



团头鲂 *IL-12* 表达及功能的初步研究

武佳琪, 王济秀, 刘红*

(华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 长江经济带大宗水生生物
产业绿色发展教育部工程研究中心, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为探究白介素-12 (*IL-12*) 在鱼类免疫过程中发挥的功能, 实验以团头鲂为研究对象, 克隆了团头鲂 *IL-12* 的 4 个亚基 *IL-12A*、*IL-12Ba*、*IL-12Bb* 和 *IL-12Bc* 的开放阅读框 (ORF) 序列, 长度分别为 588、993、939 和 837 bp。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 结果显示, 团头鲂 *IL-12* 各亚基在检测的 10 个不同的成鱼健康组织中都有表达, 但是在不同组织中的表达模式不同; 腹腔注射嗜水气单胞菌后, 团头鲂 *IL-12* 各亚基在免疫相关组织中表达差异显著; 脂多糖 (LPS) 刺激分离的团头鲂头肾淋巴细胞后, 4 个 *IL-12* 亚基均被快速诱导表达。进一步通过大肠杆菌原核表达系统和变性复性方法得到团头鲂 *IL-12Bb*、*IL-12Bc* 重组蛋白, 刺激分离的头肾淋巴细胞后, *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IFN- γ* 的表达显著上调, 表明获得的重组蛋白具有生物学活性。最后对获得的蛋白进行抑菌活性检测, 结果表明, 重组 *IL-12Bb*、*IL-12Bc* 单体蛋白对嗜水气单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都有明显的抑制作用。综上所述, 团头鲂 *IL-12* 在调节免疫应答的过程中发挥着重要作用。

关键词: 团头鲂; 白介素 12; 细菌刺激; 基因表达; 原核表达; 抑菌活性

中图分类号: Q 812; S 941.42

文献标志码: A

白细胞介素-12 (*IL-12*) 是由约 35 ku 的轻链 (p35 或 *IL-12A*) 和约 40 ku 的重链 (p40 或 *IL-12B*) 形成的异源二聚体^[1]。为了产生具有生物活性的异源二聚体, *IL-12A* 和 *IL-12B* 需要在同一个细胞中表达^[2]。*IL-12* 已被证明对活化的 T 细胞和 NK 细胞具有直接的增殖和细胞溶解活性^[1,3]。有研究表明, 哺乳动物的 *IL-12* 在受到细菌抗原刺激后产生免疫应答, 可能在炎症初期发挥作用^[4]。在硬骨鱼中发现的第一个 *IL-12* 家族成员是红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) *IL-12*^[5], 同时发现了 p35 亚基和 p40 亚基, 随后, 这 2 个亚基在其他鱼类中也被鉴定出来。鱼类每个亚基存在多种亚型^[6-12],

这与高等脊椎动物形成鲜明对比。在大西洋鲑 (*Salmo salar*) 和高体鲈 (*Seriola dumerili*) 中发现重组的 *IL-12* 蛋白会诱导细胞介导免疫 (CMI) 相关基因体外表达^[10,13]; 在中国花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 中验证了 *IL-12B* 的一个亚型有抗菌活性, 且重组蛋白对重金属和 H_2O_2 毒性均具有抗性^[14]。

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 俗称武昌鱼, 是我国特有的淡水经济鱼类^[15]。近年来病害频频发生, 对团头鲂的养殖造成严重危害, 其中以嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 引起的细菌性败血症最为严重^[16]。关于 *IL-12* 在鱼类方面的研究仅是克隆和表达, 而对团头鲂的 *IL-12* 研

收稿日期: 2021-04-13 修回日期: 2021-06-08

资助项目: 国家自然科学基金 (31972781); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46-08)

第一作者: 武佳琪 (照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: 1316319414@qq.com

通信作者: 刘红, 从事鱼类基因组学和鱼类遗传育种研究, E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn



究尚未见报道。因而本实验克隆了团头鲂 *IL-12* 各亚基并对其进行序列分析及系统进化分析, 检测 *IL-12* 各亚基在健康组织中、体内被嗜水气单胞菌感染及体外被脂多糖 (LPS) 刺激后的表达谱, 并对重组表达的 *IL-12Bb*、*IL-12Bc* 单体蛋白进行功能验证。本研究结果将会填补团头鲂 *IL-12* 研究的空缺, 为硬骨鱼中 *IL-12* 的进一步研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用团头鲂幼鱼规格为 45~55 g, 成鱼规格为 480~520 g, 均来自华中农业大学水产实验基地; 所用菌种均为本实验室保存。按照张建等^[17]的方法对团头鲂进行处理及组织采样, 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 注射实验鱼作为对照组, 每个时间点每组分别采集 9 尾鱼, 每 3 尾鱼混合作为一个生物学重复, 共 3 个重复。使用 TRIzol Reagent (Invitrogen, 中国) 抽提样品总 RNA, 用 TaKaRa 反转录试剂盒进行 cDNA 合成, 保存在 -20 °C 待用。取健康团头鲂的完整头肾, 用鱼组织淋巴细胞分离液 KIT(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司) 分离头肾淋巴 (HKL) 细胞, 使用 RPMI1640+10% FBS+1% A⁺/A⁺培养基在 28 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 12 h。30 μg/mL LPS 刺激 HKL 细胞, PBS 刺激作为对照组, 每个时间点 3 个重复。

1.2 *IL-12* 克隆及系统进化分析

从 NCBI 数据库获取草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)*IL-12* 的 cDNA 序列, 采用本地 Blast 将其与团头鲂的全基因组数据库比对分析获得团头鲂 *IL-12* 序列, 用 Primer premier 6.0 软件设计引物 (表 1), PCR 扩增团头鲂 *IL-12* 的开放阅读框 (ORF) 区, 将片段大小正确的 PCR 产物测序验证。利用 MEGA 6.06 软件对鱼类和高等脊椎动物中 *IL-12* 各亚基进行多重比对, 构建 *IL-12* 的系统进化树, 利用邻接法 (NJ 法) 得到类似的树形拓扑结构, 节点值表示从 1 000 次复制中获得可信度百分比。合成引物及测序均由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

1.3 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 及数据分析

利用 Primer premier 6.0 软件设计团头鲂 *IL-*

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

引物名称 primers name	序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	用途 usage
<i>IL-12A-F</i>	ATGAAGATCTGCGCTGTGT	ORF 序列验证 sequence validation
<i>IL-12A-R</i>	TCACTTTCCCCTTGTCTCC	
<i>IL-12Ba-F</i>	AGCCAATCTGGTTGTGGA	
<i>IL-12Ba-R</i>	CATTTAAGGGCATGATAGTGT	
<i>IL-12Bb-F</i>	AGATGAACAAGATTGTCT	
<i>IL-12Bb-R</i>	GTCAGGAATAGGAGGC	
<i>IL-12Bc-F</i>	ATGGGTTTGTGTGATGAGGTT	RT-qPCR
<i>IL-12Bc-R</i>	TATGTAACCAATGCCGTGAT	
<i>M-IL-12A-F</i>	TGGAGGCTCGGATGATTC	
<i>M-IL-12A-R</i>	TAGGAGTTCAGCAGCAGAT	
<i>M-IL-12Ba-F</i>	TGGCTCAGTGGACCTTCAA	
<i>M-IL-12Ba-R</i>	GTTGCTTCCACTGTGAGGG	
<i>M-IL-12Bb-F</i>	CACAGCAATACGGAACCTCT	
<i>M-IL-12Bb-R</i>	ATGAAGAAAGTCTCTGGTG	
<i>M-IL-12Bc-F</i>	CGGTTTCCACTTGCTGTTA	
<i>M-IL-12Bc-R</i>	AGGCATCACCTCCACTTCT	
<i>M-IL-1β-F</i>	TACGATAAGACCAGCAGCAGC	
<i>M-IL-1β-R</i>	TCGGTGATACATACGTGGAC	
<i>M-IFN-γ-F</i>	AGAATGCTGAACATCTACGA	
<i>M-IFN-γ-R</i>	TCACTGTACTGGTGTCTTAG	
<i>M-TNF-α-F</i>	AAGAAAGTACAACCTGGGCTC	
<i>M-TNF-α-R</i>	TTTTCTAATTCAAGCCGCC	
<i>M-18s-F</i>	CGGAGGTTTCAAGACGATCA	
<i>M-18s-R</i>	GGGTCGGCATCGTTTACG	
<i>IL-12Bb-Y-F</i>	CGCGGATCCATGCTGAGGTTCC TCAAGC	原核表达 prokaryotic expression
<i>IL-12Bb-Y-R</i>	CCCAAGCTTTTGTTCGAGGTG TGCC	
<i>IL-12Bc-Y-F</i>	CGCGGATCCATGAAATTTTCC CTGAGAAAT	
<i>IL-12Bc-Y-R</i>	CCCAAGCTTGTTTACGTTTTC ACATGGT	

12 特异性引物 (表 1), 采用 RT-qPCR 检测 *IL-12* 的表达。用 SPSS Statistics 24.0 软件对 *IL-12* 的相对表达量进行独立样本 *t* 检验, 数值均采用平均值±标准误 (mean±SE) 表示, 当 *P*<0.05(*) 即差异显著, *P*<0.01(**) 即差异极显著。

1.4 IL-12 重组蛋白的表达和纯化

将构建成功的重组 pET-32a-Bb、pET-32a-Bc 质粒分别导入 DE3 感受态细胞后诱导蛋白，IL-12Bb 在 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 诱导 8 h，IL-12Bc 在 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 诱导 6 h 的条件下诱导效果最佳。诱导结束后进行超声波破碎，十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测发现重组蛋白在包涵体表达，对包涵体蛋白进行变性、纯化、复性、超滤等处理，最终获得无明显杂带的重组蛋白。

1.5 重组蛋白生物学活性及抗菌活性检测

分离的团头鲂 HKL 细胞经过夜静置培养后，用梯度稀释的方式将重组 IL-12Bb/IL-12Bc 单体蛋白混匀后加入细胞培养液中，以超滤液组作为对照组。处理结束后用微量细胞总 RNA 试剂盒 (杭州新景生物试剂开发有限公司) 提取总 RNA。RT-qPCR 检测 *IL-1β*、*TNF-α* 和 *IFN-γ* 3 个相关免疫因子的基因表达模式，之后采用打孔法对嗜水气单胞菌、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 进行抑菌活性检测。

2 结果

2.1 团头鲂 IL-12 基因序列及系统进化分析

经克隆并测序验证获得团头鲂 *IL-12A*、*IL-12Ba*、*IL-12Bb* 和 *IL-12Bc* 的序列，将其分别定位于团头鲂第 16、23、18 和 19 号染色体上，其 ORF 区的长度分别为 588、993、939 和 837 bp (表 2)。进化分析结果显示，所有鱼类的 *IL-12A* 聚为一簇，由于鱼类特有的第 3 次全基因组复制，鱼类的 *IL-12Ba*、*IL-12Bb* 聚为一大簇，由同一进化节点分化出来；*IL-12Bc* 与 *IL-12Ba*、*IL-12Bb* 的亲缘关系较远，且 *IL-12Ba* 的氨基酸序列与哺乳动物的

IL-12B 最为相似。团头鲂、草鱼和斑马鱼 (*Danio rerio*) 聚为小支，结果与鲤科 (Cyprinidae) 鱼类的进化地位一致。团头鲂 *IL-12* 的各个亚基都与草鱼最先聚为小支，表明二者的亲缘关系最近 (图 1)。

2.2 团头鲂 IL-12 在健康组织中的表达谱

IL-12 各亚基在健康团头鲂不同组织中的表达模式各不相同，各基因的相对表达结果显示，*IL-12A* 在头肾中表达最高，随后依次为心脏、血液、肾脏、脑、肌肉、脾脏和鳃，在肠和肝脏中表达量很低；*IL-12Ba* 在鳃中表达量最高，其后依次为肾脏、头肾、脾脏、肌肉、肠、心脏、血液、脑和肝脏；*IL-12Bb* 在脾脏中的表达显著高于其他组织；*IL-12Bc* 在肝脏和肾脏中表达较高，脾脏、头肾中表达中等，其他组织表达较低 (图 2)。

2.3 嗜水气单胞菌感染后团头鲂 IL-12 的表达

嗜水气单胞菌腹腔注射感染后，*IL-12* 各亚基在团头鲂免疫相关组织中均显著差异表达。在肾脏中，*IL-12Ba* 在 12 hpi (hour post infection) 上调 2 倍 ($P < 0.01$)；*IL-12Bb* 在 4~72 hpi 一直极显著上调，最高上调 54.9 倍 ($P < 0.01$)，*IL-12A* 则在各时间点均显著下调。在脾脏中，*IL-12A* 从 4 hpi 开始到 12 hpi 上调 ($P < 0.05$)，72 hpi 后极显著下调；*IL-12Ba* 在 4 hpi 显著上调 1.9 倍，到 12 hpi 上调达到峰值 (3.9 倍， $P < 0.05$)；*IL-12Bb* 从 4 hpi 开始到 24 hpi 上调均极显著，在 4 hpi 的峰值上调高达 60 倍左右 ($P < 0.01$)；*IL-12Bc* 从 4 hpi 开始上调持续到 72 hpi。在头肾中，*IL-12A* 只在 12 hpi 时极显著上调 3.4 倍 ($P < 0.01$)，其他时间点极显著下调；*IL-12Ba* 仅在 12 hpi 时上调 2 倍左右 ($P < 0.05$)；*IL-12Bb* 和 *IL-12Bc* 均在 12 和 24 hpi 表达极显著上调 ($P < 0.01$) (图 3)。

表 2 团头鲂 IL-12 基因特征

Tab. 2 Characteristics of IL-12 in *M. amblycephala*

	染色体 chr	ORF长度/bp ORF	外显子 exon	内含子 intron	氨基酸数/个 amino acids	分子质量/ku Mw	等电点 pI	GC含量/% GC content
<i>IL-12A</i>	16	588	7	6	195	19.98	7.61	56
<i>IL-12Ba</i>	23	993	8	7	330	37.88	9.10	43
<i>IL-12Bb</i>	18	939	9	8	312	34.00	7.50	45
<i>IL-12Bc</i>	19	837	8	7	278	32.41	5.87	42

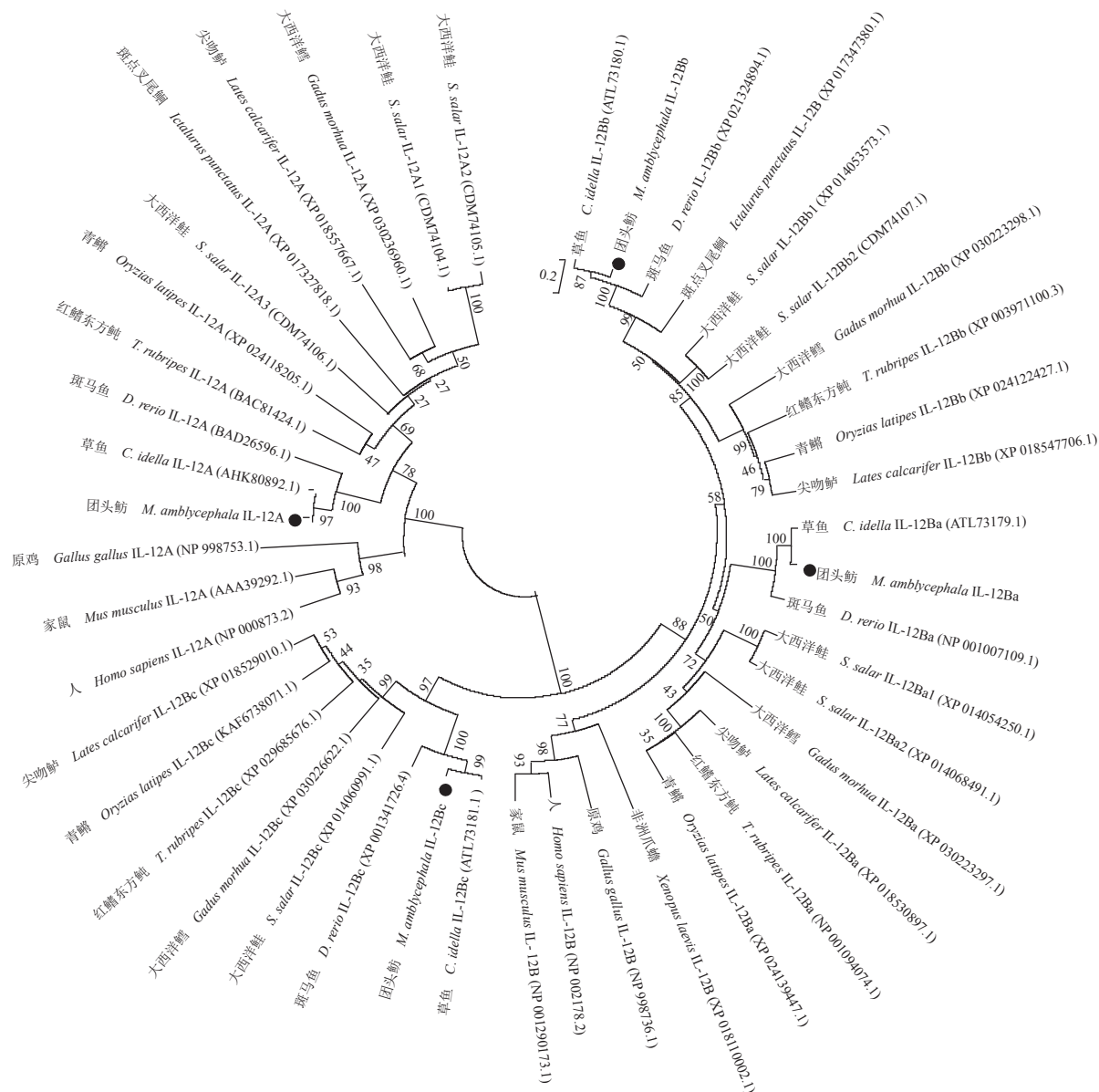


图 1 IL-12 的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of IL-12

2.4 LPS 刺激促进 HKL 细胞 *IL-12* 各亚基的表达

用 LPS 刺激 HKL 细胞, RT-qPCR 结果显示, *IL-12A*、*IL-12Ba*、*IL-12Bb* 和 *IL-12Bc* 都被快速诱导表达。与对照组相比, *IL-12A*、*IL-12Bb* 和 *IL-12Bc* 的表达模式一致, 在刺激 1~3 h 均极显著上调表达 ($P < 0.01$), 且 1 h 到达峰值; 与 *IL-12A*、*IL-12Bb* 和 *IL-12Bc* 等 3 个亚基不同的是, *IL-12Ba* 在 1~6 h 呈时间依赖性表达, 并且表达量极显著增加 ($P < 0.01$), 在 6 h 上调高达 64 倍, 诱导 12 h 时回落到正常 (图 4)。

2.5 团头鲂重组 IL-12Bb、IL-12Bc 蛋白的生物学活性及抗菌活性检测

IL-12Bb、IL-12Bc 单体蛋白在最优条件下诱导表达, 经破碎、纯化后结果如图 5 所示。分别用浓度为 0.1、0.3、1.0 和 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 IL-12Bb 及 IL-12Bc 刺激 HKL 细胞, 结果显示, 与对照组相比, IL-12Bb 重组蛋白均能显著上调 *TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *IFN- γ* 表达; 随着蛋白浓度 (0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$) 的升高, *TNF- α* 和 *IFN- γ* 的表达量逐渐上调, 并且在蛋白浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 时表达量达到峰值; *IL-1 β* 仅在重组蛋白浓度 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 时表达量显著升

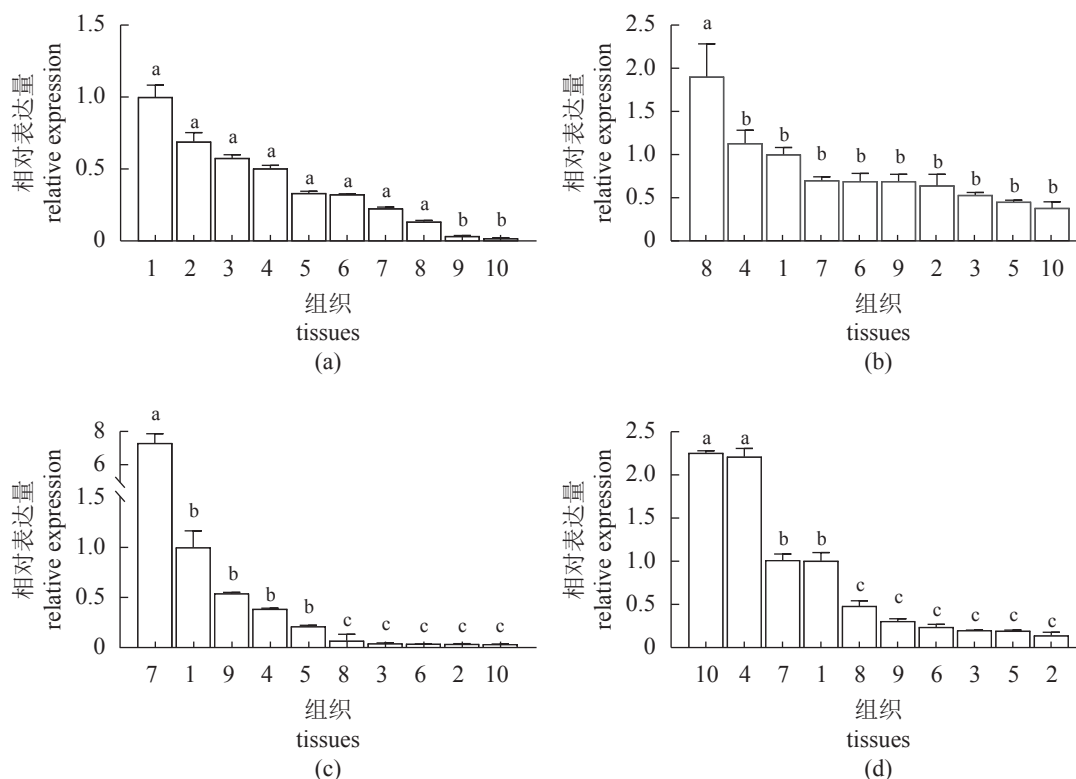


图2 团头鲂不同组织中 *IL-12* 各亚基 mRNA 的相对表达量

(a) *IL-12A*, (b) *IL-12Ba*, (c) *IL-12Bb*, (d) *IL-12Bc*; 1. 头肾, 2. 心脏, 3. 血液, 4. 肾脏, 5. 脑, 6. 肌肉, 7. 脾脏, 8. 鳃, 9. 肠, 10. 肝脏; 以各亚基在头肾中的表达水平为基准, 不同字母表示有显著性差异

Fig. 2 The relative expression levels of each subunit of *IL-12* in different tissues of *M. amblycephala*

(a) *IL-12A*, (b) *IL-12Ba*, (c) *IL-12Bb*, (d) *IL-12Bc*; 1. head-kidney, 2. heart, 3. blood, 4. kidney, 5. brain, 6. muscle, 7. spleen, 8. gill, 9. intestine, 10. liver; the expression level in head-kidney was set as 1, different letters mean significant differences

高 ($P < 0.05$)。 *TNF- α* 、*IL-1 β* 在 *IL-12Bc* 蛋白浓度 0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 时均极显著上调 ($P < 0.01$), 最大上调倍数分别达到 14.3 倍、30.98 倍; *IFN- γ* 在 0.1、0.3、1.0 和 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 4 个浓度下的表达量与对照组相比都有着显著增加 ($P < 0.01$)(图 6)。

为了探究获得的重组蛋白是否有抑菌活性, 选择实验室现有的 3 种细菌进行抑菌实验。实验结果表明, 重组 *IL-12Bb* 和 *IL-12Bc* 单体蛋白对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有明显的抑制作用 (图 7)。重组 *IL-12Bb* 蛋白对嗜水气单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌直径分别为 0.60、1.50 和 1.00 cm。重组 *IL-12Bc* 蛋白对嗜水气单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌直径分别为 0.64、1.60 和 0.80 cm。

3 讨论

白介素是鱼类先天免疫系统的重要组成部分^[18], 其中 *IL-12* 在调节免疫应答的所有方面均发挥着

关键作用^[19]。在本研究中, 我们克隆了团头鲂 *IL-12A* 和 3 个 *IL-12B* 亚基的基因序列, 并对团头鲂 *IL-12* 的功能进行初步研究。团头鲂的 *IL-12A*、*IL-12Ba*、*IL-12Bb* 和 *IL-12Bc* 位于不同的染色体, 每个基因互不相关, 这与哺乳动物及其他硬骨鱼类中的研究是一致的^[1,10,14]。系统进化分析表明, 硬骨鱼类的 *IL-12Ba* 和 *IL-12Bb* 聚为一大簇, 由同一进化节点分化出来; 而 *IL-12Bc* 与 *IL-12Ba*、*IL-12Bb* 的亲缘关系较远, 鱼类 *IL-12Ba*、*IL-12Bb* 与哺乳动物和原鸡的 *IL-12B* 聚集为一支; 以上证据表明, 硬骨鱼 *IL-12Ba* 和 *IL-12Bb* 分子可能是四足动物 *IL-12B* 的同源物, 这符合之前 Huising 等^[6]提出的观点。实验还对 *IL-12* 各亚基在健康组织中的表达情况进行研究, *IL-12* 在脾脏、头肾、肾脏和鳃等免疫相关组织中高表达。之前研究表明, 草鱼 *IL-12A* 在鳍、鳃和脑中高表达^[20]; 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) *IL-12A* 则在脾脏、肾脏中高表达^[21]; 与团头鲂 *IL-12A* 表达模式最接近的是

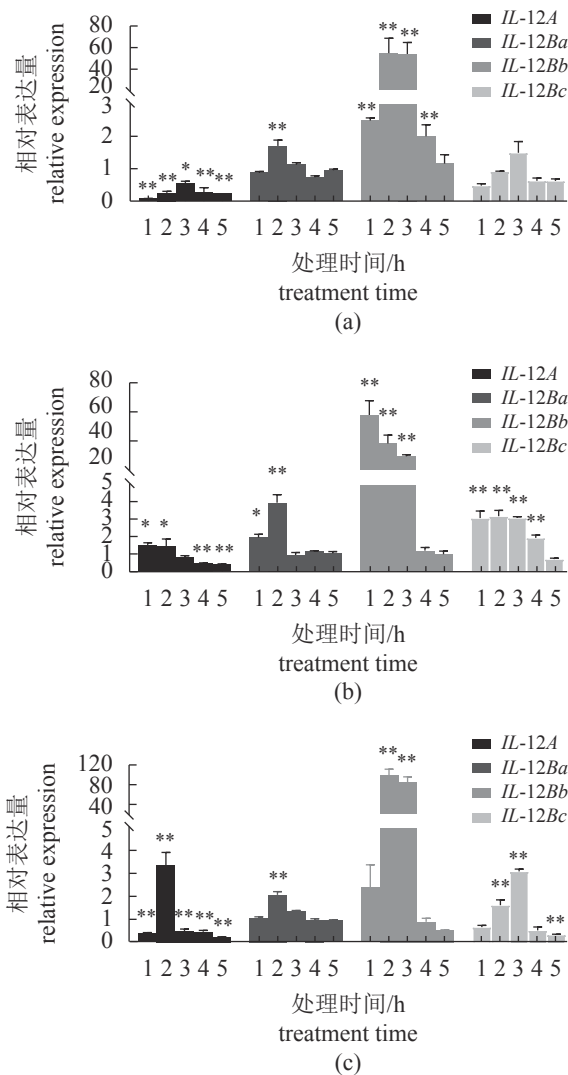


图3 嗜水气单胞菌感染后团头鲂 *IL-12* 各亚基在不同免疫组织中的表达分析

(a) 肾脏, (b) 脾脏, (c) 头肾; 1. 4 h, 2. 12 h, 3. 24 h, 4. 72 h, 5. 120 h; 差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$) 分别用“*”和“***”表示; 下同

Fig. 3 Expression analysis of *IL-12* subunits in different immune tissues of *M. amblycephala* infected by *A. hydrophila*

(a) kidney, (b) spleen, (c) head-kidney; 1. 4 h, 2. 12 h, 3. 24 h, 4. 72 h, 5. 120 h; significant differences are denoted with “*” ($P < 0.05$) and “***” ($P < 0.01$), respectively; the same below

2019年 Kim等^[22]在牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 上关于 *IL-12A* 的研究。有研究表明, 欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*) *IL-12B* 在头肾表达量最高, 在脾脏呈中度表达^[18]。本实验在脾脏、头肾、肾脏中均检测到 *IL-12B* 高表达, 与上述结果一致。

前期研究表明, 多种微生物病原体可以刺激 *IL-12* 在哺乳动物^[23] 中的表达。在红鳍东方鲀、庸

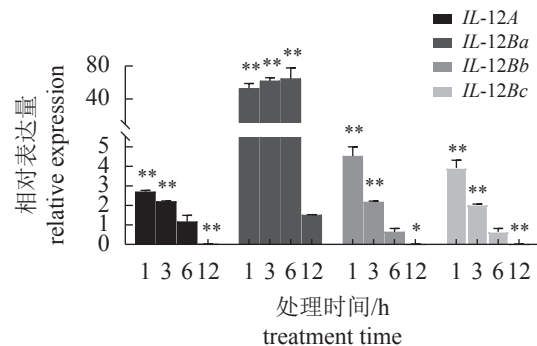


图4 LPS 刺激的团头鲂 HKL 细胞中 *IL-12* 各亚基的表达情况

Fig. 4 Expression of *IL-12* subunits in HKL stimulated by LPS in *M. amblycephala*

鲈 (*Hippoglossus hippoglossus*)、欧洲鲈、草鱼、牙鲆等鱼类中的研究得到类似结果^[5,8,18,20,22]。团头鲂感染嗜水气单胞菌后, *IL-12* 各亚基展现出组织特异性表达, 这可能与它们在鱼类免疫中的作用有关。团头鲂被细菌感染 4 h 时, *IL-12Bb* 在脾脏、肾脏中显著上调, 表明 *IL-12Bb* 可能参与了抗菌先天免疫反应的早期阶段。Zhang 等^[12] 发现条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) 被细菌感染后, *IL-12B* 在脾脏和肾脏中表达显著上调, 与团头鲂 *IL-12Bb* 的表达模式一致。而 *IL-12A* 相对于 *IL-12Ba*、*IL-12Bb*、*IL-12Bc* 的低表达, 表明 *IL-12A* 可能是团头鲂中 *IL-12* 产生的一个速率限制因子。由此可见, 嗜水气单胞菌感染能增加免疫组织中 *IL-12* mRNA 表达水平, 表明 *IL-12* 可能参与细菌诱导的鱼类炎症反应; 同时各亚基呈现不同的诱导表达特征, 表明不同的异构体可能在鱼类中的作用不同, 证实了 *IL-12* 各亚基在团头鲂抗菌免疫应答中的作用。

LPS 刺激团头鲂淋巴细胞后, *IL-12* 各亚基都有显著的表达, 并且可以在极短时间产生应答。在 LPS 刺激下, *IL-12A* 和 *IL-12B* 的 mRNA 表达同时上调, 进一步支持在免疫激活后, *IL-12A* 和 *IL-12B* 的 3 个亚基形成异源二聚体的观点。之前有研究指出, 在鲤 (*Cyprinus carpio*) 中, 大肠杆菌、脂多糖显著诱导了头肾巨噬细胞 *IL-12B* 的 mRNA 表达^[6]。LPS 刺激 12 h, 除 *IL-12Ba* 外都有明显的表达抑制, 表明 *IL-12* 的表达受到了严格的控制。感染后 *IL-12* 这种时间依赖性的上调或下调机制尚不清楚, 具体原因还需要进一步研究。

IL-12 诱导 T 细胞和自然杀伤 (NK) 细胞产生

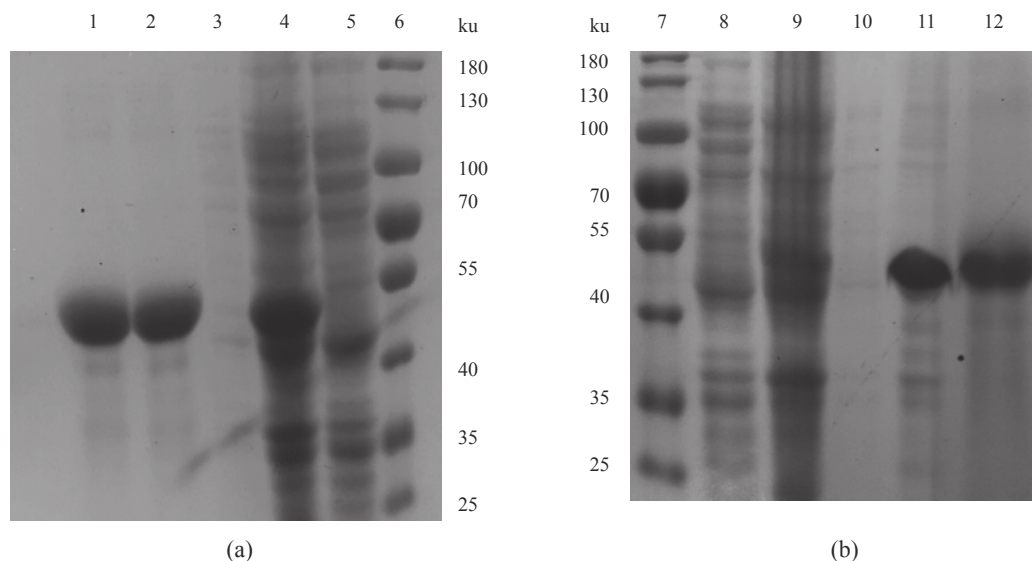


图5 经 SDS-PAGE 检测 IL-12Bb(a) 和 IL-12Bc(b) 纯化后的蛋白

1. 纯化后的重组蛋白, 2. 包涵体, 3. 诱导后的上清, 4. 未破碎前的诱导蛋白, 5. 未诱导的蛋白, 6. 蛋白 Marker, 7. 蛋白 Marker, 8. 未诱导的蛋白, 9. 未破碎前的诱导蛋白, 10. 诱导后的上清, 11. 包涵体, 12. 纯化后的重组蛋白

Fig. 5 IL-12Bb (a) and IL-12Bc (b) purified protein was detected by SDS-PAGE

1. purified recombinant protein, 2. inclusion body, 3. induced supernatant, 4. induced protein before fragmentation, 5. uninduced protein, 6. protein marker, 7. protein marker, 8. uninduced protein, 9. induced protein before fragmentation, 10. induced supernatant, 11. inclusion body, 12. purified recombinant protein

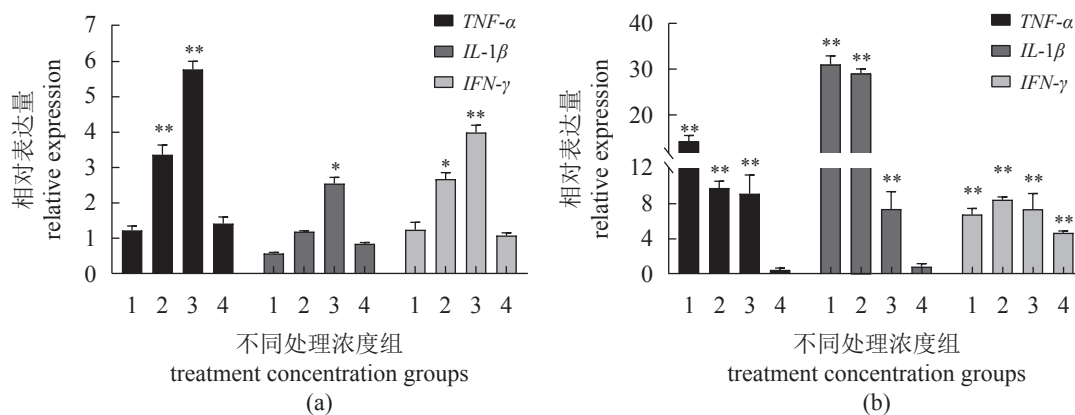


图6 不同浓度 IL-12Bb 蛋白 (a) 及 IL-12Bc 蛋白 (b) 刺激团头鲂 HKL 细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IFN-\gamma$ 表达

Fig. 6 Expression of $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ and $IFN-\gamma$ in HKL stimulated by different concentrations of IL-12Bb protein (a) and IL-12Bc protein (b) in *M. amblycephala*

1. 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 2. 0.3 $\mu\text{g/mL}$, 3. 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 4. 3.0 $\mu\text{g/mL}$

$IFN-\gamma$ 和 $TNF-\alpha$ 。重组的团头鲂 IL-12Bb、IL-12Bc 蛋白都可以显著上调 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $IFN-\gamma$ 的表达, 证明了团头鲂的 IL-12B 单体蛋白具有生物学活性, 此结果与草鱼单体蛋白结果一致^[24]。为了探究团头鲂 IL-12Bb、IL-12Bc 重组蛋白是否可以通过抑制细菌的增殖来达到免疫作用, 实验将 IL-12Bb、IL-12Bc 重组蛋白与革兰氏阴性菌 (嗜水气

单胞菌、大肠杆菌)、革兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌) 共孵育, 结果表明, IL-12Bb、IL-12Bc 重组蛋白有明显的抑菌活性。该结果与草鱼^[24]中重组 IL-12Bb 以及中国花鲈^[14]中 IL-12B 单体蛋白抑菌结果是一致的。同时, 本研究首次证明了重组团头鲂 IL-12Bc 蛋白也有抑菌活性。

综上所述, 本实验克隆了团头鲂 IL-12A 和 3

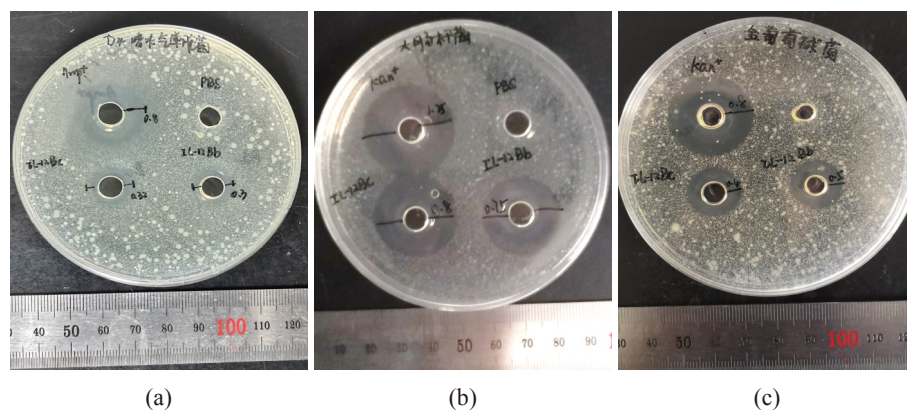


图 7 重组 IL-12Bb、IL-12Bc 蛋白体外抑菌效果

(a) 嗜水气单胞菌, (b) 大肠杆菌, (c) 金黄色葡萄球菌; PBS 为阴性对照, Amp⁺、Kan⁺为阳性对照

Fig. 7 Antimicrobial effects of the rmIL-12Bb and rmIL-12Bc proteins *in vitro*

(a) *A. hydrophila*, (b) *E. coli* A, (c) *S. aureus*; PBS is negative control, Amp⁺ and Kan⁺ are positive control

个 *IL-12B* 亚基的基因序列, 结果表明, 细菌感染可以诱导 *IL-12* 的表达, 且重组团头鲂 IL-12Bb、IL-12Bc 单体蛋白具有抑菌活性。后续我们将深入探究团头鲂 *IL-12* 的具体功能, 为团头鲂免疫调控机制研究奠定理论基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, *et al.* Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1989, 170(3): 827-845.
- [2] Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity[J]. *Advances in Immunology*, 1998, 70: 83-243.
- [3] Kang B Y, Kim E, Kim T S. Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells[J]. *Cellular Signalling*, 2005, 17(6): 665-673.
- [4] McRae B L, Semnani R T, Hayes M, *et al.* Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development[J]. *The Journal of Immunology*, 1998, 160(9): 4298-4304.
- [5] Yoshiura Y, Kiryu I, Fujiwara A, *et al.* Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits[J]. *Immunogenetics*, 2003, 55(5): 296-306.
- [6] Huising M O, Van Schijndel J E, Kruiswijk C P, *et al.* The presence of multiple and differentially regulated interleukin-12p40 genes in bony fishes signifies an expansion of the vertebrate heterodimeric cytokine family[J]. *Molecular Immunology*, 2006, 43(10): 1519-1533.
- [7] Nascimento D S, do Vale A, Tomás A M, *et al.* Cloning, promoter analysis and expression in response to bacterial exposure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-12 p40 and p35 subunits[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(9): 2277-2291.
- [8] Øvergård A C, Nepstad I, Nerland A H, *et al.* Characterisation and expression analysis of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) cytokines: IL-1β, IL-6, IL-11, IL-12β and IFN-γ[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(3): 2201-2213.
- [9] Tsai J L, Jose Priya T A, Hu K Y, *et al.* Grouper interleukin-12, linked by an ancient disulfide-bond architecture, exhibits cytokine and chemokine activities[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 27-37.
- [10] Wang T H, Husain M. The expanding repertoire of the IL-12 cytokine family in teleost fish: identification of three paralogues each of the p35 and p40 genes in salmonids, and comparative analysis of their expression and modulation in Atlantic salmon *Salmo salar*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 46(2): 194-207.
- [11] Wang T H, Husain M, Hong S, *et al.* Differential expression, modulation and bioactivity of distinct fish IL-12 isoforms: implication towards the evolution of Th1-like

- immune responses[J]. [European Journal of Immunology](#), 2014, 44(5): 1541-1551.
- [12] Zhang L, Zhang B C, Hu Y H. Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) IL-12p40: identification, expression, and effect on bacterial infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 312-320.
- [13] Matsumoto M, Hayashi K, Suetake H, *et al.* Identification and functional characterization of multiple interleukin 12 in amberjack (*Seriola dumerili*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 281-292.
- [14] Chen X, Wang P F, Zhao C, *et al.* Molecular characterization and functional analysis of IL-12p40 from Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) under biotic and abiotic stresses[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 83: 373-385.
- [15] 王卫民, 高泽霞, 刘红, 等. 团头鲂“华海1号”[J]. *中国水产*, 2018(5): 65-70.
- Wang W M, Gao Z X, Liu H, *et al.* *Megalobrama amblycephala* ‘Huahai No. 1’[J]. *China Fisheries*, 2018(5): 65-70 (in Chinese).
- [16] 田甜, 胡火庚, 陈昌福. 团头鲂细菌性败血症病原菌分离鉴定及致病力研究[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(3): 341-345.
- Tian T, Hu H G, Chen C F. Identification and pathogenicity of bacterial pathogens isolated in an outbreak of bacterial disease of bluntnose black bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. [Journal of Huazhong Agricultural University](#), 2010, 29(3): 341-345 (in Chinese).
- [17] 张建, 王济秀, 吴晓丽, 等. 团头鲂TYK2基因的克隆与表达分析[J]. *华中农业大学学报*, 2021, 40(2): 197-205.
- Zhang J, Wang J X, Wu X L, *et al.* Molecular cloning and expression of TYK2 in *Megalobrama amblycephala*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2021, 40(2): 197-205 (in Chinese).
- [18] Carbone D, Faggio C. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 172-178.
- [19] Vignali D A A, Kuchroo V K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers[J]. *Nature Immunology*, 2012, 13(1): 722-728.
- [20] Pandit N P, Shen Y B, Xu X Y, *et al.* Differential expression of interleukin-12 p35 and p40 subunits in response to *Aeromonas hydrophila* and *Aquareovirus* infection in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. [Genetics and Molecular Research](#), 2015, 14(1): 1169-1183.
- [21] Wang L P, Jiang L H, Wu C W, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) interleukin-12A, 16 and 34 after poly I: C and *Vibrio anguillarum* challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 84-93.
- [22] Kim D, Lee S H, Lee H, *et al.* Analyses of the gene structure and function of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) interleukin 12(IL-12)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 151-164.
- [23] Romani L, Puccetti P, Bistoni F. Interleukin-12 in infectious diseases[J]. [Clinical Microbiology Reviews](#), 1997, 10(4): 611-636.
- [24] 冯诗雨. 不同基因编码的草鱼 IL-12/IL-23 共用亚基 p40 的表达分析和功能鉴定 [D]. 成都: 电子科技大学, 2020.
- Feng S Y. Expression patterns and functional identification of distinct isoforms of grass carp p40 subunit shared by IL-12 and IL-23[D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China, 2020 (in Chinese).

Preliminary study on the expression and function of *IL-12* in *Megalobrama amblycephala*

WU Jiaqi, WANG Jixiu, LIU Hong*

(Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Interleukin-12 (IL-12) is an important cytokine that connects the innate and adaptive immune systems and has been shown to play an increasingly important role in immune and inflammatory responses. The study of *IL-12* in fish is mainly focused on cloning and expression, but the study of *IL-12* in *Megalobrama amblycephala*, one of the economically important freshwater fish, has not been reported yet. Therefore, in this study, four *IL-12* subunits in *M. amblycephala* were cloned, sequenced and phylogenetically analyzed; the expressions of *IL-12* in healthy tissues and after infection by *Aeromonas hydrophila* *in vivo* and stimulated by LPS *in vitro* were detected; and the function of the recombinant proteins of IL-12Bb and IL-12Bc was verified. The results showed that the open reading frame (ORF) sequences of *IL-12A*, *IL-12Ba*, *IL-12Bb* and *IL-12Bc* were 588, 993, 939 and 837 bp, respectively. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) results showed that the four *IL-12* subunits were expressed in all the 10 different healthy tissues tested, but their expression patterns were different. After intraperitoneal injection of *A. hydrophila*, the *M. amblycephala* *IL-12* subunits were significantly induced in the immune-related tissues. After LPS stimulation, the four *IL-12* subunits were rapidly induced in the head-kidney lymphocytes (HKL) of *M. amblycephala*. Furthermore, the recombinant IL-12Bb and IL-12Bc proteins were obtained by *Escherichia coli* prokaryotic expression system, and then were used to stimulate HKL. The results showed that the expressions of *TNF- α* , *IL-1 β* and *IFN- γ* in the stimulated HKL were significantly up-regulated, indicating that the obtained recombinant proteins had biological activity. Finally, the antimicrobial activity of the obtained protein was tested, and the results showed that the recombinant IL-12Bb and IL-12Bc monomers had obvious inhibitory effects on *A. hydrophila*, *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. The above results of this study indicate that *IL-12* plays an important role in the process of regulating immune response in *M. amblycephala*, which will provide theoretical basis for further study of *IL-12* in fish.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; interleukin-12; bacterial stimulation; gene expression; prokaryotic expression; antibacterial activity

Corresponding author: LIU Hong. E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31972781); China Agriculture Research System (CARS-46-08)