

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)白细胞介素 10 (IL-10) 基因克隆及溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) 侵染后表达变化分析*

侯红红 苗亮 李星云 郭晓飞 杜静雅 陈炯

(宁波大学海洋学院 宁波 315211)

摘要 白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10)是鱼类先天性免疫因子之一,在炎症反应和免疫调节中有着重要作用。本研究获得大黄鱼(*Larimichthys crocea*)IL-10 基因 cDNA 序列,由 899 个核苷酸组成,含 1 个 555bp 的开放阅读框、编码 184 个氨基酸,预测编码蛋白分子量为 21.24kDa、N 端有 22 个氨基酸组成的信号肽序列。氨基酸序列多重比对表明大黄鱼 IL-10 具有 IL-10 家族特征性序列和构成 2 对二硫键的 4 个保守性半胱氨酸,与欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)IL-10 序列相似性最高(78.5%);系统进化树分析显示大黄鱼 IL-10 和其他鱼类 IL-10 形成一个大簇,与欧洲鲈进化关系最近。荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测结果显示健康大黄鱼 IL-10 基因在鳃和肠中高表达,肝和头肾中低表达;溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)侵染后大黄鱼肠、脑、脾、肝和头肾中 IL-10 基因表达量均显著上调($P < 0.05$),其中头肾和肝中上调幅度最大(分别为菌侵染前的 10.06 倍和 8.79 倍)。综上,大黄鱼 IL-10 基因表达与病原菌感染密切相关,为深入研究大黄鱼 IL-10 的生物学功能及免疫机制提供了基础资料。

关键词 大黄鱼;白细胞介素 10(IL-10)基因;溶藻弧菌;表达分析

中图分类号 Q786; S917 doi: 10.11693/hyhz20180200043

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国海水鱼类中养殖规模最大、产量最高的主要经济种类(农业部渔业渔政管理局, 2016),但近年来网箱养殖大黄鱼病害发作呈逐年递增趋势,造成了严重的经济损失,不仅病原多样化、且出现耐药性,加大了病害防治难度(曹飞飞等, 2017)。因此研究大黄鱼的免疫机理并探寻免疫增加方法、开发新型药物以及进行抗病育种对于食品安全和健康养殖都具有重要的科学意义和应用价值。

鱼类具有较完善的先天性免疫系统(Magnadóttir, 2006),在多种细胞因子中,白细胞介素(interleukin, IL)在激活与调节免疫细胞、信号传递以及炎症反应

中起重要作用(丰培金, 2006)。白细胞介素家族中的白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)是一种强效的抗炎性细胞因子,最初发现自小鼠的 Th2 细胞(Fiorentino *et al.*, 1991),之后的研究显示几乎所有的白细胞(包括 T 细胞、B 细胞、树突细胞、NK 细胞、肥大细胞和角化细胞等)均能产生 IL-10(Blanco *et al.*, 2008),IL-10 能通过激活巨噬细胞和防止组织损伤而有抑制炎症反应的效果(Moore *et al.*, 2001),其作用机制包括下调主要组织相容性复合体 II 类(major histocompatibility complex class II, MHC II)基因的表达、减少 NO 的产生以及抑制巨噬细胞产生炎症因子(如 IL-1 β 、IL-12、TNF- α)等。目前已在鲤(*Cyprinus*

*浙江省重大科技专项, 2016C02055-7 号; 国家高技术研究发展(863)项目, 2012AA10A403-4 号; 宁波市科技创新团队计划, 2015C110018 号。侯红红, 硕士研究生, E-mail: hhhou0908@163.com

通讯作者: 苗亮, 副教授, 硕士生导师, E-mail: miaoliang@nbu.edu.cn

收稿日期: 2018-02-24, 收修改稿日期: 2018-04-05

carpio)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)等多种鱼类中进行了*IL-10*基因克隆、分析,并发现其参与机体抵御病原侵染的免疫反应(高珊等, 2014; Peng *et al*, 2017)。

对大黄鱼全基因组的分析显示其先天性免疫系统较为完善(Wu *et al*, 2014), 白细胞介素家族是大黄鱼先天性免疫系统的重要组成部分, 目前已对大黄鱼*IL-1 β* 、*IL-8*、*IL-17*等白介素家族基因在抵御病原侵染中的作用进行了研究(Li *et al*, 2013; Mu *et al*, 2015; Wu *et al*, 2015; Ding *et al*, 2016), 但未见有关于*IL-10*基因的研究报道。本研究克隆了大黄鱼*IL-10* cDNA 序列, 并通过实时荧光定量 PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR) 检测溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 侵染后大黄鱼组织中*IL-10*的表达变化, 以期了解大黄鱼*IL-10*基因的结构及其在机体内的免疫机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及溶藻弧菌侵染实验

实验用鱼为购自宁波市象山海韵水产专业合作社的网箱养殖“东海 1 号”大黄鱼(平均体长 19.5cm, 平均体重 89.3g), 运至实验室暂养 1 周。随机取 3 尾

健康、无病的鱼, 丁香酚麻醉后解剖取心脏、肝、脾、肠、头肾、肌肉、鳃、脑等组织, 液氮速冻后 -80°C 保存, 用于*IL-10*基因克隆及组织表达检测。随机挑选 60 尾健康、无病的个体进行溶藻弧菌侵染实验: 将鱼随机分为 2 组, 其中实验组腹腔注射浓度为 10^8 cfu/mL 溶藻弧菌溶液 0.2mL, 对照组注射等量无菌的 PBS 溶液, 实验组和对照组各设置 3 组重复; 分别在注射(0h)和注射后 4h、8h、12h 和 24h 采样, 每次每组随机取 6 尾鱼、丁香酚麻醉后解剖取肠、脑、脾、肝和头肾, 液氮速冻后 -80°C 保存, 用于检测*IL-10*表达变化。

采集的组织样品用 RNAiso Plus 试剂(TaKaRa)提取总 RNA, 用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa)反转录合成 cDNA。

1.2 大黄鱼 *IL-10* 基因克隆

根据本实验室大黄鱼巨噬细胞转录组测序获得的*IL-10*部分序列, 用 Primer 5.0 软件设计引物 *lc-IL10-V*(表 1)在肝脏 cDNA 中进行扩增验证, PCR 产物先经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 对目的条带切胶回收后连入 pET-28a 载体, 转化入大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5 α 菌株, 经蓝白斑筛选后对阳性克隆进行测序。

表 1 引物信息
Tab.1 Information of the primers

引物名称	序列(5'—3')	退火温度($^{\circ}\text{C}$)	用途
<i>lc-IL10-V</i>	F: ATTCACCGGCATGACTC R: CTATGCCGTTTAGAAGCC	56	序列扩增
<i>lc-IL10-3'-O</i>	ACTTCCACTGCAAGAACCAG	56	3'-RACE 扩增的外侧引物
<i>lc-IL10-3'-I</i>	TACATTGAGACGTATCTGGC	54	3'-RACE 扩增的内侧引物
<i>q-lc-IL10</i>	F: CTGGTTCCTTGTCTTTTTTC R: CATAGTTTAGTCTGAGCGTCT	56	表达检测
<i>β-actin</i>	F: ACGTTGCCATCCAGGCTGTGCT R: ACGCACGATTCCTCTCGGCT	56	表达检测内参

用 3'-Full RACE Core Set with PrimeScriptTM RTase 试剂盒(TaKaRa)进行 3'-RACE 反应, 步骤为将肝脏总 RNA 反转录合成 cDNA 并与 3'RACE Adaptor 连接, 用引物 *lc-IL10-3'-O* 和 3'RACE Outer Primer 进行第 1 轮扩增, 用引物 *lc-IL10-3'-I* 和 3'RACE Inner Primer 进行第 2 轮扩增。其中引物 *lc-IL10-3'-O* 和 *lc-IL10-3'-I*(表 1)为根据前一步验证后的大黄鱼*IL-10*部分序列自行设计, 引物 3'RACE Outer Primer 和 3'RACE Inner Primer 为试剂盒提供。按照试剂盒说明书配制 PCR 体系和设置反应程序, PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的条带、连入 pET-28a

载体、转化入 *E. coli* DH5 α 菌株、蓝白斑筛选后对阳性克隆测序, 经序列拼接后获得大黄鱼*IL-10*基因 cDNA 序列。本实验所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 样品测序均由华大基因完成。

1.3 大黄鱼 *IL-10* 基因 cDNA 序列分析及表达检测

对获得的大黄鱼*IL-10* cDNA 序列, 用在线 BLASTX 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行序列同源性比对和相似性分析, 用 EditSeq 软件分析开放阅读框(open reading frame, ORF)并推测编码氨基酸序列, 用 Compute pI/Mw 工具 (http://web.expasy.org/compute_pi)预测等电点, 用 SignalP 4.1 工

具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽, 用 NetNGlyc 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测糖基化位点。从 GenBank 数据库中下载各种白细胞介素蛋白序列, 用 ClustalW 程序 (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) 进行多重序列比对, 用 MEGA 5.0 软件构建邻接法 (neighbor-joining method, NJ method) 系统进化树。

设计引物 *q-lc-IL10*, 并以 β -actin 作为内参基因 (表 1) 检测健康大黄鱼心脏、肝、脾、脑、肠、肌肉、鳃、头肾等 8 种组织中以及溶藻弧菌侵染前、后不同时间肠、脑、肝、头肾、脾等 5 种组织中 *IL-10* 的表达情况。在 Mastercycler ep realplex 实时定量 PCR 仪 (Eppendorf) 上进行 qRT-PCR 反应, 20 μ L 反应体系包括: SYBR[®] Premix Ex Taq (TaKaRa) 10 μ L, 10 μ mol/L 的正、反向引物各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 2min (94 $^{\circ}$ C 15s, 56 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 30s) \times 40 次循环。根据目的基因和内参基因的 Ct 值, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 (Livak *et al.*, 2001) 计算 *IL-10* 基因相对表达量。所得数据用

SPSS 19.0 软件进行统计分析, 对各个采样点的表达量进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 大黄鱼 *IL-10* 基因 cDNA 克隆与序列特征

经扩增验证和 3'-RACE 后测序拼接, 获得的大黄鱼 *IL-10* 基因 cDNA 序列 899bp (GenBank 登录号: MG845871), 其 3' 端非编码区存在 3 个 mRNA 不稳定序列 ATTTA (其中前 2 个形成复合结构 ATTTATTTA) 和 1 个 mRNA 的加尾信号 AATAAA; 开放阅读框长度为 555bp, 推测编码蛋白含 184 个氨基酸残基, 经 SignalP 预测 N 端 22 个氨基酸 (MTPRSLLLALVLLSFFITVWTS) 为信号肽 (图 1)。预测大黄鱼 *IL-10* 基因编码蛋白分子量为 21.24kDa, 理论等电点为 6.29; NetNGlyc 分析显示大黄鱼 *IL-10* 基因的编码蛋白不存在 O-糖基化位点, 只在 Asn146 处有一个 N-糖基化位点 (可能性为 0.63)。

1		ATTTACCCGGC	11
12	ATGACTCCTCGGTCTCTCTCTATGCGCTCTGGTCTCTTGCTTTTTTCATCACTGTATGGACAAGTCCAGTGTGCGTCAACAAGTGTGCGGATTC		110
1	M T P R S L L L C A L V L L S F F I T V W T S P V C V N K C C R F		33
111	GTGGAGGACTTCCCTGTCAGGCTAAAGACGCTCAGACTAAACTATGCAGAGATCCGAGACTTTTATGAAGCCAACGATGATCTCGACACAGCTCTTCTA		209
34	V E D F P V R L K T L R L N Y A E I R D F Y E A N D D L D T A L L		66
210	GACCAGAGCGTGAAGAAACTTTTAAACCCCGTTTGCCCTGCACGCCATCAACAGCATTGATAGATTTTACCTGGCGCGGTGTACCGGGAGCTCTA		308
67	D Q S V E E T F K T P F A C H A I N S I L D F Y L A T V L P G A L		99
309	GCCGAGTGACGGAGGACCAAGAGCATGAAGCCTCACATGGAGTCCATACAGCAGATCTTCGACCAGCTCAAGAATGATGTCACCGCATGTCGACAT		407
100	A G V T E D T K S M K P H M E S I Q Q I F D Q L K N D V T A C R H		132
408	TACTTCCACTGCAAGAACAGTTTGACATCACAACCTAACTCCACTTACACTCAGATGCAGAGTAAAGGTCTATATAAGGCCATGGGTGAGCTGAAT		506
133	Y F H C K N Q F D I T N L N S T Y T Q M Q S K G L Y K A M G E L N		165
507	CTGCTGTTAACTACATTGAGACGTATCTGGCTTCTAAACGGCATAGAAACCAGTCTGAAGACCTGCGGACCCTAATCAAAGTTTTTTTTTTTGTGA		605
166	L L F N Y I E T Y L A S K R H R N H V *		184
606	ACTTACACTCTTTTGTACTCGGTCGGTACTTTCTGTGGTGTGTTGTTGTTGAGTGTGCGCGGATGTTGAATTTCTTGATGAGCTTCTGAAGT		704
705	GATTTTTTTTTCTAAACGGGTATCCTCAGTGAGGACAAATTTCCAGACCATATTGCGTCATACATATGAGGTTATAAACTAAAGAGTCACTTATG		803
804	AAAATTTATTATAAATGTATAATATATATATTATGATTTATTGTTGGATTGTTACATACAAATAAATAAATATCTGTCTAATAAAAAAAAAAAAA		899

图 1 大黄鱼 *IL-10* cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence of *lc-IL-10* cDNA and the deduced amino acid sequence

注: *示终止密码子; 阴影示信号肽; 单下划线示加尾信号 (AATAAA); 双下划线示 RNA 不稳定序列 (ATTTA); 方框示潜在的 N 糖基化位点

2.2 序列比对及系统进化树分析

经氨基酸序列比对分析 (图 2), 大黄鱼 *IL-10* 基因的编码蛋白在第 156—172 个氨基酸处具有 *IL-10* 家族特征性序列 “GLYKAMGELNLLFNIE”, 这一序列在鱼类中保守性较高; 各种动物的 *IL-10* 基因编码蛋白均含有 4 个保守的半胱氨酸, 可形成 2 对二硫键。

大黄鱼 *IL-10* 基因的编码蛋白序列与欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*) *IL-10* 蛋白的序列相似性最高 (78.5%), 与大西洋鳕鱼 (*Gadus morhua*)、虹鳟 (*O. mykiss*)、欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*)、斑马鱼 (*D. rerio*) 等鱼类 *IL-10* 蛋白的相似性均 $> 46\%$, 而与人 *IL-10* 蛋白的相似性较低 (29.2%)。

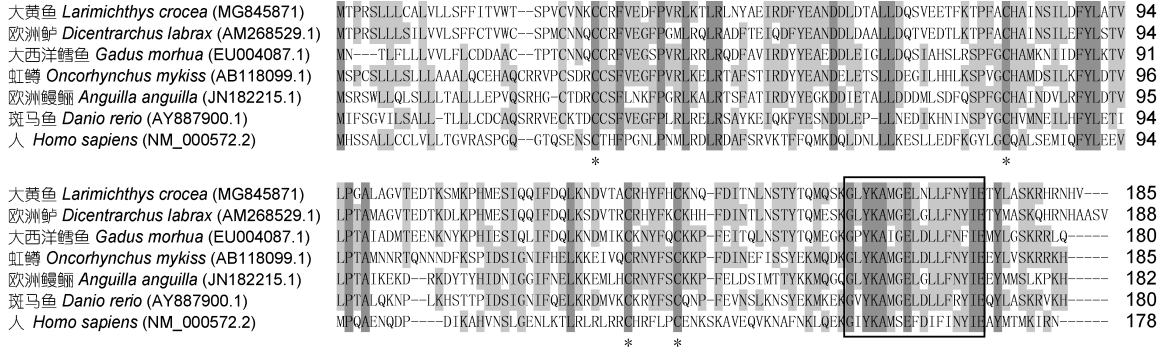


图 2 大黄鱼与其他动物 IL-10 氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple alignment of IL-10 amino acid among *L. crocea* and other vertebrates

注: 深色阴影示相同氨基酸; 浅色阴影示相似氨基酸; *示 4 个保守性半胱氨酸; 方框示 IL-10 家族特征序列

基于氨基酸序列的系统进化树分析显示(图 3), 各种动物的 IL-1、IL-8、IL-10、IL-15、IL-22 均单独成簇, 在 IL-10 大簇中, 鲤(*C. carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、斑马鱼(*D. rerio*)等鲤科鱼类单独聚为一个小簇, 本研究获得的大黄鱼 IL-10 与同属鲈形目的欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)优先相聚, 表明二者进化关系较近(图 3)。

2.3 大黄鱼 IL-10 基因的组织表达及溶藻弧菌侵染后的表达变化

qRT-PCR 检测显示健康大黄鱼心、肠、肌肉、脑、脾、肝、头肾和鳃等组织中均有 IL-10 基因表达, 鳃和肠中高表达, 脑、脾、心和肌肉呈中等表达, 肝和头肾中低表达(图 4)。

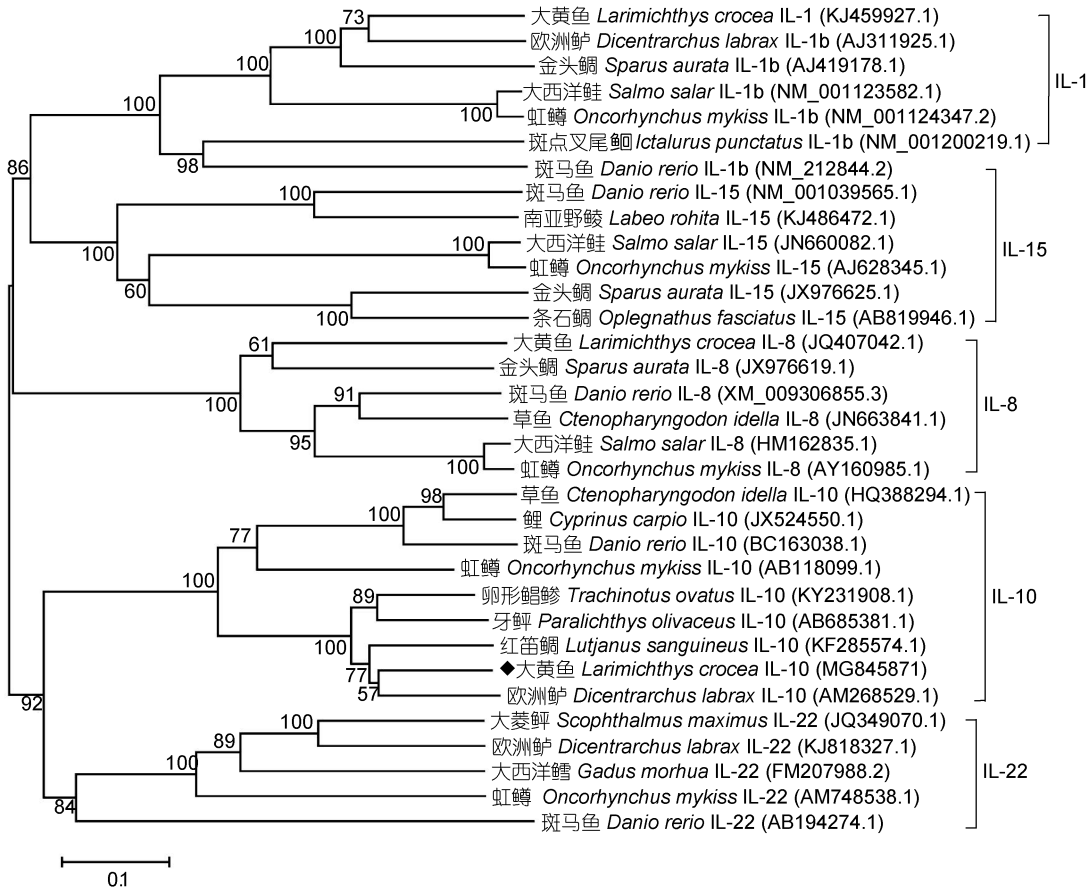


图 3 基于白细胞介素氨基酸序列构建的系统进化树(NJ 法, bootstraps=1000)

Fig.3 The phylogenetic tree based on the amino acid sequence of interleukin (neighbor-joining method, bootstraps=1000)

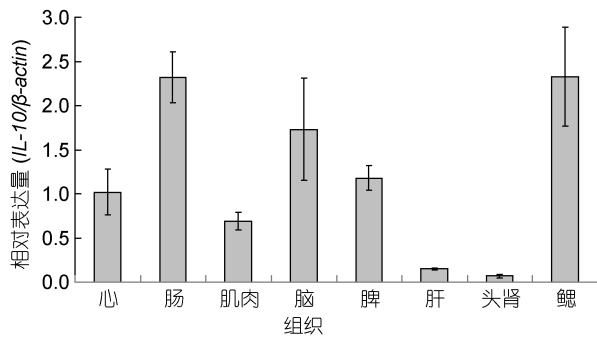


图4 qRT-PCR 检测大黄鱼 *IL-10* 基因的组织表达($n=3$)
Fig.4 The expression of *IL-10* gene in different tissues of *L. crocea* detected by qRT-PCR ($n=3$)

qRT-PCR 检测显示, 溶藻弧菌侵染后大黄鱼各组织中 *IL-10* 均出现表达上调。肠中 *IL-10* 的表达则是在菌侵染后 4h 时急剧升高, 8—24h 期间表达量逐渐降低, 表明肠对腹腔注射侵染的溶藻弧菌最为敏感; 菌侵染后 4—24h 期间, 脑、脾、肝、头肾中 *IL-10* 的表达均呈先升后降的变化, 其中肝和头肾变化幅度最大, 并均在 8h 时出现显著的表达高峰(分别达侵染前的 8.79 倍和 10.06 倍), 提示在溶藻弧菌侵染引起的免疫反应中肝和头肾可能是主要的参与器官(图 5)。

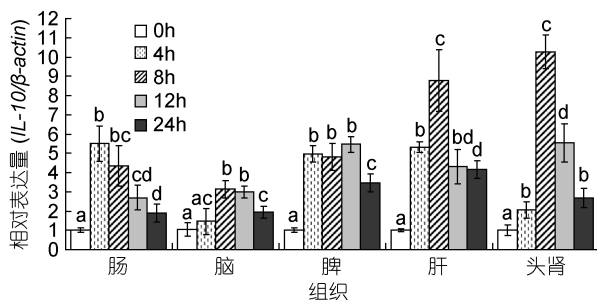


图5 qRT-PCR 检测溶藻弧菌侵染后大黄鱼 *IL-10* 基因的表达变化($n=6$)
Fig.5 Changes in expression of *L. crocea IL-10* gene after *V. alginolyticus* infection ($n=6$)

注: 同一组织中不同时间点无相同小写字母表示 *IL-10* 基因表达量有显著性差异($P<0.05$)

3 讨论

随着养殖规模的扩大和养殖环境的变差, 近年来鱼病防治形势日趋严峻。许多研究者试图从鱼体免疫机理着手, 通过增强鱼体抗病、抗逆能力来提高养殖产量和质量, 其中细胞因子是研究热点之一。*IL-10* 是机体的一种重要免疫因子, 对免疫细胞和其他免疫因子具有双向调节作用, 参与机体对病原免疫和

炎症应答(井申荣等, 2006)。目前已在斑马鱼、虹鳟、金鱼、卵形鲳鲹等多种鱼类中获得了 *IL-10* 基因序列(Inoue *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2005; Grayfer *et al*, 2011; Peng *et al*, 2017)。本研究获得的大黄鱼 *IL-10* 基因 cDNA 序列在 3' 末端含有 3 个 mRNA 不稳定信号 ATTTA, 并且有 2 个形成了复合型的 ATTTATTTA 结构, 卵形鲳鲹 *IL-10* mRNA 的不稳定信号也是如此(Peng *et al*, 2017), 而鱼类 *IL-10* mRNA 中不稳定信号的数量明显少于高等脊椎动物(肖凡书等, 2006)。包括大黄鱼在内的各种动物 *IL-10* 蛋白均含有信号肽和保守的 *IL-10* 家族特征性序列, 并且有 4 个半胱氨酸在各类动物中高度保守, 对哺乳动物 *IL-10* 蛋白的研究显示这 4 个半胱氨酸所形成的 2 对二硫键对于 *IL-10* 蛋白的空间构型和功能起着决定性的作用(Windsor *et al*, 1993)。另外, 很多鱼类的 *IL-10* 中还包含另外 2 个半胱氨酸, 大黄鱼中也是如此, 但研究显示这两个半胱氨酸可能并未形成特殊的结合(Peng *et al*, 2017)。

组织表达检测显示 *IL-10* 基因在大黄鱼鳃和肠中表达量较高, 这与虹鳟中的情况一致(Inoue *et al*, 2005), 但虹鳟头肾中 *IL-10* 有中等程度的表达, 而大黄鱼头肾中 *IL-10* 的表达量较低。其他鱼类中 *IL-10* 基因的组织表达情况也不尽相同: 欧洲鲈头肾和肠中高表达、鳃中低表达(Buonocore *et al*, 2007); 卵形鲳鲹在皮肤、心和鳃中高表达, 肌肉和肠外中低表达, 其他各组织中均呈中等程度表达(Peng *et al*, 2017); 卡特拉鱼则是肾和心中高表达、皮肤中几乎不表达(Swain *et al*, 2012)。这种组织表达差异可能是不同物种的免疫机能差异所致, 也可能与各种鱼类生活的水环境不同有关。

哺乳动物中 *IL-10* 在机体免疫中的功能及作用机制已得到了较深入的研究(Sabat *et al*, 2010), 在鱼类中的研究也表明其参与机体抵御细菌、病毒侵染后的免疫反应(Kongchum *et al*, 2011; Swain *et al*, 2012)。注射 LPS 可引起斑马鱼、虹鳟和卡特拉鱼肾、肝、肠、脾、鳃等组织中 *IL-10* 表达量显著升高(Inoue *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2005; Swain *et al*, 2012); 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)侵染后鲤、卡特拉鱼均出现 *IL-10* 表达上调(Swain *et al*, 2012; Jiang *et al*, 2016)。本研究中大黄鱼头肾、肝、脑、脾、肠等组织 *IL-10* 的表达量在溶藻弧菌侵染后均出现显著上调, 提示 *IL-10* 参与了大黄鱼抵抗病原菌的免疫应答反应。Zou 等(2003)发现红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)*IL-10* 基因的

启动子上存在NF- κ B结合位点, Swain等(2012)在卡特拉鱼中的研究显示NF- κ B阻断剂可以解除LPS诱导的细胞*IL-10*表达上调, 提示免疫应答中*IL-10*的表达是通过NF- κ B信号通路诱导的。但大黄鱼中*IL-10*基因中是否存在NF- κ B结合位点以及其诱导机制如何尚有待于进一步研究。另外, Kongchum等(2011)发现鲤*IL-10*基因中存在有与鲤疱疹病毒-3(*cyprinid herpesvirus-3*)抗性相关的SNP位点, 因此今后在深入研究大黄鱼*IL-10*基因免疫机理的同时开展可用于分子标记辅助育种的抗病性相关SNP位点筛查也具有十分重要的意义。

4 结论

本文获得了长度为899bp的大黄鱼*IL-10*基因cDNA序列, 共编码184个氨基酸, 预测编码蛋白N端有长度为22个氨基酸的信号肽序列, 序列比对和系统进化分析显示大黄鱼*IL-10*与欧洲鲈进化关系最近。qRT-PCR检测显示溶藻弧菌侵染后大黄鱼肠、脑、肝、脾、头肾等组织中*IL-10*基因表达量显著升高, 提示该基因参与菌侵染后大黄鱼的免疫反应, 结果可为研究大黄鱼的免疫机制提供参考资料。

参 考 文 献

- 丰培金, 2006. 鱼类的白细胞介素研究进展. 安徽农业科学, 34(17): 4317—4318, 4320
- 井申荣, 邹全明, 2006. 白细胞介素 10 的研究进展. 免疫学杂志, 22(3): 26—28, 32
- 农业部渔业渔政管理局, 2016. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 28—32
- 肖凡书, 昌鸣先, 孙 军等, 2006. 鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)*IL-10* 基因的克隆及表达分析. 自然科学进展, 16(2): 183—189
- 高 珊, 余 涛, 周景祥等, 2014. 鱼类白介素及其受体的研究. 水产学杂志, 27(03): 62—64
- 曹飞飞, 朱凝瑜, 郑晓叶, 2017. 2014—2016 年浙江省大黄鱼养殖病害测报及防治建议. 浙江农业科学, 58(6): 1043—1047
- Blanco P, Palucka A K, Pascual V *et al*, 2008. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. Cytokine & Growth Factor Reviews, 19(1): 41—52
- Buonocore F, Randelli E, Bird S *et al*, 2007. Interleukin-10 expression by real-time PCR and homology modelling analysis in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Aquaculture, 270(1—4): 512—522
- Ding Y, Ao J Q, Ai C X *et al*, 2016. Molecular and functional identification of three interleukin-17A/F (*IL-17A/F*) homologues in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Developmental & Comparative Immunology, 55: 221—232
- Florentino D F, Zlotnik A, Mosmann T R *et al*, 1991. *IL-10* inhibits cytokine production by activated macrophages. Journal of Immunology, 147(11): 3815—3822
- Grayfer L, Hodgkinson J W, Hitchen S J *et al*, 2011. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interleukin-10. Molecular Immunology, 48(4): 563—571
- Inoue Y, Kamota S, Ito K *et al*, 2005. Molecular cloning and expression analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-10 cDNAs. Fish & Shellfish Immunology, 18(4): 335—344
- Jiang X Y, Zhang C, Zhao Y J *et al*, 2016. Immune effects of the vaccine of live attenuated *Aeromonas hydrophila* screened by rifampicin on common carp (*Cyprinus carpio* L.). Vaccine, 34(27): 3087—3092
- Kongchum P, Sandel E, Lutzky S *et al*, 2011. Association between *IL-10a* single nucleotide polymorphisms and resistance to *cyprinid herpesvirus-3* infection in common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, 315(3—4): 417—421
- Li C, Yao C L, 2013. Molecular and expression characterizations of interleukin-8 gene in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Fish & Shellfish Immunology, 34(3): 799—809
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402—408
- Magnadóttir B, 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish & Shellfish Immunology, 20(2): 137—151
- Moore K W, de Waal Malefyt R, Coffman R L *et al*, 2001. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. Annual Review of Immunology, 19: 683—765
- Mu Y N, Wang K R, Ao J Q *et al*, 2015. Molecular characterization and biological effects of a CXCL8 homologue in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Fish & Shellfish Immunology, 44(2): 462—470
- Peng Y H, Cai X H, Zhang G Y *et al*, 2017. Molecular characterization and expression of interleukin-10 and interleukin-22 in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in response to *Streptococcus agalactiae* stimulus. Fish & Shellfish Immunology, 65: 244—255
- Sabat R, Grutz G, Warszawska K *et al*, 2010. Biology of interleukin-10. Cytokine & Growth Factor Reviews, 21(5): 331—344
- Swain B, Samanta M, Basu M *et al*, 2012. Molecular characterization, inductive expression and mechanism of interleukin-10 gene induction in the Indian major carp, catla (*Catla catla*). Aquaculture Research, 43(6): 897—907
- Windsor W T, Syto R, Tsaibopoulos A *et al*, 1993. Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. Biochemistry, 32(34): 8807—8815
- Wu C W, Zhang D, Kan M Y *et al*, 2014. The draft genome of the large yellow croaker reveals well-developed innate immunity. Nature Communication, 5: 5227
- Wu J, Shi Y H, Zhang X H *et al*, 2015. Molecular characterization of an *IL-1 β* gene from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its effect on fish defense against *Vibrio alginolyticus* infection. Zoological Research, 36(1): 133—141

- Zhang D C, Shao Y Q, Huang Y Q *et al*, 2005. Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(5): 571—576
- Zou J, Clark M S, Secombes C J, 2003. Characterisation, expression and promoter analysis of an interleukin 10 homologue in the puffer fish, *Fugu rubripes*. *Immunogenetics*, 55(5): 325—335

CLONING OF INTERLEUKIN-10 (*IL-10*) GENE FROM LARGE YELLOW CROAKER *LARIMICHTHYS CROCEA* AND THE EXPRESSION PATTERN ANALYSIS ON *VIBRIO ALGINOLYTICUS* INFECTION

HOU Hong-Hong, MIAO Liang, LI Ming-Yun, GUO Xiao-Fei, DU Jing-Ya, CHEN Jiong
(*School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China*)

Abstract In teleost, interleukin 10 (IL-10) is an immune factors of the innate immunity system, and it plays an important role in inflammatory responses and immunoregulation. In this study, *IL-10* cDNA was cloned and characterized from large yellow croaker *Larimichthys crocea*. The results showed that *L. crocea IL-10* cDNA contained 899 nucleotides with an open reading frame of 555 nucleotides encoding a ploy peptide of 184 amino acids. The molecular mass of *L. crocea IL-10* protein was 21.24kDa, and the 22 amino acid of the N-terminal region formed signal peptide. The multiple sequence alignment of amino acid sequences indicated that *L. crocea IL-10* possessed the IL-10 family signature motif, and it had four conserved cysteine residues to form two disulfide bridges. *L. crocea IL-10* shared the highest amino acid similarity (78.5%) with IL-10 of European seabass *Dicentrarchus labrax*. Phylogenetic tree analysis also confirmed that *L. crocea IL-10* fell into the fish IL-10 cluster and was most closely related to that of *D. labrax*. In health *L. crocea*, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that *IL-10* mRNA had high expression level in the gill and intestine, and the low expression level was shown in the liver and head kidney. Upon *Vibrio alginolyticus* infection, *L. crocea IL-10* transcripts up-regulated significantly in the intestine, brain, spleen, liver, and head kidney compared to that before the infection ($P<0.05$). Among these tissues, the head kidney had the most increase amplitude of *IL-10* expression (10.06 fold) after *V. alginolyticus* infection, and followed by the liver (8.79 fold). Therefore, *IL-10* gene is closely related to the pathogenic bacteria infection of *L. crocea*, and these data could be helpful to understand the biological function and immunologic mechanism of *L. crocea IL-10* gene.

Key words *Larimichthys crocea*; interleukin 10 (*IL-10*) gene; *Vibrio alginolyticus*; expression analysis