胞中 *IL-1 β* 及 *IL-6* 的表达量; Shi 等^[20] 通过腹腔注射小鼠 *IL-17B* 引起能够中性粒细胞的迁移, 表明 *IL-17B* 也是促炎因子。鱼类研究也表明, *IL-17* 家族中的多个成员有促炎作用, 如 Monte 等^[11] 报道, 虹鳟 *IL-17A/F2* 可以显著上调脾脏中炎性细胞因子 *IL-6* 和 *IL-8* 的表达; Du 等^[15] 发现草鱼 *IL-17D* 可促进草鱼原代头肾细胞促炎细胞因子 (*IL-1 β* 、*TNF- α* 、*CXCL-8*) 的基因表达。本实验体内肛灌 NusA-17B 后, 1 和 3 d 在鲤体表和肠道切片均能观察到明显的炎症, qPCR 也同步检测到炎症因子 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6*, 趋化因子 *CCL20*, *NF- κ B* 及 *TRAF6* 的表达上调; 在体外用 NusA-17B 孵育鲤免疫组织体肾, 同样引起了炎症相关因子的明显上调, 表明鲤 *IL-17B* 也具有促炎作用, *IL-17* 家族成员大部分能参与炎症反应可能与该家族的特征序列有关。肛灌鲤和鲤肾组织孵育 7 d 时, 鲤炎症现象减弱, 鲤从出现炎症到炎症渐渐消失的现象揭示了鲤经 *IL-17B* 重组蛋白刺激后会进行自我修复, 这种炎症自我修复的现象在草鱼中也出现过^[44]。

NusA-17B 孵育鲤肾组织, 结果显示, *CcIL-17B* 对炎症因子 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6*, 趋化因子 *CCL20*, *NF- κ B* 及 *TRAF6* 均有刺激作用, 但不同基因的敏感性存在着差异, 0.1 ng/mL 的 NusA-17B 即能明显刺激 *NF- κ B* 和 *TRAF6* 的表达, 而 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *CCL20* 则需要在 10.0 ng/mL 时

作用才明显, 由此, 推测 NusA-17B 可能偏向通过 *TRAF6* 或者其他因子激活 *NF- κ B* 信号通路^[45]。相比 0.1 ng/mL 鲤 *IL-17A/F2* 即能显著诱导 *IL-1 β* 的表达上调^[18], 0.1 或 1.0 ng/mL 鲤 *IL-17N*^[34] 能显著上调 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *CCL20* 的表达, 鲤 *IL-17B* 需要 1.0 或 10.0 ng/mL 才对 *IL-1 β* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *CCL20* 有显著的刺激作用, 表明鲤 *IL-17B* 的促炎作用与 *IL-17A/F2* 和 *IL-17N* 存在差异, 这可能与它们之间的系统发育关系有关^[34]。

综上, 本实验结果表明, 硬骨鱼类 *IL-17B* 基因在 TGD 过程中存在丢失, qPCR 结果表明 *CcIL-17Bs* 主要在性腺和胚胎发育早期表达; 体内、体外实验显示鲤 *IL-17B* 参与了炎症反应。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Miossec P, Korn T, Kuchroo V K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells[J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 361(9): 888-898.
- [2] Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, et al. IL-17 cytokine family[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004, 114(6): 1265-1273.
- [3] 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.
- [4] Gerhardt S, Abbott W M, Hargreaves D, et al. Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 394(5): 905-921.
- [5] Hymowitz S G, Filvaroff E H, Yin J P, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding[J]. *The EMBO Journal*, 2001, 20(19): 5332-5341.
- [6] Gunimaladevi I, Savan R, Sakai M. Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 21(4): 393-403.
- [7] 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 and*

- Shellfish Immunology*, 2009, 27(5): 647-659.
- [8] Korenaga H, Kono T, Sakai M. Isolation of seven IL-17 family genes from the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 28(5-6): 809-818.
- [9] Kono T, Korenaga H, Sakai M. Genomics of fish IL-17 ligand and receptors: a review[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 31(5): 635-643.
- [10] 曹永生, 徐黎明, 赵景壮, 等. 虹鳟IL-17多克隆抗体的制备及初步鉴定[J]. *水产学杂志*, 2016, 29(6): 1-5.
Cao Y S, Xu L M, Zhao J Z, *et al.* Preparation and identification of polyclonal antibody of IL-17 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2016, 29(6): 1-5 (in Chinese).
- [11] 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.
- [12] 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 and Shellfish Immunology*, 2014, 38(1): 47-55.
- [13] Nuñez Ortiz N, Gerdol M, Stocchi V, *et al.* T cell transcripts and T cell activities in the gills of the teleost fish sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 47(2): 309-318.
- [14] 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 and Comparative Immunology*, 2015, 51(1): 202-211.
- [15] 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 and Comparative Immunology*, 2014, 42(2): 220-228.
- [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 and Shellfish Immunology*, 2016, 49: 243-251.
- [17] Dong C J, Kong S N, Zheng X H, *et al.* Genome-wide identification of interleukin-17 (IL17) in common carp (*Cyprinus carpio*) and its expression following *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Gene*, 2019, 686: 68-75.
- [18] 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 and Shellfish Immunology*, 2016, 51: 303-312.
- [19] Li H Z, Chen J, Huang A, *et al.* Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(2): 773-778.
- [20] Shi Y G, Ullrich S J, Zhang J, *et al.* A novel cytokine receptor-ligand pair: identification, molecular characterization, and *in vivo* immunomodulatory activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(25): 19167-19176.
- [21] Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, *et al.* Functional specialization of interleukin-17 family members[J]. *Immunity*, 2011, 34(2): 149-162.
- [22] Kolls J K, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation[J]. *Immunity*, 2004, 21(4): 467-476.
- [23] Gaffen S L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(8): 556-567.
- [24] Kouri V P, Olkkonen J, Ainola M, *et al.* Neutrophils produce interleukin-17B in rheumatoid synovial tissue[J]. *Rheumatology*, 2014, 53(1): 39-47.
- [25] Moore E E, Presnell S, Garrigues U, *et al.* Expression of IL-17B in neurons and evaluation of its possible role in the chromosome 5q-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease[J]. *Neuromuscular Disorders*, 2002, 12(2): 141-150.
- [26] Kokubu T, Haudenschild D R, Moseley T A, *et al.* Immunolocalization of IL-17A, IL-17B, and their receptors in chondrocytes during fracture healing[J]. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2008, 56(2): 89-95.
- [27] Ryan A W, Thornton J M, Brophy K, *et al.* Chromosome 5q candidate genes in coeliac disease: genetic variation at *IL4*, *IL5*, *IL9*, *IL13*, *IL17B* and *NR3C1*[J]. *Tissue Antigens*, 2005, 65(2): 150-155.
- [28] Li H X, Zhang L, Li J L, *et al.* Identification, expression and pro-inflammatory effect of interleukin-17 N in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2021, 111: 6-15.

- [29] Dong X B, Tang B, Li J, *et al.* Expression and purification of intact and functional soybean (*Glycine max*) seed ferritin complex in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18(2): 299-307.
- [30] Young C L, Britton Z T, Robinson A S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications[J]. *Biotechnology Journal*, 2012, 7(5): 620-634.
- [31] Song X H, Zhao J, Bo Y X, *et al.* *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): An experimental model[J]. *Aquaculture*, 2014, 434: 171-178.
- [32] Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999, 103(9): 1345-1352.
- [33] Ding Y, Ao J Q, Chen X H. Comparative study of interleukin-17C (IL-17C) and IL-17D in large yellow croaker *Larimichthys crocea* reveals their similar but differential functional activity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 76: 34-44.
- [34] 张磊, 沈泽恩, 李红霞, 等. 鲤IL-17N的基因克隆、表达及促炎作用[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(12): 1402-1414.
- Zhang L, Shen Z E, Li H X, *et al.* Cloning, expression and pro-inflammatory effect of interleukin-17N in *Cyprinus carpio*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(12): 1402-1414 (in Chinese).
- [35] 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.
- [36] Louis A, Muffato M, Crollius H R. Genomicus: five genome browsers for comparative genomics in eukaryota[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D700-D705.
- [37] 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.
- [38] 沈泽恩. 鲤鱼 IL-17 家族成员及其受体基因序列分析和表达特征 [D]. 南京: 南京农业大学, 2019: 13-23.
- Shen Z E. Sequence analysis and expression characteristics of IL-17 family members and their receptor genes in *Cyprinus carpio*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019: 13-23 (in Chinese).
- [39] Kim H S, Hwang D S, Jeong C B, *et al.* Identification and conservation of gene loss events of *Hox* gene clusters in the marine medaka (*Oryzias melastigma*)[J]. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2016, 326(7): 387-393.
- [40] You Z B, DuRaine G, Tien J Y L, *et al.* Expression of interleukin-17B in mouse embryonic limb buds and regulation by BMP-7 and bFGF[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 326(3): 624-631.
- [41] Bie Q L, Jin C Q, Zhang B, *et al.* IL-17B: a new area of study in the IL-17 family[J]. *Molecular Immunology*, 2017, 90: 50-56.
- [42] Lee J, Ho W H, Maruoka M, *et al.* IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(2): 1660-1664.
- [43] Hoang C T, Hong Y, Truong A D, *et al.* Molecular cloning of chicken interleukin-17B, which induces proinflammatory cytokines through activation of the NF- κ B signaling pathway[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 74: 40-48.
- [44] 肖兰莹. 草鱼 IL-17 家族基因的克隆及其在肠道炎症中的功能鉴定 [D]. 苏州: 苏州大学, 2018: 60-68.
- Xiao L Y. Grass Carp IL-17 Family genes: cloning, characterization and expression analysis during *Aeromonas hydrophila*-induced intestinal inflammation[D]. Suzhou: Suzhou University, 2018: 60-68 (in Chinese).
- [45] Hoesel B, Schmid J A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2013, 12(1): 86.

Sequence analysis, expression patterns, acquisition of prokaryotic recombinant protein and pro-inflammatory effect of *IL-17B* in *Cyprinus carpio*

WANG Yujing¹, XU Yuxin¹, FENG Wenrong^{1,2}, LI Jianlin^{1,2}, LI Hongxia^{1,2}, SU Shengyan^{1,2},
SONG Changyou^{1,2}, TANG Yongkai^{1,2*}, 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) is an important inflammatory factor, which is able to promote the production of various inflammation-related factors, such as *IL-1 β* , *IFN- γ* , *IL-6*, *CCL20* and so forth. It plays an important role in autoimmune disease, host defense, inflammation and so on. In order to study the pro-inflammatory function of IL-17B in the *Cyprinus carpio*, the *IL-17B* gene was cloned, the NusA-17B protein was recombinantly expressed by *Escherichia coli* system and the pro-inflammatory effect of the IL-17B was then investigated by *in vivo* and *in vitro* experiments. In this study, by homology search and gene cloning method, we found two *IL-17Bs* in the genome of the *C. carpio*, *CcIL-17B1* and *CcIL-17B2* respectively. Both of the two genes have open reading frames (ORF) of 597 bp, which are composed of three exons and two introns. The length of their exons are the same, 24, 320 and 253 bp respectively. While the introns are different, the *CcIL-17B1* intron are 84, 420 bp respectively and the *CcIL-17B2* intron are 81, 851 bp respectively. The two *CcIL-17Bs* encode 198 amino acids, containing 2 disulfide bonds formed by 4 cysteines, which were unique to the IL-17 family. Sequence blast analysis showed that the consistency of the two *CcIL-17Bs* proteins reached 91.92%. The collinearity analysis results are as follows. During the doubling of the chromosomes of teleost, *IL-17B* and its nearby genes were lost. Most teleost have one *IL-17B* and *Danio rerio* have both *IL-17Bs* that were lost. The common carp-specific chromosomes doubled resulting in the presence of two *CcIL-17Bs*. Real time quantitative PCR (qPCR) was used to measure the expression of *CcIL-17B1* and *CcIL-17B2* in fertilized eggs, larvae and different tissues of adult *C. carpio*. The results showed that the expression levels of both *CcIL-17B1* and *CcIL-17B2* were significantly higher at 0-12 hours post fertilization than that at 25-90 hours post fertilization ($P < 0.05$). While the expression levels have no significant difference at 25-90 hours after fertilization and 1-14 days after hatching ($P > 0.05$). In adult fish, the expression level of two genes in testis and gonad are significantly higher than that in other tissues, such as spleen, heart, kidney, head kidney, intestine, gill, liver, skin, muscle, brain ($P < 0.05$). Further, using the *E. coli* expression system, the soluble recombinant protein NusA-17B was obtained. Different concentrations of NusA-17B were injected into the anus to evaluate its pro-inflammatory effect. Histopathological results showed that intestinal villi defect, plenty of goblet cells and inflammatory cells appeared in intestines treated with high concentration NusA-17B (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) after 1 and 3 days. Meanwhile, qPCR showed that *IL-1 β* , *IFN- γ* , *IL-6*, *CCL20* and *NF- κ B* were significantly up-regulated ($P < 0.05$). However, the abnormal changes in intestinal structure and expression of inflammation-related genes were restored to normal level after 7 days. In addition, *in vitro*, the *C. carpio* kidney cells were incubated into different concentrations (0.1, 1.0, 10.0 and 100.0 ng/mL) NusA-17B for 8 hours. The results showed that *IL-1 β* was significantly up-regulated under NusA-17B stimulation at 1.0, 10. and 100.0 ng/mL ($P < 0.05$); *IFN- γ* and *NF- κ B* were significantly up-regulated under the stimulation of NusA-17B at 10.0 ng/mL and 0.1 ng/mL respectively ($P < 0.05$); *IL-6* and *CCL20* were significantly expressed under NusA-17B stimulation at 10.0 and 100.0 ng/mL ($P < 0.05$), and *TRAF6* was significantly expressed under NusA-17B stimulation at 0.1, 1.0 and 10.0 ng/mL ($P < 0.05$). In summary, the results of *in vivo* and *in vitro* experiments show that *CcIL-17B* participates in the inflammatory response.

Key words: *Cyprinus carpio*; *IL-17B*; gene expression; recombinant protein; inflammatory response

Corresponding author: TANG Yongkai. E-mail: tangyk@ffrc.cn;

YU Juhua. E-mail: yujh@ffrc.cn

Funding projects: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2018HY-ZD02, 2020TD37); China Agriculture Research System of MOF and MARA(CARS-45)