

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2013.03.12

大黄鱼白细胞介素8基因克隆及特征分析

王亚芳, 薛良义*

(宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 白细胞介素8是一种CXC型趋化性细胞因子,在免疫反应中起着非常重要的作用。本文在构建大黄鱼肌肉组织cDNA文库的基础上,克隆了白细胞介素8基因。克隆到的白细胞介素8全长为2582bp,基因组包含106bp的5'端非编码区,52bp的外显子I,168bp的内含子I,133bp的外显子II,149bp的内含子II,87bp的外显子III,682bp的内含子III,13bp的外显子IV和1192bp的3'端非编码区,编码序列285bp,编码94个氨基酸。氨基酸序列具有趋化性因子CXC家族的结构特征,在进化上高度保守,与鲈鱼的同源性在90%以上。在检测的大黄鱼的10种组织中,表达量较高的为肾、肝、肠和脾,脑、心和肌肉中表达量较低。

关键词: 大黄鱼;白细胞介素8;基因结构;组织表达

中图分类号: Q518.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-5565(2013)-233-05

Cloning and Characterization Analysis of Interleukin-8 Gene in *Larimichthys crocea*

WANG Ya-fang, XUE Liang-yi*

(College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Interleukin-8 is a CXC chemokine, and plays an important role in immune reaction. On the basis of constructing the full length cDNA library from the skeletal muscle, interleukin-8 gene was cloned and sequenced in *Larimichthys crocea*. The acquired interleukin-8 gene is 2582bp in length, including 106bp 5'-UTR, 52bp exon I, 168bp intron I, 133bp exon II, 149bp intron II, 87bp exon III, 682bp intron III, 13bp exon IV, and 1191bp 3'-UTR. The coding region is 285bp which encodes 94 amino acids. The deduced amino acid sequence contains CRC domain, and is highly conserved in the evolution. The sequence similarity of Interleukin-8 between *Larimichthys crocea* and *Lateolabrax japonicus* is over 90%. In the examined ten tissues, interleukin-8 gene was expressed highly in kidney, liver, intestinal, and spleen, and low in heart, skeletal muscle and brain.

Key words: *Larimichthys Crocea*; Interleukin-8; Gene Structure; Tissue Expression

在防御和清除入侵病原体等异物时,有一些物质具有使白细胞趋集的功能,这种物质被称之为趋化因子。白细胞介素-8(Interleukin-8, IL-8)是一种CXC型趋化性细胞因子,也是一种重要的炎症介质。在生物体内,通过诱导剂(如IL-1、LPS和PHA等)诱导后,活化的T细胞、巨噬细胞、单核细胞等多种细胞均能产生IL-8^[1]。在体外,IL-8对T淋巴白细胞、嗜碱性细胞和嗜中性细胞具有趋化作

用^[2]。在炎症反应中,IL-8与CXCR1或CXCR2结合后,细胞膜依赖钙通道被激活,释放出溶酶体酶和超氧化物,同时诱导中性粒细胞脱颗粒内含物释放、形态改变及趋化、氧爆发,最终将激活靶细胞^[3]。近些年来临床医学发现IL-8具有调节宿主免疫能力、刺激毛细血管形成、促进细胞进行有丝分裂等功能,为多种炎症反应性疾病(如支气管炎,哮喘等慢性阻塞性肺疾病)、免疫性疾病(如类风湿性关节

收稿日期:2013-03-28;修回日期:2013-05-15.

基金项目:国家自然科学基金(30871916)和宁波大学创新性开放实验项目建设专项经费资助(Cxxkf-201221)。

作者简介:王亚芳,女,湖北咸宁,本科生,专业:生物技术;E-mail:wangyafang7@163.com.

*通讯作者:薛良义,男,教授,博士生导师,主要从事海洋生物技术研究;E-mail:xueliangyi@nbu.edu.cn.

炎)、肿瘤的临床治疗提供了新的手段^[4]。

最近几年来,许多鱼类的 IL-8 基因相继被克隆,如大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)^[5]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[6]、欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)^[7]、东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[8]、黑线鳕(*Melanogrammus aeglefinus*)^[9]、皱唇鲨(*Triakis scyllia*)^[10]、虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)^[11]、银鲛(*Chimaera phantasma*)^[12]、牙鲆(*Paralichthys olivaceous*)^[13]和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[14]等。大黄鱼是重要的海水养殖鱼类,对其 IL-8 基因的研究有助于认识大黄鱼的免疫机制。我们在构建大黄鱼肌肉组织 cDNA 文库的基础上,克隆到 IL-8 基因,并分析了它的分子结构和组织特异性表达。

1 材料和方法

1.1 材料

大黄鱼取自象山港湾水产苗种有限公司。取脂肪、骨骼肌、心、脑、眼、肝、肾、鳃、脾和肠等 10 种组织,装于 1.5 ml 离心管,将其迅速装入液氮罐保存,用于提取大黄鱼 DNA 和总 RNA。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 和总 RNA 提取

以大黄鱼肌肉为材料采用苯酚氯仿抽提法提取大黄鱼基因组 DNA。按上海生工的 Trizol 试剂盒说明书中步骤分别提取大黄鱼 10 种组织的总 RNA,所提总 RNA 的质量用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳/EB 染色检测,用紫外分光光度计(英国 GE 公司)测定总 RNA 的浓度和纯度。

1.2.2 大黄鱼肌肉组织 cDNA 文库的构建

利用 Creator Smart cDNA Library Construction Kit,以大黄鱼肌肉组织为材料,构建大黄鱼肌肉组织 cDNA 文库。以 3 μ l 大黄鱼肌肉组织总 RNA 为模板,按说明书合成 cDNA 第一链,并进行长距离 PCR 扩增反应,合成双链 cDNA。双链 cDNA 经过纯化、回收后,用适量 Sfi I 酶切,在 50 $^{\circ}$ C 温度下反应 2h,使之产生黏性末端。将酶切产物过 Chroma spin-400 column,收集含有 cDNA 的前三管。以 1:1 的比例将过柱收集的 cDNA 与载体 pDNR-LIB 连接,将连接产物用电穿孔法导入大肠杆菌 JM109 感受态细胞,用氯霉素选择培养基筛选阳性克隆菌。

1.2.3 大黄鱼 IL-8 基因组 cDNA 序列获得

随机挑取 cDNA 全长文库的阳性克隆菌进行测序,测序后的序列经 BLAST 检索,同时设计引物,在获得的大黄鱼 IL-8 EST 序列的基础上,测通该克隆。

1.2.4 大黄鱼 IL-8 内含子序列获得

根据 IL-8 基因 cDNA 序列的测序结果,运用引物设计软件 PrimerPremier5.0 和 Oligo6.0 设计一对引物,分别为 IL8F1:5'-GCTCTGCTGACTGACTCTA-ATCT-3' 和 IL8R1:5'-TCTGGGAAGTTTGTCTTCT-CACG-3',由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,纯化回收目的片段,并连接到 pMD-18 载体,转化 DH5 α ,用含氨苄青霉素的 LB 培养基筛选阳性克隆,并经 PCR 检测后进行测序。获得的序列与 cDNA 序列比对,确定大黄鱼 IL-8 基因内含子和外显子序列。

1.2.5 大黄鱼 IL-8 基因的组织特异性表达

用 M-MLV Reverse transcriptase (Promega, USA)分别反转录肾、脑、脾、肌肉、心、肝、肠、脂肪、鳃和眼组织总 RNA。在 IL-8 编码区跨内含子处设计一对引物,分别为 IL8R2:5'-TCACGGTGCCTGCT-GAACC-3' 和 IL8F2:5'-ATGTCATCATTAC-TATCGTG-3',扩增片段长度为 285bp;内参 β -actin 基因的引物为 BactinR:5'-GAACCTCTCATTGCAATGGTG-3' 和 BactinF:5'-CCAGATCATGTTCGAGACCTTC-3',扩增片段为 306bp。PCR 程序为,94 $^{\circ}$ C 预变性 3min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s,58 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 产物,并利用 Quantity One 软件进行半定量分析。

1.2.6 序列特征的生物信息学分析

采用 BLAST 进行序列的相似性分析,同时利用 Clustal W 将大黄鱼 IL-8 与多种动物的 IL-8 序列进行多序列比。采用 SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析 IL-8 的信号肽序列,利用 NetPhos 2.0 Server 进行磷酸化预测;利用 NetOGlyc 3.1 Server 和 NetOGlyc 1.0 Server 分别对 N-糖基化位点 O-糖基化位点进行预测;利用 ProtParam 软件进行编码蛋白的基本理化特性分析;利用 SWISS-MODEL 对 IL-8 编码蛋白的三级结构进行预测。

2 结果分析

2.1 IL-8 基因序列

在构建大黄鱼肌肉组织 cDNA 全长文库的基础上,随机挑选阳性克隆进行测序,得到 IL-8 基因的 EST 序列,然后测通该序列,并结合内含子序列的克隆、测序,得到全长为 2 582bp 的序列。该序列包含 106bp 的 5'端非编码区,1 192bp 的 3'端非编码区,

以及 4 个外显子和 3 个内含子序列,其长度分别为:外显子 I 52bp,内含子 I 168bp,外显子 II 133bp,内含子 II 149bp,外显子 III 87bp,内含子 III 682bp 和外显子 IV 13bp,编码 94 个氨基酸。大黄鱼的 IL-8 基因序列已提交 GenBank,序列号为 HQ891141。

2.2 IL-8 的结构特征

SignalP3.0 分析显示,在 IL-8 蛋白第 20 和 21 位的氨基酸之间存在一个潜在的信号肽酶识别位点,说明前 20 个残基是信号序列。推断的 IL-8 蛋白分子量为 10.55kD,等电点为 9.64。大黄鱼 IL-8 蛋白的功能位点较丰富,1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点位于第 64~66 位氨基酸间,1 个 N 端酰基化位点位于第 18~23 位的氨基酸间,2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点分别位于第 14~17 和第 20~23 位的氨基酸残基间。大黄鱼 IL-8 蛋白存在 3 个 Ser 和 1 个 Thr 磷酸化位点,但 Tyr 磷酸化位点缺失。NetOGlyc 3.1 Server 和 NetOGlyc 1.0 Server 分析表明在大黄鱼 IL-8 中分别存在 10 个潜在的 N-糖基化位点,但 O-糖基化位点缺失。

经 Blastp 搜索,发现由 94 个氨基酸组成的大黄鱼 IL-8 蛋白在 28~89 位氨基酸残基间的 CXC 结构域里存在保守区。预测的多肽存在 4 个保守的半胱氨酸,前 2 个半胱氨酸间隔 1 个谷氨酰胺,完全符合 CXC 趋化结构的特征。

对 IL-8 蛋白的三级结构进行预测,结果如图 1。通过最佳模型搜索发现,1pfmA 是和 IL-8 蛋白序列最匹配的模板,IL-8 蛋白序列的第 25~91 位氨基酸残基是最佳比对

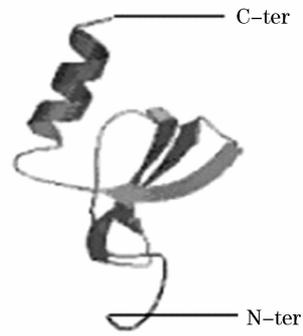


图 1 SWISS-MODEL 预测的 IL-8 蛋白三级结构
Fig.1 The prediction results of three-dimensional structure by the method of SWISS-MODEL

2.3 不同物种间的 IL8 基因结构比较

将大黄鱼 IL-8 的氨基酸序列与 GenBank 中登录的 26 种其它动物的序列进行同源性分析,发现大黄鱼 IL-8 的氨基酸序列高度保守,与鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 同源性最高,达 97%。与斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 和条纹婢 (*Latris lineata*)、的同源性也比较高,分别达到了 94%,90%,90%。甚至和人 IL-8 的氨基酸序列的同源性也高达 75%。

将大黄鱼 IL-8 基因与人、鸡、虹鳟和沟鲈的 IL-8 基因结构进行比较,无论是高等的哺乳动物,还是相对较低等的鱼类,IL-8 基因的结构非常保守,都是由 4 个外显子和 3 个内含子构成,且前 3 个外显子的长度变化很少(见图 2)。

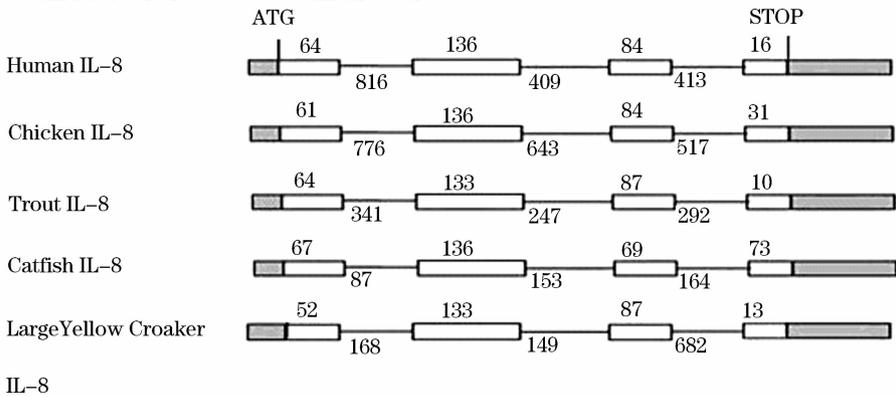


图 2 五种脊椎动物 IL-8 基因的结构比较

Fig.2 Genomic structure comparasion of 5 vertebrate IL-8 genes

注:3 个内含子用线表示,4 个外显子用矩形表示,内含子大小标注在下方,外显子的大小标注在上方,阴影部分表示非编码区。

Notes:The three introns are shown by lines. The four exons are shown by rectangles. The sizes of introns are shown below the introns. the sizes of exons are shown above the exons. The start and stop codons are indicated. Untranslated regions (UTRs) are indicated by shaded areas.

2.4 IL-8 在大黄鱼 10 种组织中的表达

在大黄鱼受检的 10 个组织中,IL-8 基因在脑、脾、肌肉、心、肾、肝和肠 7 个组织中都有表达,在脂肪、鳃和眼中则未检测到表达(见图 3)。半定量分

析表明,以心组织为基准,肌肉组织中的表达量与心组织相当,脑和脾组织中的表达量是心组织的 3.5 倍左右,肠中的表达量是心组织的 4 倍左右,肾中的表达量是心组织的 5 倍,肝组织中的表达量是心组

织的 7.7 倍,可见 IL-8 在大黄鱼的肝组织中表达最强。作为对照的 β -actin 内参基因在 10 种组织中都能检测到表达。

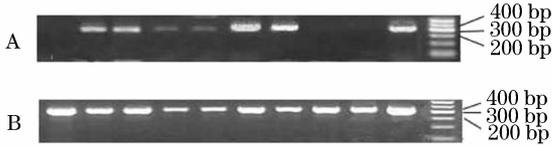


图 3 大黄鱼白介素 8 基因的组织特异性表达

Fig. 3 Tissue expression of *Larimichthys crocea* IL-8 gene

注:A:大黄鱼白介素 8 基因;B:对照: β -actin 基因。泳道从 1 到 10 依次是脂肪、脑、骨骼肌、脾、心、肾、肝、鳃、眼和小肠。

Notes:A: IL-8; B: β -actin. Lines from 1 to 10 represent fat, brain, skeletal muscle, heart, kidney, liver, gill, eye, and intestine, respectively.

3 讨论

本实验获得的序列与其他鱼类的 IL-8 序列相似性最高,在推断的氨基酸序列中具有高度保守的 4 个半胱氨酸残基,其中前 2 个半胱氨酸被 1 个谷氨酰胺残基所分隔,形成了 CXC 结构,该结构符合趋化性因子 CXC 家族的典型特征。这些结果都证实了克隆到的序列是 IL-8 基因。对 IL-8 氨基酸序列的功能位点进行分析显示,不同动物的 IL-8 含有共同的功能位点,包括 N 端酰基化位点,蛋白激酶 C 磷酸化位点和酪蛋白激酶 II 磷酸化位点等,并且这些功能位点的相对位置也具有一定的保守性。

在鸟类和哺乳动物中,IL-8 蛋白序列存在 CXC 结构,该结构前存在受体结合位点 ELR 基序,因此具有诱导中性粒细胞作用^[15],并且与免疫反应有重要联系。但是在鱼类中,大黄鱼与其他鱼类 IL-8 都缺乏 ELR 特异性基序,大黄鱼是 LLR,虹鳟是 DLR^[2],这可能是因为在进化过程中鱼类属于较低等的脊椎动物^[16]。说明 ELR 基序是在硬骨鱼类之后进化形成的。但在基因结构上,脊椎动物的 IL-8 非常保守,都有 4 个外显子和 3 个内含子。

作为一种重要的 TNF 诱导的中性粒细胞活化时的继发介质,IL-8 通过两种方式合成。一种是单核吞噬细胞受脂多糖等攻击后可形成 IL-8,另一种是通过其他细胞特别是内皮细胞,经过 TNF 活化后也可形成 IL-8。越来越多的临床实验证明,IL-8 参与了免疫和炎症反应过程并在一定程度上起到调节作用。IL-8 基因组织特异性表达分析结果显示大黄鱼 IL-8 基因在多种组织中都有表达,但在肝、脾脏和肾中的表达明显较强,这个结果与其具有免疫功能相吻合。斜带石斑鱼 IL-8 基因主要在心、肾、脾和肝脏中表达^[14],鲤鱼 IL-8 基因在头肾和脾这两

个重要免疫器官中有显著表达,这些结果均表明各种鱼类 IL-8 都参加了免疫反应^[6]。

参考文献 (References)

- [1] Robert M Strieter, Keita Kasahara, Ronald M Allen, Theodore J Standiford, Mark W Rolfe, Frank S Becker, Stephen W Chensue, Steven L Kunkel. Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8[J]. American Journal of Pathology, 1992, 141(2): 397-407.
- [2] Kerry J Laing, Jun J Zou, Tiehui Wang, Niels Bols, Ikuo Hirono, Takashi Aoki, Christopher J Secombes. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2002, 26(5): 433-444.
- [3] 姚瑶,王琳琳. 白细胞介素-8 研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(10): 789-791.
- [4] Catherine Murphy, Maryalice McGurk, Johanna Pettigrew, Alfredo Santinelli, Roberta Mazzucchelli, Patrick G. Johnston, Rodolfo Montironi, David J J Waugh. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2005, 11(11): 4117-4127.
- [5] Marit Seppola, Atle Noralf Larsen, Kari Steiro, Børre Robertsen, Ingvill Jensen. Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 β , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. Molecular Immunology, 2008, 45(4): 887-897.
- [6] Mark O Huising, Ellen Stolte, Gert Flik, Huub F J Savelkoul, B. M. Lidy Verburg-van Kemenade. CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2003, 27(10): 875-888.
- [7] M. Pilar Sepulcre, Elena Sarropoulou, Georgios Kotoulas, José Meseguer, Victoriano Mulero. *Vibrio anguillarum* evades the immune response of the bony fish sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) through the inhibition of leukocyte respiratory burst and down-regulation of apoptotic caspases[J]. Molecular Immunology, 2007, 44(15): 3751-3757.
- [8] Nil Ratan Saha, Jin-Xin Bei, Hiroaki Suetake, Kiyosuke Arai, Wataru Kai, Kiyoshi Kikuchi, Hao-Ran Lin, Yuzuru Suzuki. Description of a fugu CXC chemokine and two CXC receptor genes, and characterization of the effects of different stimulators on their expression [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(6): 1324-1332.
- [9] Y. Corripio-Miyar, S. Bird, K. Tsamopoulos, C. J. Secombes. Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) [J]. Molecular Immunology, 2007, 44(6): 1361-1373.
- [10] Yuuki Inoue, Chiaki Haruta, Kazushige Usui, Tadaaki Moritomo, Teruyuki Nakanishi. Molecular cloning and sequencing of the banded dogfish (*Triakis scyllia*) interleukin-8 cDNA [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003, 14(3): 275-281.
- [11] Kazuhiro Fujiki, Julie Gauley, Niels C. Bols, Brian Dixon. Genomic cloning of novel isoforms of the rainbow trout interleukin-8 [J]. Immunogenetics, 2003, 55(2): 126-131.

(下转至第 242 页)