

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210303001

http://www.yykxjz.cn/

张志华, 冯博, 朱腾飞, 郝先才, 王倩, 邵长伟, 王洪岩. 半滑舌鲷白细胞介素 12 的 *p35a* 和 *p40c* 亚基在哈维氏弧菌感染下的表达和调控分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 12-23

ZHANG Z H, FENG B, ZHU T F, HAO X C, WANG Q, SHAO C W, WANG H Y. Expression and regulation analysis of the *p35a* and *p40c* subunits of interleukin 12 in *Cynoglossus semilaevis* infected by *Vibrio harveyi*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 12-23

半滑舌鲷白细胞介素 12 的 *p35a* 和 *p40c* 亚基在哈维氏弧菌感染下的表达和调控分析*

张志华^{1,2} 冯博^{1,2} 朱腾飞² 郝先才²
王倩² 邵长伟² 王洪岩^{2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

摘要 本研究以海水养殖鱼类半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)为研究对象,克隆了白细胞介素 12 (IL-12)的 *p35a* 亚基和 *p40c* 亚基的基因编码区序列,编码区长度分别为 651 bp 和 984 bp。系统进化树分析显示,半滑舌鲷的 *p35a* 和 *p40c* 分别与其他鱼类对应的基因聚为一支。氨基酸同源性分析显示, *p35a* 与红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)相似性最高, *p40c* 与三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)相似性最高,分别为 52.04%和 48.67%。组织表达分析显示, *p35a* 在鳃、脑、心和卵巢中表达量较高, *p40c* 在肝、脾、鳃和心中表达量较高。通过哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染实验,分析了半滑舌鲷 *p35a*、*p40c* 及其相关基因(*ifn-γ* 和 *il-10*)在哈维氏弧菌感染过程中的表达模式, *p35a* 在脾中, 48 h 表达显著上升($P<0.05$),之后表达逐渐下降;在肝和肠中, 72 h 表达显著上升。 *p40c* 在脾、肝中, 6 h 表达显著上升;在肾中, 48 h 产生上调;在肠中, 6 h 开始上调,并在 48 h 上升至最高点。 *ifn-γ* 在肝和肠中,均在 *p35a* 表达上调之前显著升高,在脾中晚于 *p35a* 上调表达; *il-10* 在肝、脾、肾、肠中表达趋势中均与 *p40c* 的表达趋势相反。将半滑舌鲷淋巴细胞过表达 *p35a* 和 *p40c* 基因后,检测了受不同浓度脂多糖(LPS)刺激后干扰素(*ifn-γ*)、肿瘤坏死因子(*tnf-α* 和 *tnf-β*)等免疫相关细胞因子的表达变化。结果显示, *p35a*、*p40c* 能够显著提高 *tnf-α* 在 LPS 刺激下的表达水平。上述结果表明, IL-12 的 *p35a* 亚基和 *p40c* 亚基能够响应哈维氏弧菌对半滑舌鲷的刺激,过表达 *p35a*、*p40c* 能够通过诱导 *tnf-α* 基因的表达来参与机体的免疫应答。研究结果可为 IL-12 作为半滑舌鲷抗哈维氏弧菌疫苗佐剂的开发提供理论基础。

关键词 半滑舌鲷; 免疫应答; 白细胞介素 12; 哈维氏弧菌

中图分类号 S941.42+4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)03-0012-12

* 国家重点研发计划项目(2018YFD0900301)、中国水产科学研究院创新团队项目(2020TD19)和财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系共同资助 [This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900301), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD19), and China Agriculture Research System of MOF and MARA]. 张志华, E-mail: zhangzh0115@163.com

① 通讯作者: 王洪岩, E-mail: wanghongyan@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-03-03, 收修改稿日期: 2021-03-22

白细胞介素 12 (interleukin 12, IL-12) 是一种在先天性和适应性免疫应答中具有多效效应的细胞因子 (Watford *et al*, 2003)。IL-12 蛋白是由 P35 亚基和 P40 亚基通过二硫键共价连接形成的异源二聚体 (Jones *et al*, 2011), 主要由抗原呈递细胞 (antigen-presenting cells, APC) 和吞噬细胞产生 (Vignali *et al*, 2012)。Toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 识别病原相关分子模式介导 IL-12 的产生和释放。在树突状细胞中, 病原体通过结合 TLR 刺激树突状细胞产生初始的 IL-12。而在巨噬细胞中, IL-12 的产生必须有干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等辅助细胞因子的参与 (Gee *et al*, 2009)。研究表明, P35 亚基和 P40 亚基在同一细胞中表达, 才能产生具有生物学活性的 IL-12 异源二聚体 (Schoenhaut *et al*, 1992)。在缺乏 P35 亚基时, P40 亚基以单体或同二聚体的形式分泌, 并与 IL-12 受体结合, 从而抑制 IL-12 的活性。P35 亚基不能单独分泌到胞外, 只能在与 P40 亚基结合后才能共同分泌, 由于 P35 亚基的 mRNA 表达量较低, 被认为是 IL-12 异源二聚体形成的限制因素 (Gillesen *et al*, 1995)。前期研究表明, CD4⁺ T 细胞与 APCs 结合后, IL-12 作为主要细胞因子, 诱导 CD4⁺ T 细胞向 Th1 细胞分化 (Manetti *et al*, 1993), 而 IL-10 能够抑制 Th1 细胞分化 (Hsieh *et al*, 1993)。综上所述, IL-12 协调先天性免疫和适应性免疫, 参与了宿主和病原体之间的相互作用, 在清除细胞内病原体中具有重要作用 (Prochazkova *et al*, 2012)。

当脊椎动物受到病原体感染时, 吞噬细胞分泌的 IL-12 作用于 T 细胞等免疫细胞, 促使其产生 IFN- γ 、TNF- α 和 TNF- β 等细胞因子, 增强免疫能力 (Kobayashi *et al*, 1989)。鱼类作为原始的脊椎动物, 有着和哺乳动物相似的免疫系统, Yoshiura 等 (2003) 在对红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 基因组的分析中, 首次发现了组成 IL-12 的 *p35* 和 *p40*。之后, 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、鲈鱼 (*Dicentrarchus labrax*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中成功克隆出 *p35a* 和 *p35b* 两种 *p35* 基因亚型, *p40a*、*p40b* 和 *p40c* 三种 *p40* 基因亚型 (Huisling *et al*, 2006; Nascimento *et al*, 2007)。前期研究发现, 病毒感染, 细菌注射、脂多糖 (LPS) 或刀豆蛋白 A 刺激后 (Huisling *et al*, 2006; Nascimento *et al*, 2007; Arts *et al*, 2010), 硬骨鱼的 *p35* 和 *p40* 的 mRNA 表达模式与哺乳动物类似, 这表明 IL-12 在硬骨鱼免疫应答中作为哺乳动物的直系同源基因发挥相似的作用 (Øvergård *et al*, 2012), 但不同亚型间的表

达有明显差异。在鱼类疫苗研究中发现, 石斑鱼重组 IL-12 作为靶向疫苗的佐剂可以激活免疫应答, 如: 刺激外周血白细胞增殖、诱导 *tnf- α* 基因表达 (Tsai *et al*, 2014); 高体鲷 (*Seriola dumerili*) 重组 IL-12 与诺卡氏菌 (*Nocardia seriolae*) 福尔马林灭活疫苗共同注射, 与单独注射诺卡氏菌福尔马林灭活疫苗相比, Th1 型免疫应答增加, 提高了高体鲷对诺卡氏菌的免疫率 (Matsumoto *et al*, 2017)。因此, 重组 IL-12 能够作为疫苗佐剂延长疫苗对鱼类感染病原体的保护作用。

半滑舌鳎是我国重要的海水养殖鱼类 (Song, 2016), 工厂化高密度养殖程度较高, 以哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 为主的细菌病在其养殖过程中造成了较高的死亡率, 迫切需要开展免疫防控技术研究, 提高半滑舌鳎对哈维氏弧菌病的抗病力。本课题组已完成半滑舌鳎全基因组测序 (Chen *et al*, 2014), 前期利用全基因组选择技术筛选出对哈维氏弧菌病抗病力高的亲鱼 (Liu *et al*, 2018); 克隆与分析了 *dctn5*、*sta5bl*、*rspo2l*、*pkca*、*plgR* 等多个与哈维氏弧菌病相关的免疫基因 (Li *et al*, 2020; Wang *et al*, 2019; Wei *et al*, 2018a、2018b、2019)。本研究克隆半滑舌鳎 *p35a* 和 *p40c* 的编码序列, 并分析 *p35a*、*p40c* 及相关免疫基因 (*ifn- γ* 和 *il-10*) 在半滑舌鳎哈维氏弧菌感染过程中的表达模式。同时, 利用半滑舌鳎淋巴细胞过表达 *p35a* 和 *p40c*, 并进行 LPS 刺激, 探究半滑舌鳎 IL-12 参与免疫应答的可能调控途径, 以期为研制半滑舌鳎哈维氏弧菌病的疫苗佐剂奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

本实验所用半滑舌鳎均来自明波水产养殖公司 (山东莱州)。随机取 3 条健康的半滑舌鳎成鱼, 麻醉后分别取胃、肠、脾脏、肝脏、心脏、肾脏、性腺、鳃、脑和肌肉, 分装至冻存管后迅速在液氮中冷冻, 取出后, 保存于-80℃超低温冰箱。哈维氏弧菌感染实验使用 40 条健康半滑舌鳎, 体长为 (41.0±2.7) cm, 体重为 (438.4±53.0) g, 具体实验方案参照之前操作步骤 (Wei *et al*, 2018b), 腹腔注射的哈维氏弧菌浓度为 1×10⁴ CFU/mL, 注射剂量为 4 μ L/g。分别在注射后的 6、16、48、72 和 96 h 进行样品采集, 每个时间点分别随机选取 5 条鱼, 将鱼麻醉, 采集肝脏、肾脏、脾脏、肠 4 个免疫相关组织, 采集的样品用锡纸包裹后迅速放入液氮中, 之后保存于-80℃超低温冰箱。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 Trizol 法提取半滑舌鳎各组织中的 RNA, 采

用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,之后使用微量分光光度计检测 RNA 的浓度与纯度,从而获得符合实验要求的 RNA。使用 cDNA 反转录试剂盒 (TaKaRa),按照说明书进行 cDNA 的合成。

1.3 *p35a* 和 *p40c* 基因编码区全长 cDNA 的克隆

根据已发表的半滑舌鳎全基因组序列获得 *p35a* 和 *p40c* 的预测序列,根据序列使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1),以免疫组织的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增验证编码区序列,PCR 反应体系: *LaTaq* 酶(TaKaRa) 0.5 μ L, dNTP 8 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, 灭菌去离子水 33.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 模板 1 μ L; 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 36 个循环(98 $^{\circ}$ C 12 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min), 72 $^{\circ}$ C 10 min。之后对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分离,切下单一一条带的 PCR 产物,使用胶回收试剂盒(Vazyme)进行回收纯化,将纯化后的 PCR 产物连接到 pEASY-T1 (TIANGEN)载体,按照说明书进行后续基因克隆实验,最后挑取阳性克隆交由华大基因科技有限公司进行测序。

1.4 生物学分析及进化树构建

测序后的结果使用 DNAMAN 和 SnapGene 进行比对和分析,得到所克隆的半滑舌鳎的 *p35a* 和 *p40c* 的编码序列,根据编码区序列使用 ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)预测蛋白分子量及等电点;

利用 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>)预测蛋白质结构域;使用 PyMOL 预测 IL-12 的蛋白质三维结构模型;多序列比对和进化树构建所需的氨基酸序列均来源于 Ensemble 和 NCBI 数据库;通过 MEGA 7.0,使用邻接法(neighbor joining, NJ)构建系统进化树(bootstrap = 1000)。

1.5 *p35a* 和 *p40c* 及相关基因表达模式检测

选取各组织中 1 μ g 的 RNA,利用 Prime Script RT reagent 试剂盒(TaKaRa, 日本)反转录生成 cDNA。通过 *p35a*-qF/R 和 *p40c*-qF/R 引物(表 1),利用 Quantinova SYBR Green PCR 试剂盒(QiaQen)进行 RT-qPCR,反应体系为 20 μ L, 分别包含 1 μ L cDNA、10 μ L SYBR Green PCR Master Mix (2 \times)、2 μ L ROX Reference Dye、0.7 μ mol/L 的上游和下游引物以及 5.6 μ L 无菌水。反应在 ABI StepOnePlus_ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 美国)上进行,反应程序: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, +1 $^{\circ}$ C/min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。使用 β -actin 作为内参(β -actin-qF/R) (表 1)。每个反应体系重复 3 次。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析 *p35a*、*p40c* 及其相关基因在半滑舌鳎各组织、哈维氏弧菌感染的免疫组织及细胞样品中的表达水平。使用 SPSS 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 设定 $P < 0.05$ 为差异显著。

表 1 实验所用的引物

Tab.1 Primers used in the experiments

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	用途 Utilization
<i>p35a</i> -F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGAACACACTTCGATTGTACCCG	CDS fragment PCR
<i>p35a</i> -R	GTGGTGGTGGTGGTGTCTCGAGCGGCTTCCTGTGCTCTCCTGAGG	CDS fragment PCR
<i>p40c</i> -F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGACTGCGACTCAGTGGATGG	CDS fragment PCR
<i>p40c</i> -R	GTGGTGGTGGTGGTGTCTCGAGCGGGATCCTCTTTTCTTCTGT TTC	CDS fragment PCR
<i>p35a</i> -qF	ACACTTCGATTGTACCCGTC	qRT-PCR
<i>p35a</i> -qR	CTCCGTCTGACTCTTACCAC	qRT-PCR
<i>p40c</i> -qF	TGGGCCCTGAATGCACTAAA	qRT-PCR
<i>p40c</i> -qR	AGACGATCGTGGGATACCA	qRT-PCR
β -actin-qF	GCTGTGCTGTCCCTGTA	qRT-PCR
β -actin-qR	GAGTAGCCACGCTCTGTC	qRT-PCR
<i>il-10</i> -qF	GTCCGGCTGAAGAAGCTC	qRT-PCR
<i>il-10</i> -qR	GAAAGAGTCTCGATGCTG	qRT-PCR
<i>ifn-γ</i> -qF	CTTGTCAGGTCTTGACCCTG	qRT-PCR
<i>ifn-γ</i> -qR	GTAACAGCAGGTTTTGGATGG	qRT-PCR
<i>tnf-α</i> -qF	GCTCACCTCAAGAAGAAGAC	qRT-PCR
<i>tnf-α</i> -qR	CCATTCCACCGAGTTGGTC	qRT-PCR
<i>tnf-β</i> -qF	GAAATGCAGCCCAGCCAC	qRT-PCR
<i>tnf-β</i> -qR	CAAATGGATGGCCGCTTG	qRT-PCR

1.6 半滑舌鳎 *p35a* 和 *p40c* 过表达载体的构建

使用 ClonExpress II One Step cloning kit-C112 (Vazyme)对 pHAGE 载体和 *p35a*、*p40c* 的编码区序列分别进行重组, 得到 pHAGE-*p35a* 和 pHAGE-*p40c* 重组载体。将重组后的产物转入感受态细胞中, 挑选单克隆进行 PCR 鉴定。对鉴定出的阳性菌落进行测序, 以确保载体构建的准确性。筛选准确的单细胞克隆菌株进行培养, 使用 EndoFree mini plasmid kit II (TIANGEN), 获得半滑舌鳎的 *p35a* 和 *p40c* 过表达载体。

1.7 半滑舌鳎原代细胞培养、转染与 LPS 处理

将健康的半滑舌鳎放于 18℃~20℃ 高双抗消毒海水(1000 μg/mL 链霉素, 1000 IU/mL 青霉素)中暂养 12~24 h 后, 在实验前将鱼放入 75%酒精中浸泡 1~2 min, 于超净工作台中, 用注射器抽取半滑舌鳎血液, 使用含有抗凝剂的 PBS 重悬细胞, 过 40 μm 细胞筛, 再用 PBS 漂洗 3 遍, 收集沉淀。之后, 用 5% FBS-DMEM/F12 培养液充分悬浮并均匀接种于 T25 培养瓶中, 进行细胞计数, 调整细胞密度至约 2×10⁶ 个/mL, 在 24℃ 培养箱中启动原代培养。24 h 后, 将细胞所用培养液更换为 DMEM/F12, 分别添加 10%胎牛血清(FBS)、100 μg/mL 链霉素、100 IU/mL 青霉素、40 ng/mL EGF、10 ng/mL bFGF 和 40 ng/mL IGF-I。使用 Lipo2000 (Invitrogen)进行细胞转染, 每孔添加 2.5 μg 质粒(对照组添加空质粒), 按说明书进行后续操作。分别用不同浓度的 LPS (0、1、10 mg/L)进行处理, 在 24 h 收集细胞置于-80℃冰箱中, 留待后续检测。

2 结果与分析

2.1 *p35a* 和 *p40c* 基因编码区克隆、序列分析和蛋白质三维结构模型预测

完成了半滑舌鳎 *p35a* 和 *p40c* 基因编码区序列的克隆, 其中, *p35a* 的 ORF 为 651 bp, 编码 216 个氨基酸, 预测蛋白质的分子量为 24.11 kDa, 理论等电点 (pI)为 7.49 (图 1); *p40c* 的 ORF 为 984 bp, 编码 327 个氨基酸, 预测蛋白质的分子量为 37.78 kDa, pI 为 6.57(图 2)。将 *p35a* 和 *p40c* 的 cDNA 比对基因组 DNA, 显示 *p35a* 和 *p40c* 都包含 7 个外显子。

通过 SMART 进行保守结构分析。结果显示, P35a 蛋白中存在 1 个 IL-12 蛋白结构域; P40c 存在 3 个蛋白结构域, 分别为免疫球蛋白结构域(IG)、IL-12p40_c 结构域和 I 类细胞因子受体结构域(d1f42a3)。其中,

P40c 还具有 1 个信号肽(图 3)。使用 PyMOL 同源建模半滑舌鳎 P35a 和 P40c 的蛋白质三级结构, 结果显示, 半滑舌鳎的 P35a 蛋白含有较多的 α-螺旋, 为 P35 典型四螺旋拓扑结构; 半滑舌鳎 P40c 蛋白则含有较多的 β 折叠; P35a 蛋白和 P40c 蛋白以类似于配体和受体结合的方式, 共价结合形成异源二聚体(图 4)。

```

1 M N T L R L Y P S S S A L L P L L L P L
1 ATCAACACACTTCGATTGTACCCGTAAGCAGTGTCTGCTCCGCTGCTGGCCGCTG
21 L L Q L Q L L T L C P S A T S A L P L R
61 CTGTTGAGCTCCAACTCTGACCCTCTGCCAGTGTACCTCGGCGTGCACCTGAGA
41 A G D S G C A Q C S L L F R N L L L N V
121 GCAGGGACAGCGGCTGTGCTCAGTGTCTCTGCTCTCAGGAATCTGCTGCTCAAGCTC
61 T D L L Q S D N L C F G I T S D K A V V
181 ACCGATCTCTCCAAAGTGACAACTTGTGTTTGAATCACATCTGATAAAGCAGGTGGT
81 K S Q T E T L L T C T P L T Q N P S C
241 AAGAGTCAGCGGAGACTACTGACCTGTACCCCCACTGACACAGAACCCAAGCTGC
101 N L Q R N V S F S E R D C L R N I M K D
301 AATCTGCAGAGAAATGTATCTTTCAGTCAGAGGAGCTGTCTGAGGAACATCATGAAGGAC
121 L L Y Y E A A I K S Y I H S P L R S P E
361 CTGCTCTACTATGAAGTGCATTAATCTACATCCACTCCCTCTCAGAAAGCCCTGAA
141 E E V A L L S P T L G V I E S L K N C S
421 GAGGAGTGGCTCTTCTCAGCCGACTGTGGGGTAATTGAGGCCTGAAGAAGTCTCC
161 L L K S E D I K Y S E D V A Q M W G S D
481 CTGTTGAAGAGTGAAGATATCAATATTCAGAGGACGTTGCTCAAATGTGGGGTAGCCAC
181 T Y T N R Q E M C K M M R G F Y V R A I
541 ACCTACACCAACAGACAGGAGATGTCAAGATGATGAGGGCTTCTACGTACGAGCCATC
201 T I N R A M G Y I S S G E H R K *
601 ACCATCAACCGAGCCATGGGCTACATCTCTCAGGAGACACAGGAAGTGA
    
```

图 1 半滑舌鳎 *p35a* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列
Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *p35a* gene in *C. semilaevis*

方框内为起始密码子、终止密码子。图 2 同
The box contains start codon and stop codon. The same as in Fig.2

```

1 M T A T Q W M V G F L L M A L Y E A H A
1 ATCACTGCGACTCAGTGGATGGTTGGGTTCTGCTCATGGCTCTCTATGAAGCACATGCT
21 L N H F P E N F V V G V N R N N K N P T V
61 CTAACCCTTCCAGAAAACCTTTGTTGTTCAATAGAATAACAAGAACCCCAAGCTGG
41 L T C S T E P V N G S I T W T H D S A E
121 CTGACCTGCAGCAGCGAGCGGTTAATGGATCGATCAGTGGACACATGACAGTGCAGAG
61 I E I D H V D Y Q Q N G N L T L S Y V
181 ATAGAAATCGATCATGTTGATATCAGCAGAACCGTGGAAATTAACCTGTCTATGTT
81 E T P E V G K Y T C W S G N H E L S T
241 GAAACACCTGAAGTGGGAAATACACCTGCTGGAGCGGAAACCAAGTGTGATCCACC
101 Y L L L E V Q R E K D S D S F L S C W A
301 TACCTGCTGCTGGAGTCCAGAGGAGAAAGATCAGACTCATTCTCAGCTGTTGGGCA
121 E S Y H C R F S C K W N N N E Y T A V R
361 GAGTCGTACTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
141 V G L G P E C T K G E K S C H W D D G S
421 GTCGGACTGGCCCTGAATGCACAAAGGTGAAAAGTCTGCTGACCTGGGTCGACGGCAGC
161 R P T S N G E F H F E L H H T L S P F A
481 CGTCCAACTCAAATGGGAAATTCACCTTGTAGCTGCATCACACAACTGTCGCTTTGCA
181 E E T N R L E I T A E A I N E Q F M L R
541 GAGGAAACCAACAGGCTTGAATCACTGCTGAGCCATCAATGAGCAGTTCATGCTCAGA
201 L T K K F Y L R D I V Q P G I P T I V S
601 CTCACCAAGAAATTTATCTCCGAGACATAGTCAACCTGGTATCCCCAGATCGTCTCC
221 C N K V K Q N L S V T I A P P A N W S T
661 TGTAACAAGGTGAAACAGAACCTGAGTGTGACCATCGCACCCAGCCAACTGGTCCACT
241 P H S F F C L E H Q I E Y I L Q D D G C T
721 CCCACAGTCTCTGCTGAGCAGTCAAGTGAATCACTGCAAGATGATGGCAGC
261 S R F S L S H V I P Q G I D Q L R V R S
781 AGCCGATTCGTTGCTCAGTGTATCCGAGGCGATCGATCAGCTAAGAGTCCGCTCC
281 R D S L L M S N W S Q W S H W K N V M T
841 AGAGATTCGCTGTGATGTCACCTGGAGCCAGTGTCTCATTGGAAAATGTGATGACA
301 R R K K H S F Q E L P A N V L N C Y K K
901 AGGAGAAAGAAACACAGCTTTCAGGAGTACCCGCCAACGCTTGAAGTGTACAAAGAA
321 K Q K E K R I F
961 AAACAGGAGAAAAGAGGATGTA
    
```

图 2 半滑舌鳎 *p40c* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列
Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *p40c* gene in *C. semilaevis*

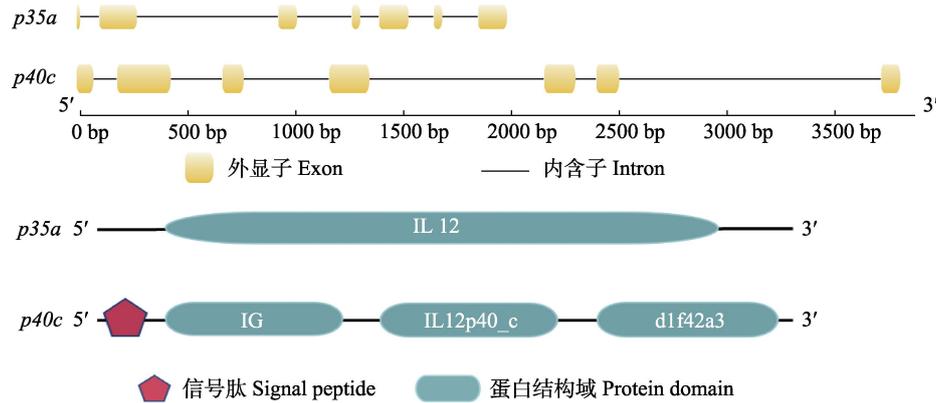


图 3 半滑舌鳎 *p35a* 和 *p40c* 的基因结构示意图及蛋白质结构域预测
Fig.3 Gene structure and protein prediction of *p35a* and *p40c* in *C. semilaewis*

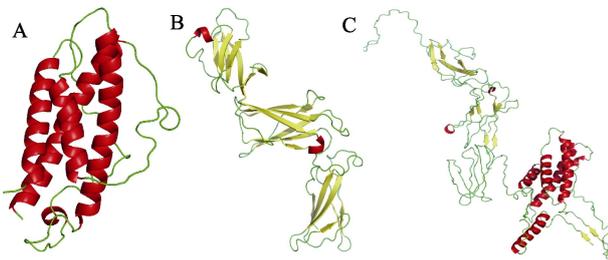


图 4 P35a、P40c 和 IL-12 蛋白质的三维结构预测
Fig.4 Three dimensional structure prediction of P35a, P40c and IL-12 protein

A: P35a; B: P40c; C: IL-12

2.2 系统进化树和多序列比对分析

系统进化树结果显示, P35 与 P40 均聚为 4 支, 其中, P35 分为鱼的 P35a、P35b, 鸟类的 P35 和哺乳动物的 P35 (图 5A), P40 分别为鱼类的 P40a、P40b, P40c 以及鸟类和哺乳动物的 P40 (图 5B)。半滑舌鳎的 P35 和 P40 分别与鱼类的 P35a 和 P40c 聚为一支, 说明它们在进化关系上更为接近。

半滑舌鳎 P35a 和 P40c 蛋白序列与其他物种蛋白序列的比对分析结果见表 2 (所用物种氨基酸序列同系统进化树所用氨基酸序列一致)。P35a 蛋白与红鳍东方鲀的 P35a 蛋白相似性最高, 为 52.04%。P40c 蛋白与三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)的 P40c 蛋白的序列相似性最高, 为 48.67%。

2.3 组织表达模式

p35a 和 *p40c* 在半滑舌鳎不同组织的表达显示, *p35a* 基因在鳃、心、脑和卵巢等组织表达水平较高, 在其他组织中也有一定程度表达; *p40c* 基因在肝中表达水平最高, 在脾和鳃中有较高表达, 在心脏、精巢和胃中也有一定程度的表达, 而在肾和肌肉中几乎不表达(图 6)。

2.4 *p35a* 和 *p40c* 在哈维氏弧菌感染实验中的表达分析

哈维氏弧菌感染后, *p35a* 和 *p40c* 在脾、肝、肾和肠中均有显著性表达差异。在脾脏和肝脏中的表达模式相似。在脾中, *p40c* 在 6 h 显著升高, 之后表达逐渐降低; *p35a* 在 48 h 显著升高, 之后表达逐渐降低。在肝中, *p40c* 同样在 6 h 显著升高; 但 *p35a* 在 72 h 才显著升高。在肾和肠中, *p35a* 和 *p40c* 则呈现出与之不同的表达模式。在肠中, *p40c* 率先在 6 h 上调, 之后持续上调到 48 h 表达最高, 维持高表达达到 72 h, 之后在 96 h 与 *p35a* 一起下调。*p35a* 在 6 h 升高, 中间表达量降低, 于 48 h 表达最高, 之后表达量逐渐下降; *p40c* 在 48 h 显著升高, 之后逐渐降低(图 7)。

2.5 *IL-12* 相关基因(*ifn-γ*、*il-10*) 在哈维氏弧菌感染实验中的表达分析

哈维氏弧菌注射后, *ifn-γ* 在脾脏和肠道中的表达模式相似, *ifn-γ* 表达在 6 h 开始升高, 在 16 h 达到最高, 之后表达逐渐下降。*il-10* 在脾中, 16 h 表达开始上调, 在 *ifn-γ* 开始下降后的第 48 小时达到最高, 之后表达逐渐下降; 在肠中差异情况较小。*ifn-γ* 和 *il-10* 在肾脏和肝脏中的表达模式相似, *ifn-γ* 和 *il-10* 均在 6 h 显著上调, 之后在脾中表达逐渐降低; *il-10* 会在肝中的 16 h 维持一定的高表达, 直到 48 h 才和 *ifn-γ* 一起逐渐下降(图 8)。

2.6 半滑舌鳎相关基因在淋巴细胞中过表达 pHAGE-*p35a* 和 pHAGE-*p40c* 后的表达模式

转染空载体的对照组 *p35a* 和 *p40c* 基因表达量较低, 且在不同浓度的 LPS 刺激后, 表达量没有显著差异。转染 pHAGE-*p35a* 和 pHAGE-*p40c* 载体的实验组, *p35a* 和 *p40c* 基因表达量显著高于对照组(图 9)。

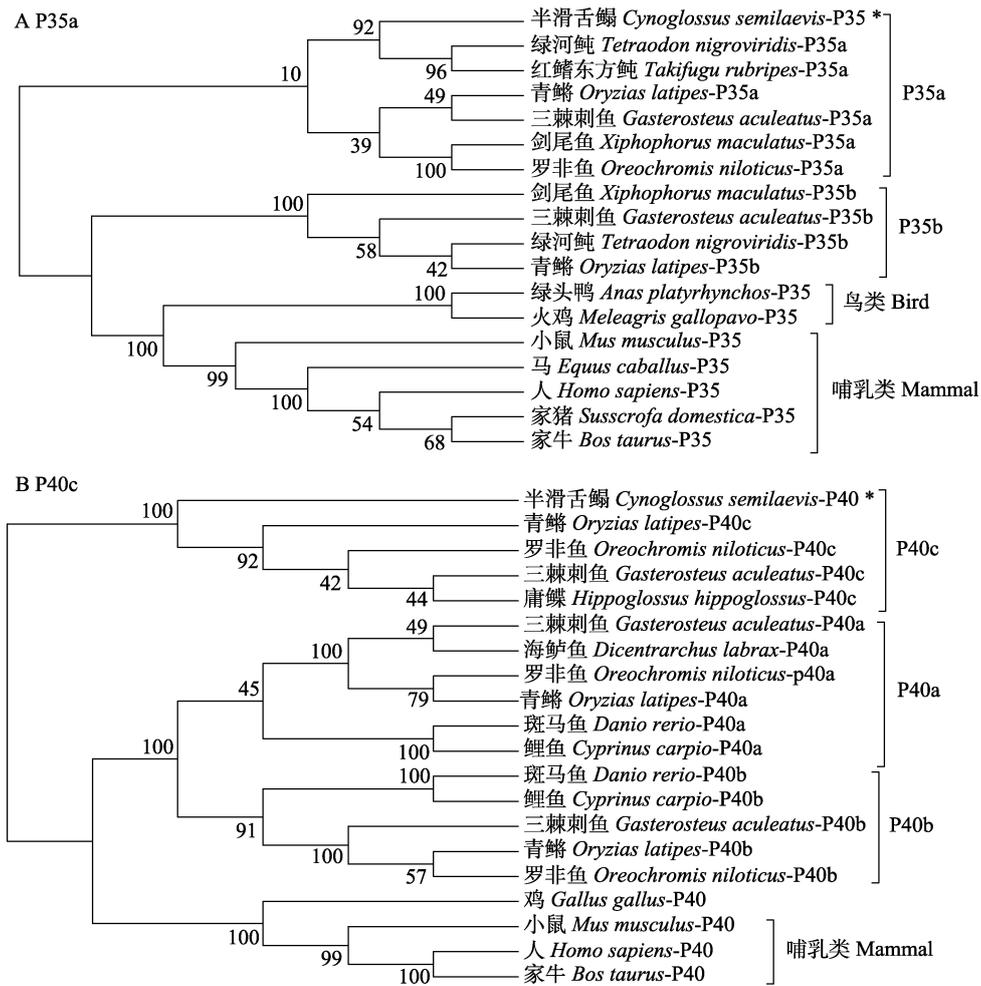


图 5 P35a (A)和 P40c (B)系统发育树
Fig.5 Phylogenetic analysis of P35a (A) and P40c (B) proteins

氨基酸序列号:

P35a: 绿河鲀(H3C7F9); 红鳍东方鲀(H2SI85); 青鲮(XP_004075675.1); 三棘刺鱼(G3P753); 剑尾鱼(XP_023207637.1); 罗非鱼(I3J6P0)

P35b: 绿河鲀(Q6UAL9); 青鲮(XP_004079386.2); 三棘刺鱼(G3PKZ2); 剑尾鱼(XP_023190996.1)。

P35: 鸭(U3IER1); 火鸡(G1NDR2); 小鼠(P43431); 马(Q9XSQ6); 人(P29459); 猪(Q29053); 牛(P54349)。

P40c: 青鲮(H2L9T4); 罗非鱼(I3KA75); 三棘刺鱼(G3NJZ0); 庸鲽(D0QTF8)。

P40b: 斑马鱼(A8WH95); 鲤鱼(Q2PCT1); 三棘刺鱼(G3QAY2); 青鲮(H2LA74); 罗非鱼(I3JPN9)。

P40a: 斑马鱼(Q6F3Q9); 鲤鱼(Q2PD23); 青鲮(H2LTF6); 罗非鱼(I3KMB3); 海鲈鱼(Q1KX13); 三棘刺鱼(G3Q3E4)。

P40: 鸡(Q6X0K9); 鼠(P43432); 人(P29460); 牛(P46282)

Amino acid sequence number:

P35a: *Tetraodon nigroviridis* (H3C7F9); *Takifugu rubripes* (H2SI85); *Oryzias latipes* (XP_004075675.1); *Gasterosteus aculeatus* (G3P753); *Xiphophorus maculatus* (XP_023207637.1); *Oreochromis niloticus* (I3J6P0).

P35b: *Tetraodon nigroviridis* (Q6UAL9); *Oryzias latipes* (XP_004079386.2); *Gasterosteus aculeatus* (G3PKZ2); *Xiphophorus maculatus* (XP_023190996.1).

P35: *Anas platyrhynchos* (U3IER1); *Meleagris gallopavo* (G1NDR2); *Mus musculus* (P43431); *Equus caballus* (Q9XSQ6); *Homo sapiens* (P29459); *Sus scrofa domestica* (Q29053); *Bos taurus* (P54349).

P40c: *Oryzias latipes* (H2L9T4); *Oreochromis niloticus* (I3KA75); *Gasterosteus aculeatus* (G3NJZ0); *Hippoglossus hippoglossus* (D0QTF8).

P40b: *Danio rerio* (A8WH95); *Cyprinus carpio* (Q2PCT1); *Gasterosteus aculeatus* (G3QAY2); *Oryzias latipes* (H2LA74); *Oreochromis niloticus* (I3JPN9).

P40a: *Danio rerio* (Q6F3Q9); *Cyprinus carpio* (Q2PD23); *Oryzias latipes* (H2LTF6); *Oreochromis niloticus* (I3KMB3); *Dicentrarchus labrax* (Q1KX13); *Gasterosteus aculeatus* (G3Q3E4).

P40: *Gallus gallus* (Q6X0K9); *Mus musculus* (P43432); *Homo sapiens* (P29460); *Bos taurus* (P46282)

表2 半滑舌鲷 P35a 和 P40c 蛋白序列与其他物种蛋白序列的相似性

Tab.2 Similarity of P35a and P40c protein sequences between *C. semilaevis* and other species

基因 Gene	物种 Species	蛋白质序列的相似性 Alignment of protein sequence similarity/%
<i>p35a</i>	红鳍东方鲷 <i>T. rubripes</i>	52.04
	绿河鲷 <i>T. nigroviridis</i>	48.11
	青鲷 <i>O. latipes</i>	43.41
	三棘刺鱼 <i>G. aculeatus</i>	42.51
	剑尾鱼 <i>X. maculatus</i>	45.68
	罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	48.81
<i>p40c</i>	青鲷 <i>O. latipes</i>	41.90
	罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	48.66
	三棘刺鱼 <i>G. aculeatus</i>	48.67
	庸鲷 <i>H. hippoglossus</i>	46.84

对照组 *tnf-α* 表达量在不同浓度的 LPS 刺激下,随着 LPS 浓度的增加,表达量呈上升趋势。实验组在转染 *p35a* 和 *p40c* 的过表达载体后,*tnf-α* 的表达量上升幅度显著高于对照组。*tnf-β*、*ifn-γ* 和 *il-10* 基因的表达量在对照组和实验组中均没有显著变化(图 10)。

3 讨论

本研究获得了半滑舌鲷 *p35a* 亚基和 *p40c* 亚基基因的编码序列,进化树分析表明它们分别属于鱼类 *p35a* 和 *p40c* 亚型。结构域预测显示, *p35a* 和 *p40c* 基因都

含有典型的 IL-12 家族结构域,且都不含跨膜结构域。*p40c* 还含有 *p40* 亚基都具有的免疫球蛋白结构域(IG)和 I 类细胞因子受体结构域(d1f42a3)。前期研究报道,与 *p40c* 具有相似结构域的造血细胞因子受体家族成员 IL-6 受体(*IL-6Ra*),可以通过蛋白质水解或选择性剪接的方式以可溶性形式(缺乏跨膜结构域)从细胞中释放,然后可溶性 IL-6R 和 IL-6 在溶液中结合成复合物,介导下游信号通路的调控(Collison *et al*, 2012; Vignali *et al*, 2012)。因此,可以把 IL-12 理解成 *p35* 细胞因子与 *p40* 可溶性细胞因子受体共价结合形成的复合物。组织表达结果显示, *p35a* 主要在鳃、脑、心和卵巢中具有较高表达, *p40c* 主要在肝、鳃、心脏和精巢中具有较高表达。*p35a* 和 *p40c* 均在鳃中高表达,可能是因为鳃是病原体首先侵入鱼体的器官。

本研究分析了半滑舌鲷 *p35a* 和 *p40c* 在哈维氏弧菌感染后的时空表达特征。免疫器官中的 *p35a* 和 *p40c* 及相关基因(*ifn-γ* 和 *il-10*)存在时空表达差异性。在脾和肝中, *p35a* 和 *p40c* 不在同一时间高表达,但 *p35* 亚基也不会以单体形式存在于细胞中(D'Andrea *et al*, 1992)。目前,已在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)等硬骨鱼中发现了 *p35a* 亚基和 *p40c* 亚基的多个亚型(Pandit *et al*, 2015; Wang *et al*, 2014b),表明半滑舌鲷中可能还具有 *p40* 亚基的其他亚型。*p40* 亚基的同源二聚体可以通过结合 IL-12 受体来抑制 IL-12 的产生(Heinzel *et al*, 1997),但结合 *ifn-γ* 在脾和肝中的表达模式, *p40c* 亚基更可能是与 *p35* 亚基的其他亚型形成 IL-12 在免疫器官中发挥调控作用。因此,推测在半滑舌鲷中存在

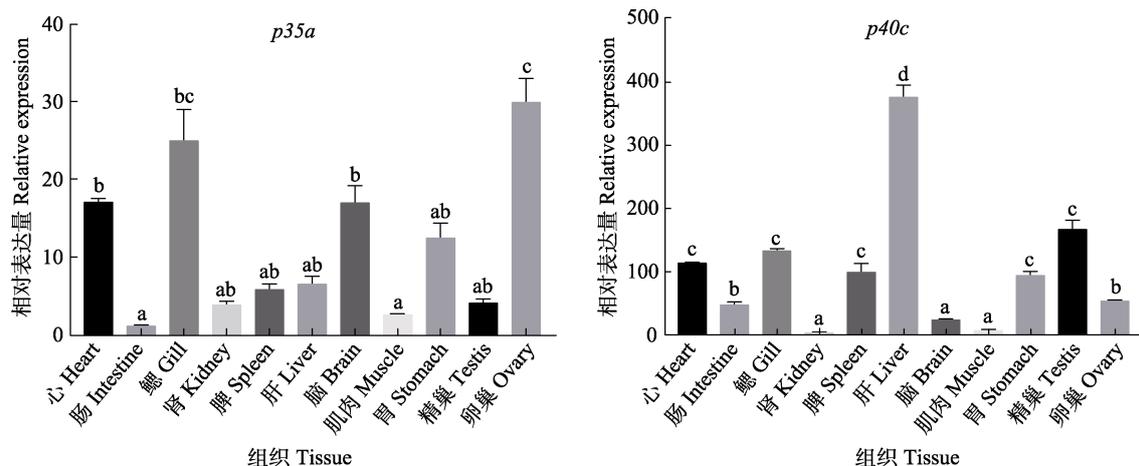


图6 *p35a*(A)和 *p40c*(B)基因在半滑舌鲷中的组织表达模式

Fig.6 Tissue expression analysis of *p35a* and *p40c* in *C. semilaevis*

数据用 3 个独立个体的平均值±标准误差表示($n=3$)。不同字母间表示差异显著($P<0.05$)

Data were the Mean±SE of three independent individuals ($n=3$). Different letters represent significant difference ($P<0.05$)

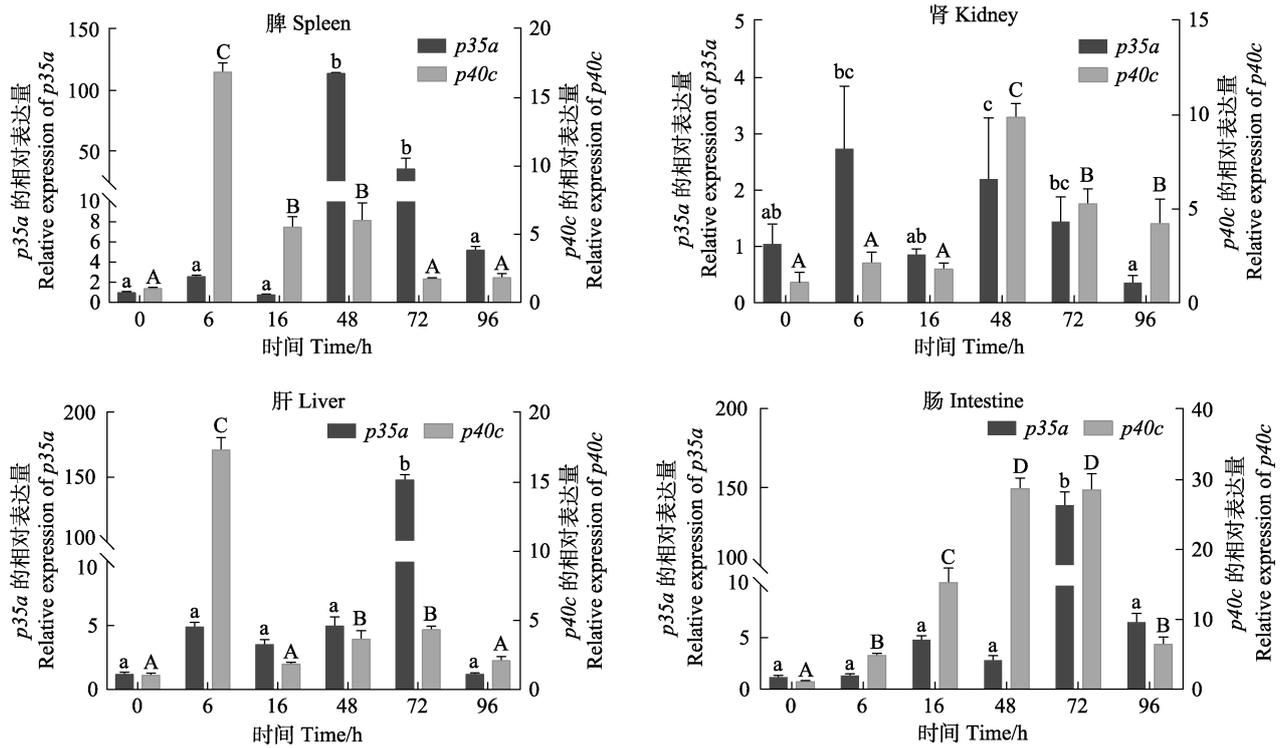


图 7 *p35a* 和 *p40c* mRNA 在哈维氏弧菌感染后的半滑舌鳎免疫组织中的表达模式

Fig.7 Expression patterns of *p35a* and *p40c* mRNA in *C. semilaevis* immune tissues after *V. harveyi* infection

字母的大小写标注仅用来区分不同基因间的显著性, 不同字母间表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同
The case labeling of letters is only used to distinguish the significance between different genes, and the difference with different letters was significant ($P < 0.05$). The same as below

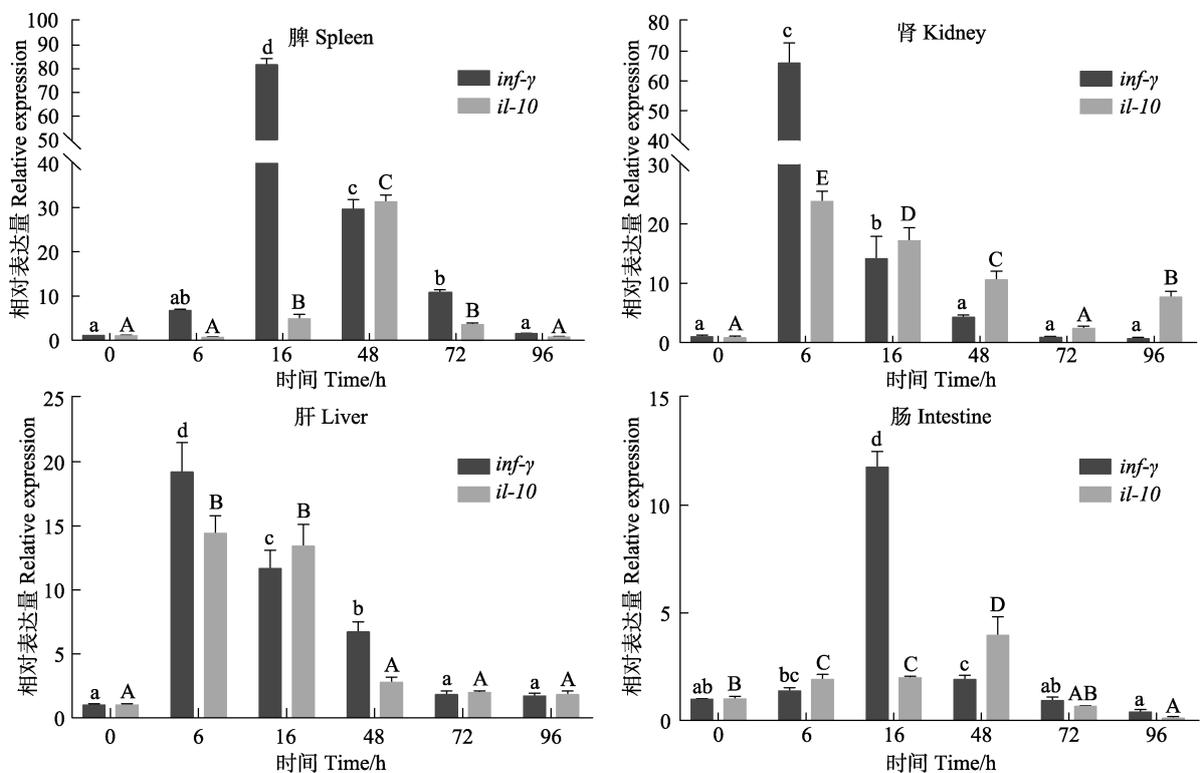


图 8 *inf-γ* 和 *il-10* 在哈维氏弧菌感染后的半滑舌鳎免疫组织中的表达模式

Fig.8 Expression patterns of *inf-γ* and *il-10* mRNA in *C. semilaevis* immune tissues after *V. harveyi* infection

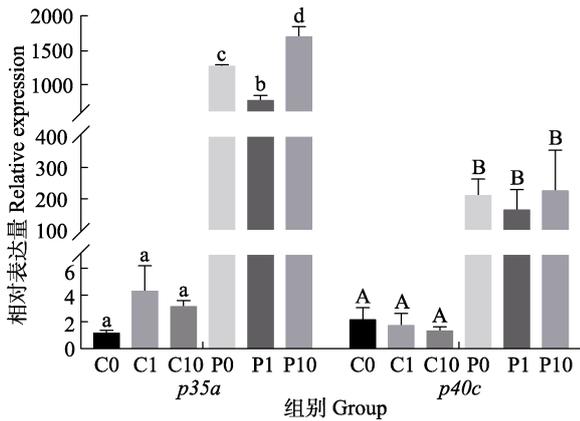


图9 细胞过表达实验中 *p35a* 和 *p40c* 基因的表达模式
Fig.9 Expression patterns of *p35a* and *p40c* genes in cell overexpression assay

对照组(C): 转染空载体; 实验组(P): *p35a* 和 *p40c* 共转, 均用 0、1、10 ng/L 的 LPS 进行刺激。

组别命名为 C0、C1、C10、P0、P1 和 P10。下同

Control group (C): Transfected with empty vector;
Experimental group (P): Co-transfected with *p35a* and *p40c*.
Stimulated with 0, 1, 10 ng/L LPS. The groups were named as C0, C1, C10, P0, P1, and P10. The same as below

多个 *p35* 亚基和 *p40* 亚基的亚型。在肠中, *p35a* 和 *p40c* 的表达趋势一致, 表明半滑舌鳎 IL-12 的 *p35a/p40c* 亚型在应对哈维氏弧菌感染时可能在肠中发挥相应作用。而在肾中, 由于表达量变化不明显以及其组织表达量低, 还需要进一步探究 *p35a* 和 *p40c* 在肾脏中是否响应哈维氏弧菌感染。上述结果表明, IL-12 的不同亚型可能在不同的免疫器官中发挥不同的免疫功能。

在哈维氏弧菌感染实验中, 还检测了 *ifn-γ* 和 *il-10* 在半滑舌鳎不同免疫组织中的表达模式。在脾中, 呈现出典型的 IL-12 调控模式(Wang *et al.*, 2014a), *p40c*

在 6 h 升高后, 与其他亚型的 *p35* 亚基产生 IL-12, 从而诱导 *ifn-γ* 在 16 h 显著升高; *il-10* 在 48 h 急剧升高, 抑制 IL-12 的产生, 从而使 *p35a* 和 *p40c* 在 48 h 之后的表达逐渐降低。在肠中, *ifn-γ* 在 IL-12 表达升高前高表达, 之后下降, 并没有因 *p35a* 表达量升高而维持在一个较高水平, 这暗示 *ifn-γ* 在肠中可能主要发挥激活 IL-12 细胞因子产生的功能(Zhang *et al.*, 2008)。而 *il-10* 作为 Th2 免疫应答的主要细胞因子, 其表达均在 IL-12 高表达后被抑制, 表达模式和发挥的功能较为单一, 这可能是由于 Th0 细胞向 Th1 细胞或 Th2 细胞的分化途径相对较为保守(Collison *et al.*, 2012)。作为与 IL-12 相关的细胞因子, *ifn-γ* 发挥功能呈现出时空多样性, 侧面佐证了 IL-12 可能在不同器官中对相关的免疫应答具有差异调控作用, 这表明 IL-12 的调控方式可能较为复杂。到目前为止, IL-12 受体在鱼类中还未确定, 哺乳动物的 IL-12 受体由亚基 1 和亚基 2 构成。由于鱼类基因组复制事件, 免疫基因(细胞因子和细胞因子受体)通常以 2 个拷贝的形式存在(Husain *et al.*, 2012)。IL-12 配体和受体亚单位的多样性组合, 进一步证明鱼类 IL-12 调控系统的复杂性。因此, IL-12 细胞因子在鱼类中通过多种同源基因的扩增, 共享配体和受体中的亚基, 可能组成了一个极其复杂的内部调节网络来微调它们的免疫反应。

在 LPS 刺激半滑舌鳎淋巴细胞实验中, *tnf-α* 的表达量响应了 LPS 刺激, *p35a* 和 *p40c* 表达量变化对 LPS 刺激响应不显著。可能因为 *p35a/p40c* 亚型不是体外培养的淋巴细胞中主要响应 LPS 的免疫蛋白。在之前的研究中, 虹鳟不同亚型的 IL-12 分别针对不同的刺激源(病毒、细菌和寄生虫)展现出不同的表达模式。其中, *p35/p40c* 亚型针对病毒和寄生虫感染,

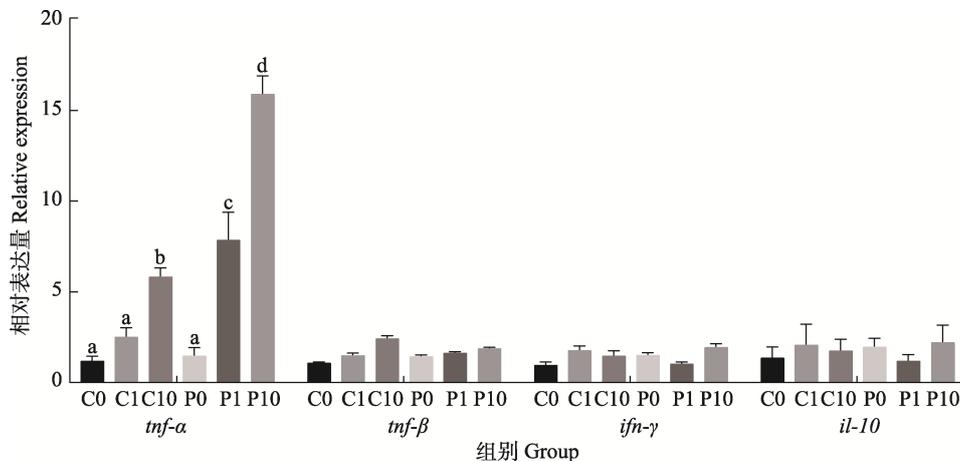


图10 LPS 刺激半滑舌鳎过表达 *p35a* 和 *p40c* 淋巴细胞的相关基因表达模式

Fig.10 Gene expression patterns of over-expressed *p35a* and *p40c* lymphocytes stimulated by LPS in *C. semilaevis*

表达明显上调, 而针对细菌感染, 表达上调不显著 (Wang *et al.*, 2014b)。在过表达 *p35a* 和 *p40c* 后, 实验组 *tnf- α* 的表达量响应 LPS 刺激的上升幅度明显高于对照组, 表明 IL-12 的 *p35a/p40c* 亚型能够通过诱导 *tnf- α* 基因的表达, 参与半滑舌鳎淋巴细胞响应 LPS 刺激, 提升机体的免疫应答水平。

综上所述, IL-12 是半滑舌鳎响应哈维氏弧菌病, 参与免疫调控并提升免疫应答水平的重要细胞因子。因此, 可以使用重组的 IL-12 作为半滑舌鳎的哈维氏弧菌疫苗的佐剂之一, 但由于半滑舌鳎 IL-12 参与的免疫应答非常复杂, 需进一步研究半滑舌鳎 IL-12 的所有组成亚基, 探究不同组成的 IL-12 的结构特征和免疫调控模式, 从而提高半滑舌鳎的 IL-12 作为疫苗佐剂所增强的免疫效果。

参 考 文 献

- ARTS J, TIJHAAR E, CHADZINSKA M, *et al.* Functional analysis of carp interferon- γ : Evolutionary conservation of classical phagocyte activation. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(5): 793–802
- CHEN S, ZHANG G, SHAO C, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260
- COLLISON L W, DELGOFFE G M, GUY C S, *et al.* The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature Immunology*, 2012, 13(3): 290–299
- D'ANDREA A, RENGARAJU M, VALIANTE N M, *et al.* Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Experimental Medicine*, 1992, 176(5): 1387–1398
- GEE K, GUZZO C, CHE MAT N F, *et al.* The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8(1): 40–52
- GILLESSEN S, CARVAJAL D, LING P, *et al.* Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: A potent IL-12 antagonist. *European Journal of Immunology*, 1995, 25(1): 200–206
- HEINZEL F P, HUJER A M, AHMED F N, *et al.* In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *Journal of Immunology*, 1997, 158(9): 4381–4388
- HSIEH C S, MACATONIA S E, TRIPP C S, *et al.* Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 1993, 260(5107): 547–549
- 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. *Molecular Immunology*, 2006, 43(10): 1519–1533
- HUSAIN M, BIRD S, VAN ZWIETEN R, *et al.* Cloning of the IL-1b3 gene and IL-1b4 pseudogene in salmonids uncovers a second type of IL-1b gene in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 38(3): 431–446
- JONES L L, VIGNALI D A. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunologic Research*, 2011, 51(1): 5–14
- 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. *Journal of Experimental Medicine*, 1989, 170(3): 827–845
- LI K M, XU W T, FU X Q, *et al.* Gene cloning and immune response analysis of protein kinase C- α (PKC α) in *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 69–77 [李坤明, 徐文腾, 扶晓琴, 等. 半滑舌鳎蛋白激酶 C- α (PKC α)的基因克隆和免疫应答分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(2): 69–77]
- LIU Y, XU W, ZHANG B, *et al.* QTL Detection for albinism-related loci in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Ocean University of China*, 2018, 17: 1404–1410
- MANETTI R, PARRONCHI P, GIUDIZI M G, *et al.* Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *Journal of Experimental Medicine*, 1993, 177(4): 1199–1204
- MATSUMOTO M, ARAKI K, HAYASHI K, *et al.* Adjuvant effect of recombinant interleukin-12 in the Nocardiosis formalin-killed vaccine of the amberjack *Seriola dumerili*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 67: 263–269
- 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. *Molecular Immunology*, 2007, 44(9): 2277–2291
- ØVERGÅRD A C, NEPSTAD I, NERLAND A H, *et al.* Characterisation and expression analysis of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) cytokines: IL-1b, IL-6, IL-11, IL-12b and IFN γ . *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(3): 2201–2213
- 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*. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 1169–1183
- PROCHAZKOVA J, POKORNA K, HOLAN V. IL-12 inhibits the TGF- β -dependent T cell developmental programs and skews the TGF- β -induced differentiation into a Th1-like direction. *Immunobiology*, 2012, 217(1): 74–82
- SCHOENHAUT D S, CHUA A, WOLITZKY A, *et al.* Cloning and expression of murine IL-12. *Journal of Immunology*,

- 1992, 148(11): 3433–3440
- SONG W T. Breeding and research progress of *Cynoglossus semilaevis* in China. *Journal of Science, Technology and Economics*, 2016(20): 95 [宋文涛. 我国半滑舌鳎养殖及研究进展. *科技经济导刊*, 2016(20): 95]
- 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. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 27–37
- VIGNALI D A, KUCHROO V K. IL-12 family cytokines: Immunological playmakers. *Nature Immunology*, 2012, 13(8): 722–728
- WANG S Y, WANG L, CHEN Z F, *et al.* Cloning and expression analysis of polyglobulin receptor (pIgR) gene in *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 51–57 [王双艳, 王磊, 陈张帆, 等. 半滑舌鳎多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因的克隆和表达分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 51–57]
- WANG T, 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. *European Journal of Immunology*, 2014b, 44(5): 1541–1551
- WANG T, 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*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014a, 46(2): 194–207
- WATFORD W T, MORIGUCHI M, MORINOBU A, *et al.* The biology of IL-12: Coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2003, 14(5): 361–368
- WEI M, XU W T, GAN T, *et al.* Cloning, expression profile, and immune characterization of a novel stat family member (stat5bl) in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 84: 962–969
- WEI M, XU W T, LI H L, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of a novel r-spondin member (rspo2l) in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018b, 72: 436–442
- WEI M, XU W T, LI K M, *et al.* Cloning, characterization and functional analysis of *dctn5* in immune response of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018a, 77: 392–401
- YOSHIURA Y, KIRYU I, FUJIWARA A, *et al.* Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics*, 2003, 55(5): 296–306
- ZHANG S, WANG Q. Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: Regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 372(4): 509–512

(编辑 冯小花)

Expression and Regulation Analysis of the *p35a* and *p40c* Subunits of Interleukin 12 in *Cynoglossus semilaevis* Infected by *Vibrio harveyi*

ZHANG Zhihua^{1,2}, FENG Bo^{1,2}, ZHU Tengfei², HAO Xiancai²,
WANG Qian², SHAO Changwei², WANG Hongyan²^①

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract Interleukin 12 (IL-12), a key molecular switch in the immune response, is a pleiotropic cytokine composed of the *p35a* and *p40c* subunits. It has been proven that IL-12 can be used as a vaccine adjuvant to enhance the immune response level of fish, and is used in the development of vaccines against pathogen infection. In this study, we cloned the coding regions of the *p35a* subunit and *p40c* subunit of IL-12 in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), with a length of 651 bp and 984 bp, respectively. The phylogenetic analysis showed that the *p35a* and *p40c* of *C. semilaevis* were clustered with the corresponding genes in other fishes. The sequence of amino acid homology analysis showed that *p35a* and *p40c* of *C. semilaevis* had the highest similarity with *Takifugu rubripes* (52.04%) and *Gasterosteus aculeatus* (48.67%), respectively. The tissue expression analysis showed that *p35a* was highly expressed in the gill, brain, heart, and ovary, and *p40c* was highly expressed in the liver, spleen, gill, and heart. We further analyzed the expression patterns of *p35a*, *p40c*, and their related genes (*ifn-γ* and *il-10*) after infection with *Vibrio harveyi*. The expression of *p35a* increased significantly at 48 h ($P < 0.05$), and then gradually decreased in the spleen, and its expression increased significantly at 72 h in the liver and intestine. The expression of *p40c* increased significantly at 6 h in spleen and liver, and at 48 h in kidney. Its expression also began to increase at 6 h and peaked at 48 h in the intestine. The expression of *ifn-γ* increased significantly before the upregulated expression of *p35a* in the liver and intestine, and later than *p35a* in the spleen. The expression of *il-10* was opposite to that of *p40c* in the liver, spleen, kidney, and intestine. The expression of the immune related cytokines (*tnf-α*, *tnf-β*, *ifn-γ*, and *il-10*) in the lymphocytes of *C. semilaevis* was detected after the overexpression of the *p35a* and *p40c* genes. The results showed that *p35a* and *p40c* could significantly increase the expression of *tnf-α* under lipopolysaccharide stimulation. The results indicate that the *p35a* and *p40c* subunits of IL-12 respond to stimulation by *V. harveyi* in *C. semilaevis*, and then participate in the immune response by inducing the expression of the *tnf-α* gene, which provides a theoretical basis for the development of IL-12 as an adjuvant for the *C. semilaevis* vaccine against *V. harveyi*.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Immune response; Interleukin 12; *Vibrio harveyi*

① Corresponding author: WANG Hongyan, E-mail: wanghongyan@ysfri.ac.cn