

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190327001

http://www.yykxjz.cn/

司瑜, 王宣刚, 王梦娅, 王欣桐, 于海洋, 张全启, 王志刚. 牙鲆 *JNK2* 基因的表达分析及免疫功能探究. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 12–22

Si Y, Wang XG, Wang MY, Wang XT, Yu HY, Zhang QQ, Wang ZG. Expression analysis and functional characterization of *JNK2* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 12–22

牙鲆 *JNK2* 基因的表达分析及免疫功能探究*

司瑜 王宣刚 王梦娅 王欣桐 于海洋 张全启 王志刚^①

(中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 本研究利用实验室已建牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)转录组数据库, 得到牙鲆 *JNK2* 基因(*PoJNK2*)并利用 PCR 技术进行序列验证。*PoJNK2* 的开放阅读框长度为 1263 bp, 编码 420 个氨基酸; 通过 SMART 服务器对 *PoJNK2* 的结构域进行预测, 显示 *PoJNK2* 具有典型的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶催化结构域 S_TKc。利用 qRT-PCR 分析 *PoJNK2* 在牙鲆成体不同组织中的表达水平, 发现其在牙鲆免疫组织中均有表达, 因此, 初步推测 *PoJNK2* 在牙鲆免疫应答方面可能发挥作用。本研究设计了体内迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)侵染实验和体外免疫刺激细胞实验以探究 *PoJNK2* 在牙鲆免疫反应中的作用。在迟缓爱德华氏菌体内注射牙鲆成体后, *PoJNK2* 在脾脏、头肾和鳃中有不同程度的表达上调。同时, 使用迟缓爱德华氏菌、Poly I:C 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 刺激牙鲆鳃细胞系后, 发现 *PoJNK2* 在不同时间点表达上调。除此之外, 通过细胞转染实验在牙鲆鳃细胞系中过表达 *PoJNK2*, 发现其对下游炎症细胞因子的表达及激活蛋白 Activator protein-1 (AP-1) 的转录活性具有显著的上调作用, 进一步阐明了 *PoJNK2* 在调节牙鲆免疫应答方面的作用。

关键词 牙鲆; *JNK2*; 迟缓爱德华氏菌; 先天免疫

中图分类号 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)04-0012-11

鱼类是最古老的脊椎动物, 在生物进化史中具有十分重要的地位。与哺乳类动物类似, 鱼类也具有完善的免疫器官、组织和多种免疫细胞, 这些是鱼类进行免疫预防各种疾病的免疫基础(Litman *et al*, 2005)。先天免疫系统是最早以非特异性的方式保护宿主免受其他有机体感染的免疫机制, 是无脊椎动物和低等脊椎动物免疫防御的基础。发挥先天免疫作用的细胞以一种通用的方式识别病原体并做出免疫应答(Marchalonis *et al*, 1998)。

c-Jun N-末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)超家族的重要亚基(Sluss, 1996)。最早发现并鉴定出的哺乳动物 *JNK* 基

因包括 3 种, 它们分别被认定为 *JNK1*、*JNK2* 和 *JNK3* (也分别称为应激激活蛋白激酶 SAPK- γ 、SAPK- α 和 SAPK- β) (Dérillard *et al*, 1994)。*JNK1* 和 *JNK2* 基因广泛表达。相比之下, *JNK3* 基因的表达模式相对有限, 主要局限于大脑、心脏和睾丸(Gupta *et al*, 1996)。JNK 蛋白激酶在 TNF 信号通路中由肿瘤坏死因子受体相关蛋白(TRAF2)激活, 在 IL-1 激活后由 TRAF6 进一步激活(Lomaga *et al*, 1999)。之后, JNK 又通过丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 (MKK4)(也称为 SEK1)和 MKK7 在 Thr 和 Tyr 上的磷酸化而激活。MAPKK 正是通过对 Thr 和 Tyr 上的 T 环发生磷酸化反应来激活 JNK, 丝氨酸磷酸酶、酪氨酸磷酸酶和双重特异性磷

* 国家高技术研究发展计划(863)项目(2012AA10A408)资助 [This work was supported by National High Technology Development Program of China (863) (2012AA10A408)]. 司瑜, E-mail: sy03siyu@163.com

① 通讯作者: 王志刚, 实验师, E-mail: zgwang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-03-27, 收修改稿日期: 2019-04-25

酸酶在介导 *JNK* 发生去磷酸化失活时必不可少 (Keyse, 2000)。 *JNK* 通路在先天免疫反应中具有进化保守性。在果蝇细胞中, *JNK* 通路在脂多糖(LPS)作用下被激活(Sluss, 1996)。在哺乳动物中, LPS 或肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)-1 等炎性细胞因子可强烈诱导激活多种细胞类型的 *JNK*(Chang *et al.*, 2001)。在成纤维细胞中, *JNK2* 的缺乏导致多种细胞因子严重减少, 包括I型干扰素(IFN)和 IL-6(Chu *et al.*, 1999)。

硬骨鱼是一种研究早期脊椎动物天然免疫应答功能的良好模型(Whyte, 2007)。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是一种名贵的海产鱼类, 其肉质鲜美, 营养丰富, 经济价值高, 是重要的海水增殖养殖鱼类之一, 市场十分广阔(李泽宇等, 2018)。了解牙鲆的先天防御机制, 可以帮助我们控制鱼类疾病, 保持鱼类养殖业的长期可持续性。迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是一种常见的胞内致病菌, 会引起宿主感染爱德华氏菌病并导致死亡(Abayneh *et al.*, 2013)。迟缓爱德华氏菌通过侵染吸附在细胞表面, 向宿主细胞内注入毒力因子从而使宿主感染病菌(Rao *et al.*, 2001)。它会引起鱼类的败血症, 并伴有广泛的皮肤损害, 影响肝脏、肾脏、脾脏和肌肉等内脏。这种细菌能够避免宿主的防御机制, 从而在宿主体内迅速繁殖并导致死亡(Rao *et al.*, 2001)。大部分鱼类都会受到迟缓爱德华氏菌的影响, 包括鲤鱼、罗非鱼、鲶鱼和牙鲆(*Psetta maxima*)等(Castro *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2000)。本研究从牙鲆中克隆获得了免疫相关基因 *JNK2*, 并对其进行了鉴定。采用体内和体外 2 种方法对 *PoJNK2* 基因的表达模式以及对下游炎症细胞因子和转录因子 AP-1 的调节作用进行了探究。本研究可为鱼类抗病育种的研究提供理论参考, 同时揭示了 *PoJNK2* 的促炎作用, 可为鱼类疾病的治疗和预防提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 牙鲆 在本实验中, 所用牙鲆来自山东海阳黄海水产有限公司。随机选取 3 条雄鱼和 3 条雌鱼 (1.5 年龄, 体长 320~420 mm, 体重 500~700 g), 经尾静脉抽血处死后进行解剖, 每条鱼取心脏、肝脏、脾脏、头肾、脑、鳃、肌肉和肠 8 个组织, 经液氮冷冻后保存于-80℃冰箱。

1.1.2 牙鲆鳃细胞系(FG9307) 来自中国海洋大学细胞工程技术实验室馈赠。该细胞用 DMEM/F12 培养基[向其中加入 10% (v/v) FBS(胎牛血清)、1% (v/v)

NEAA 和 100 U/ml 青霉素), 24℃培养。

1.1.3 迟缓爱德华氏菌 实验所用迟缓爱德华氏菌株为本实验室保存菌株。待使用时将该菌株划线接种于 LB 固体培养基中, 28℃活化培养 12 h。活化后, 将单克隆菌落接种于 LB 液体培养基中, 28℃摇晃培养 12 h。用 PBS 缓冲液稀释使其终浓度为 10^7 CFU/ml。

1.1.4 牙鲆迟缓爱德华氏菌攻毒实验及免疫相关器官的 RNA 提取 来自本实验室学生制作, 具体实验操作步骤详见本实验室已发表论文(曹丹丹等, 2018), 提取 RNA 后, 使用反转录试剂盒反转录成浓度为 100 ng/μl cDNA 模板, 保存于-80℃, 待使用时稀释至 10 ng/μl。

1.2 方法

1.2.1 *PoJNK2* 基因序列分析 本研究分别通过分析比对氨基酸与核酸序列、脊椎动物 *JNK* 基因所编码氨基酸序列和系统进化对 *PoJNK2* 基因进行序列分析。DNAMAN 程序用于分析氨基酸与核酸序列比对, MEGALIGN 和 DNASTAR 程序用于分析脊椎动物 *JNK* 基因结构域保守性, ClustalW 和 MEGA 6 程序用于分析系统进化。该分析过程中所用到的脊椎动物 *JNK* 基因序列号详见表 1。

表 1 实验所用 *JNK2* 基因编号
Tab.1 *JNK2* sequences used in this study

物种名 Common name	拉丁名 Latin name	登录号 Accession No.
斑马鱼 Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	XP_001919688.1
人 Human	<i>Homo sapiens</i>	CAG38817.1
小鼠 Mouse	<i>Mus musculus</i>	EDL33735.1
鸡 Chicken	<i>Gallus gallus</i>	NP_990426.1
青鳉 Medaka	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004073527.1
亚洲鲈鱼 Barramundi perch	<i>Lates calcarifer</i>	XP_018555083.1
大菱鲆 Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>	AWP12168.1
石斑鱼 Orange-spotted grouper	<i>Epinephelus coioides</i>	ALK82291.1
金枪鱼 Amberjack	<i>Seriola dumerili</i>	XP_022607271.1
双色雀鲷 Bicolor damselfish	<i>Stegastes partitus</i>	XP_008275934.1

1.2.2 获得 *PoJNK2* 基因的核心片段 在 NCBI 数据库中搜索到斑马鱼和半滑舌鲷 *JNK2* 序列, 并在实验室已建立的牙鲆基因组和转录组数据库中进行比对, 得到 *PoJNK2* 基因的 cDNA 序列, 根据比对结果设计扩增 *PoJNK2* 基因核心序列的特异性引物 *PoJNK2*-FW1/RV1, 详见表 2, 利用 PCR 技术克隆验证。

表2 实验所用引物
Tab.2 The primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequence (5'~3')	退火温度 T_m (°C)	用途 Usage
<i>PoJNK2</i> -qFw	ACATCTCGTCCATGTCCA	60	qRT-PCR
<i>PoJNK2</i> -qRv	AAGGAAGGTGATGACTGATTG	60	qRT-PCR
<i>PoJNK2</i> -Fw1	TGGTGGTCCCGAGTGTT	54	Degenerate PCR
<i>PoJNK2</i> -Rv1	AAATCCACCGCCTCCTC	55	Degenerate PCR
<i>PoJNK2</i> -Fw2	CCGCTCGAGATGAGTGAGGCAGAGGGC	55	Plasmid construction
<i>PoJNK2</i> -Rv2	CGCGGATCCCACTGACTCTCGTCCAGCG	56	Plasmid construction
<i>PoJNK2</i> -Fw3	CCC <u>AAGCTT</u> GGATGAGTGAGGCAGAGG	52	Plasmid construction
<i>PoJNK2</i> -Rv3	CGCGGATCCCACTGACTCTCGTCCAGC	53	Plasmid construction
IL-6-Fw	CTCCGCAATGGGAAGGTG	62	qRT-PCR
IL-6-Rv	GATGGATGGGTGGAATAA	62	qRT-PCR
IL-8-Fw	TACCACTGACGGGTCAAAGT	62	qRT-PCR
IL-8-Rv	TACTTTTGACTGGGGTTCA	62	qRT-PCR
TNF- α -Fw	GTCCTGGCGTTTTCTTGGA	60	qRT-PCR
TNF- α -Rv	CTTGGCTCTGCTGCTGATTT	60	qRT-PCR
β -actin-Fw	GGTATCCTGACCCTGAAGTA	60	qRT-PCR
β -actin-Rv	CTTCTCCCTGTTGGCTTTAG	60	qRT-PCR
M13-Fw	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	55	菌落 PCR
M13-Rv	GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG	55	菌落 PCR

注：下划线分别为酶切位点序列

Note: Restriction enzyme sites are underlined

1.2.3 *PoJNK2* 基因的组织表达分析 根据定量引物设计原则,设计 *PoJNK2* 的 qRT-PCR 引物 *PoJNK2*-qFw/qRv。选定牙鲈 β -actin 基因作为内参基因,通过 qRT-PCR (SYBR qPCR SuperMix, Novoprotein, 上海)分析在牙鲈成鱼的不同组织中 *PoJNK2* 基因的表达情况。qRT-PCR 所用模板为材料 1.1.1 中 cDNA 模板。

1.2.4 迟缓爱德华氏菌、poly I:C、TNF- α 刺激牙鲈鳃细胞系 将生长状态良好的牙鲈鳃细胞系传代接板至 12 孔板,生长至细胞覆盖度达 80%以上。向每孔中加入 Polyinosinic: polycytidylic acid (Poly I:C, Sigma)、TNF- α (科昕生物公司)和迟缓爱德华氏菌,使终浓度分别为 50 μ g/ml、20 ng/ml 和 5×10^6 CFU/ml。对照组分别加入相同浓度的 PBS。

分别在刺激 0、3、6、9 和 12 h 时收集细胞样品(迟缓爱德华氏菌刺激组,取刺激后 0、3、9、12 h 的细胞样品),存于 Trizol 中待用。

1.2.5 *PoJNK2* 过表达载体构建 为更深入地探究牙鲈 *JNK2* 的基因功能,构建了 *PoJNK2* 的 2 种不同表达载体,分别以 p-EGFP-N1 和 p-cDNA3.1-A 为载体,其中,以 p-EGFP-N1 为载体所构建的表达载体带绿色荧光。在 *PoJNK2* 基因的 ORF 两端,即 ATG 处和 TAG 处利用引物 *PoJNK2*-Fw2/Rv2 设计 *Xho*I 和

*Bam*HI 酶切位点。通过双酶切得到 *PoJNK2* 的 ORF 克隆片段,连接到 p-EGFP-N1 质粒中,得到 p-*JNK2*-EGFP 重组质粒。使用同样的方法,在 *PoJNK2* 基因的 ORF 两端利用引物 *PoJNK2*-Fw3/Rv3 设计 *Hind*III 和 *Bam*HI 酶切位点,与 p-cDNA3.1 质粒连接,得到 p-cDNA3.1-*JNK2* 重组质粒。

1.2.6 *PoJNK2* 基因在牙鲈鳃细胞系中的过表达 将生长状态良好的牙鲈鳃细胞系接板到 12 孔板,培养至细胞单层均匀覆盖密度达 80%以上。使用 LipofectamineTM 2000 (US Everbright, Inc., 苏州)进行 p-*JNK2*-EGFP 质粒转染,同时转染 p-EGFP-N1 质粒作为对照;转染 p-cDNA3.1-*JNK2* 质粒,对照组使用 p-cDNA3.1-A 质粒,具体步骤详见说明书。转染 48 h 以后,将 p-*JNK2*-EGFP 组细胞用 DAPI 染色后在激光共聚焦显微镜下观察拍照。p-cDNA3.1-*JNK2* 组细胞在转染 24 h 后,使用 20 ng/ml TNF- α 进行刺激,24 h 后提取细胞总 RNA 待用。

1.2.7 免疫调节检测实验 将转染 p-cDNA3.1-*JNK2* 质粒 48 h 后的牙鲈鳃细胞,用 20 ng/ml 的 TNF- α 进行刺激,对照组用 PBS 处理。在刺激 24 h 以后,收集细胞样品,提取 RNA,用 qRT-PCR 检测下游 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的表达变化情况。

1.2.8 双荧光报告实验 为了探究 *PoJNK2* 基因的表达变化对 MAPK 信号通路下游 AP-1 的转录调控作用, 设计了双荧光素酶报告实验, 检测 *JNK2* 基因在 HEK-293T 细胞中过表达后对 AP-1 转录因子的表达影响。使用 Lipofectamine™ 2000 将 p-cDNA3.1-*JNK2* 质粒转染至 HEK-293T 细胞中, 同时转染 p-AP-1-luc 荧光素酶报告质粒(碧云天生物公司), 设置阴性对照组和空载质粒组, 阴性对照组即在 HEK-293T 细胞中只转染 p-AP-1-luc 荧光素酶报告质粒, 空载质粒组即转染空载质粒 p-cDNA3.1 和 p-AP-1-luc 荧光素酶报告质粒。根据双荧光素酶报告系统实验要求, 按照 p-AP-1-luc 荧光素酶报告质粒: 海肾荧光素酶报告质粒(pRL-TK)=50 : 1 的比例, 再在每个孔中共转染 pRL-TK, 转染 24 h 后进行双荧光素酶活性检测。

1.2.9 数据分析 本实验所涉及数据差异性分析, 均利用 SPSS 20.0 软件, 使用单因素方差(One-way ANOVA) *T* 检验进行比较。所有数据以平均值±标准误差(Mean±SE)(*n*=3)表示, 各个组之间的差异性用*表

示(**P*<0.05; ***P*<0.01)。

2 结果

2.1 *PoJNK2* 基因的序列分析

首先通过搜索本实验室的牙鲆转录组库, 与 NCBI 数据库中的序列进行比对, 获得了 *PoJNK2* 基因序列, *PoJNK2* ORF 序列长 1263 bp, 编码 420 个氨基酸。

为探究 *JNK2* 在脊椎动物中的进化关系, 本研究利用 MEGA 6 构建了由不同脊椎动物的 *JNK2* 基因组成的系统进化树(图 2), 牙鲆与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)在亲缘关系上最为接近。通过在线蛋白结构预测软件 SMART 对 *JNK2* 基因的结构域进行预测, 结果显示, *JNK2* 基因具有典型的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶催化结构域 S_TKc。利用 GENEDOC 服务器对牙鲆 *JNK2* 的氨基酸序列与其他硬骨鱼氨基酸序列进行比对分析(图 3), 结果显示, *PoJNK2* 的 S_TKc 结构域与其他硬骨鱼的 S_TKc 结构域高度保守。

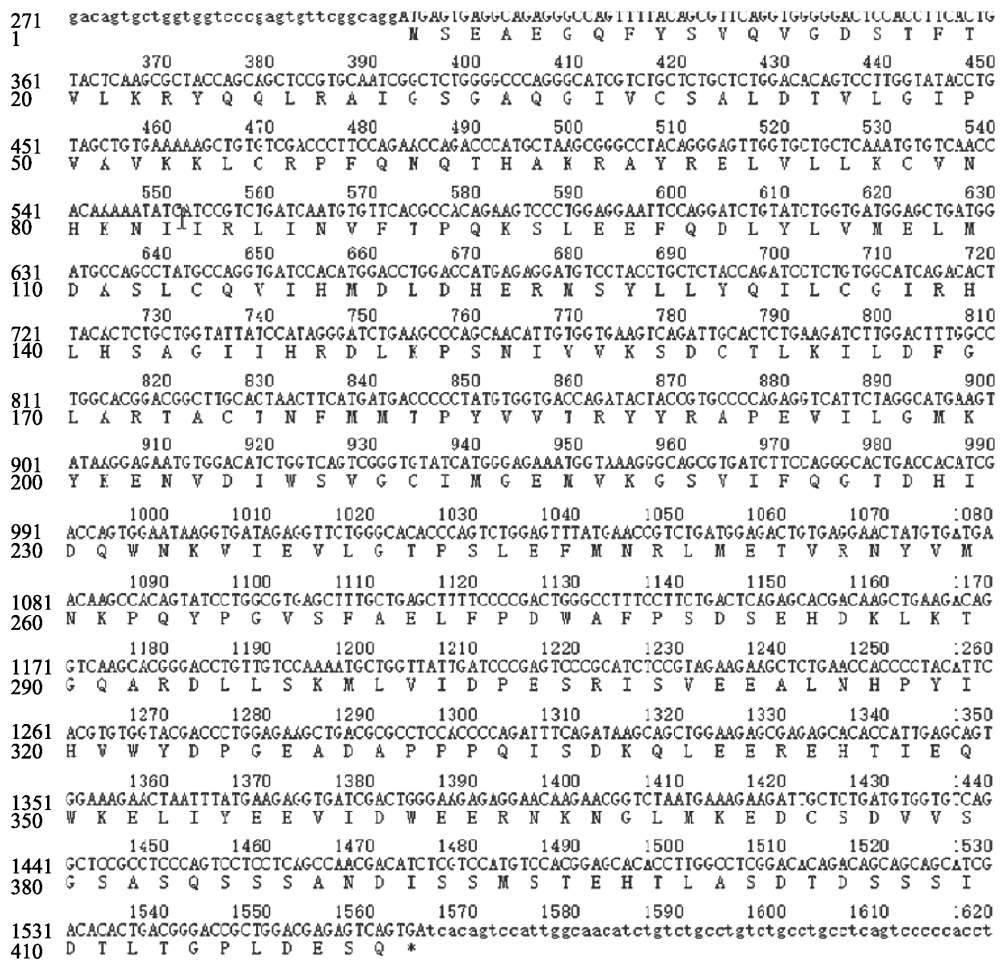


图 1 *PoJNK2* 基因的核苷酸序列与氨基酸序列对应图
 Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *PoJNK2*

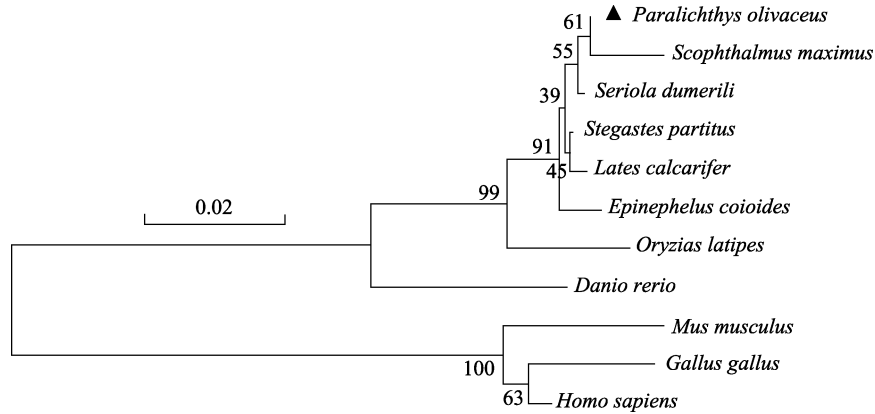


图 2 JNK2 的系统进化分析
Fig.2 The phylogenetic analysis diagram of JNK2

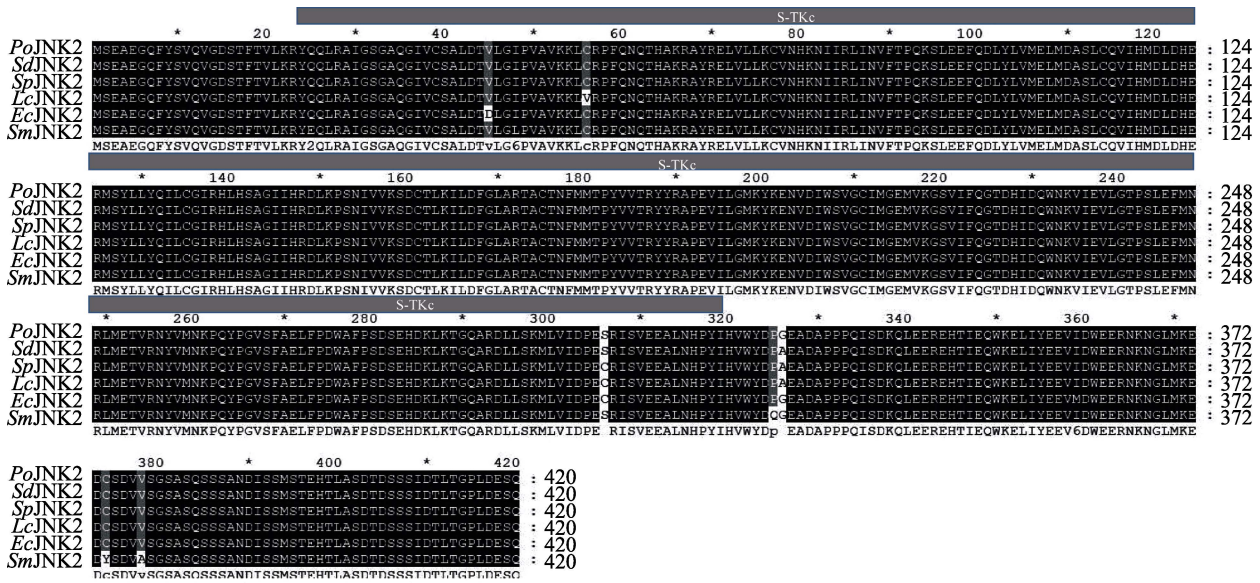


图 3 PoJNK2 与其他已知 JNK 蛋白的 MUSCLE 的多重序列比对
Fig.3 Multiple sequence alignment of PoJNK2 with MUSCLE of other known JNK proteins

黑色区域表示每个氨基酸位点的同源性至少为 70%。S_TKc 结构域标注在上方的灰色条中
The black region indicates that the homology of each amino acid locus is at least 70%.
S_TKc domain is indicated as gray bars above the alignment

2.2 PoJNK2 基因的组织表达分析

通过 qRT-PCR 分析牙鲆 PoJNK2 基因在不同组织中的表达模式(图 4), 在牙鲆心脏、肝脏、脾脏、头肾、脑、鳃、肌肉、肠 8 个组织中均有表达。其中, PoJNK2 在鳃中表达最高, 在脑和肠中表达也较高。

2.3 迟缓爱德华氏菌刺激成年牙鲆后 PoJNK2 基因的差异表达分析

在迟缓爱德华氏菌感染牙鲆成鱼后, 分别取了不同时间点的注菌组和对照组的脾脏、头肾、鳃 3 个组织, 探究 PoJNK2 在迟缓爱德华氏菌刺激下的表达模式, qRT-PCR 结果显示, 在脾脏、头肾、鳃 3 个组

织中, 迟缓爱德华氏菌的刺激引起了 PoJNK2 的不同程度的变化(图 5)。

分析 PoJNK2 的表达变化: 在脾脏中(图 5A), 迟缓爱德华氏菌刺激后, PoJNK2 的表达没有太大的变化, 直到刺激 48 h 时, 实验组 PoJNK2 的表达量上升至对照组的 1.8 倍。在头肾中(图 5B), 随着迟缓爱德华氏菌刺激作用的延长, PoJNK2 的表达呈现出先升高后降低的趋势, 在 12 h 时实验组表达量上升至对照组的 2.2 倍, 随后开始下降, 到 48 h 时降至对照组的 1.3 倍。在鳃中(图 5C), PoJNK2 的表达趋势是先升高再降低又升高, 在 3 h 时实验组表达量是对照组的 1.7 倍, 在 24 h 时下降至 0.6 倍, 而后又在 48 h 时上升至 1.4 倍。

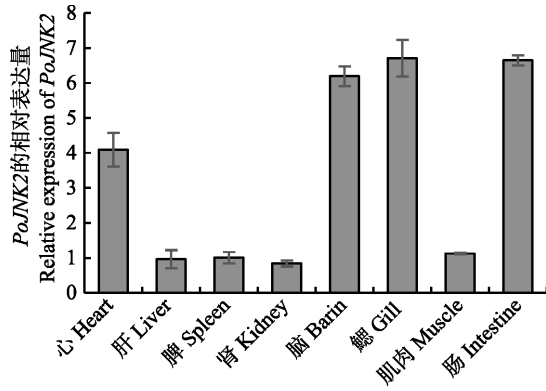


图 4 *PoJNK2* 基因在牙鲆各个组织中的表达模式
Fig.4 Expression of *PoJNK2* genes in different tissues of Japanese flounder

β-actin 基因是定量分析的内参对照, 误差线代表平均值±标准误(n=3)
β-actin gene expression was used as internal control, vertical bars represent the Mean±SE (n=3)

2.4 免疫刺激牙鲆鳃细胞系后 *PoJNK2* 基因的差异表达分析

为研究 *PoJNK2* 在抗病原菌感染方面发挥的重要作用, 分别使用 1.2.4 中处理得到的 cDNA 模板, 通过 qRT-PCR 分析 *PoJNK2* 的表达变化。结果如图 6 所示, 迟缓爱德华氏菌、poly I:C、TNF- α 刺激均能使 *PoJNK2* 的表达上调。观察 *PoJNK2* 在不同情况刺激下表达量的变化: 在使用 PBS 刺激的对照组中(图 6A), *PoJNK2* 的表达基本没有变化。在 Poly I:C 刺激时(图 6B), *PoJNK2* 在刺激前 12 h 里表达量没有明显变化, 到 24 h 时, 表达量突然升高至 0 h 的 2.2 倍。在 TNF- α 刺激时(图 6C), *PoJNK2* 的表达是在 12 h 时开始增加, 到 24 h 时, 升高至 0 h 的 2.6 倍。迟缓爱德华氏菌刺激时(图 4D), *PoJNK2* 的表达逐渐升高, 到 24 h 时表达量达到 0 h 的 3.4 倍。

2.5 *PoJNK2* 的亚细胞定位

通过激光共聚焦显微镜观察细胞转染 P-*JNK2*-EGFP 重组质粒后的状态, 结果显示(图 7), 与其他脊椎动物蛋白相似, *PoJNK2* 在细胞质和细胞核中都有表达。

2.6 *PoJNK2* 基因过表达对通路下游 IL-6、IL-8 和 TNF- α 等细胞因子的调节作用

本实验深入研究了 *PoJNK2* 在抵抗病原菌侵害方面发挥的作用, 通过 qRT-PCR 分析显示, 相比空白对照组和转染空载质粒 p-cDNA3.1 组, 过表达 *PoJNK2* 以后(图 8), 牙鲆鳃细胞内的 *JNK2* 的表达量明显升高至空白对照组的 6.4 倍。

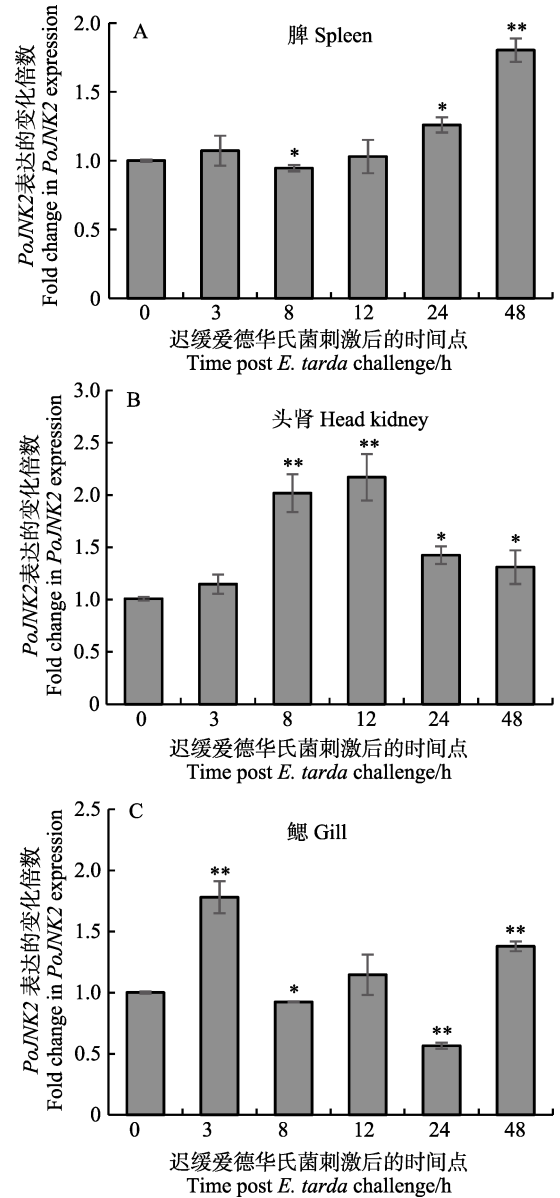


图 5 *PoJNK2* 在迟缓爱德华氏菌刺激牙鲆组织中的表达模式

Fig.5 The expression pattern of *PoJNK2* in Japanese flounder stimulated by *E.tarda*

β-actin 基因是定量分析的内参对照, 时间点 0 h 表达量用作参照样品。误差线代表平均值±标准误(n=3)。

实验组与空白对照(0 h)之间的显著差异由星号表示(* P <0.05; ** P <0.01)。下同

β-actin gene was used as reference sample. The error line represents Mean±SE (n=3). The significant difference between the experimental group and the blank control (0 hours) was indicated by the asterisk (* P <0.05; ** P <0.01). The same as below

同时, 还发现 *PoJNK2* 的过表达会使通路下游的各个细胞因子均有不同程度的表达上调。*PoJNK2* 过表达后, IL-6 的表达量与 p-cDNA3.1 组和空白对

照组相比分别升高了 8.5 和 15.8 倍; IL-8 的表达量与 p-cDNA3.1 组和空白对照组相比分别升高了 7.8 和

17.9 倍; TNF- α 的表达量与 p-cDNA3.1 组和空白对照组相比分别升高了 24.7 倍和 35.9 倍。

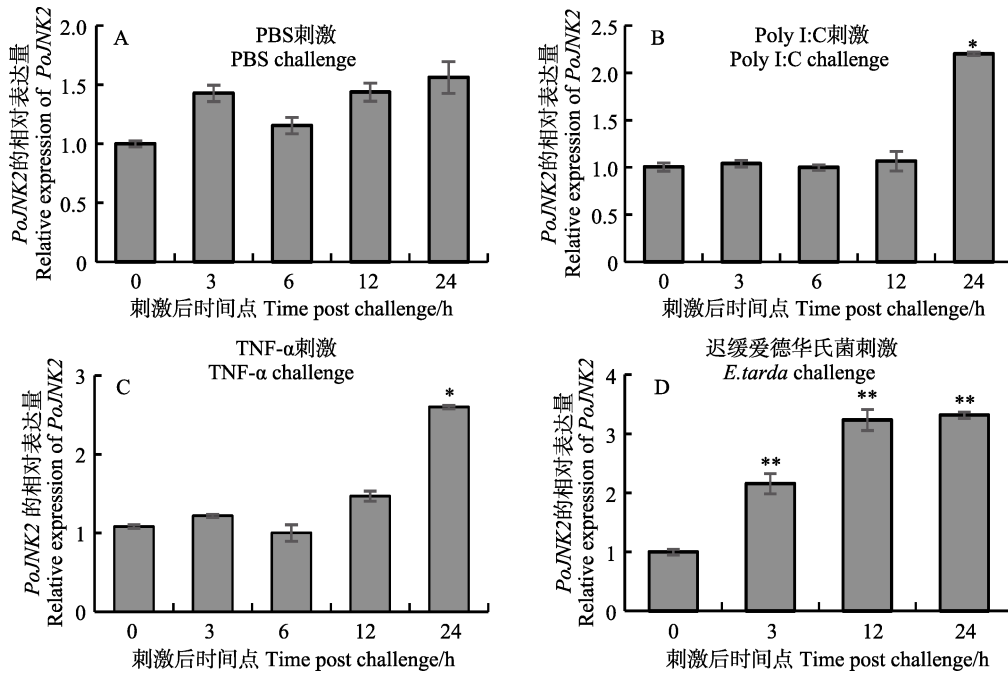


图 6 *PoJNK2* 在免疫刺激牙鲆鳃细胞中的表达模式

Fig.6 Expression pattern of *JNK2* in gill cells of immune stimulated Japanese flounder

A~D: *PoJNK2* 的 mRNA 水平在不同刺激下的 FG 细胞的定量表达模式, 包括 PBS、Poly I:C、TNF- α 和 *E.tarda*。

A~D: Quantitative expression patterns of *JNK2* mRNA in FG cells stimulated by different stimuli, including PBS, Poly I: C, TNF- α and *Edwardiella tarda*

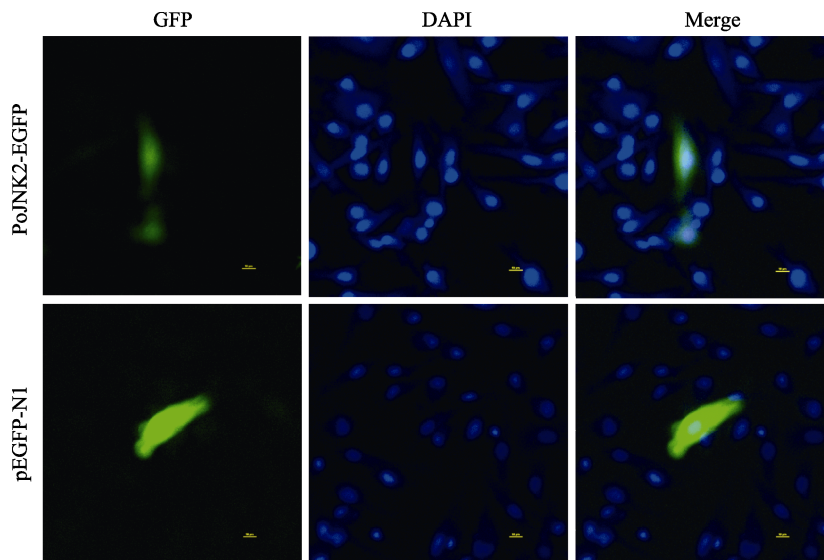


图 7 *PoJNK2* 蛋白的亚细胞定位

Fig.7 Subcellular localization of *JNK2* proteins in Japanese flounder

激光共聚焦扫描显微镜下, *PoJNK2*(绿色荧光)在细胞中的分布。核 DNA 用 DAPI 染色, 为蓝色荧光, pEGFP-N1 用作阴性对照。Bar = 10 μ m

Under laser confocal scanning microscope (LSCM), *PoJNK2* in the whole cell, mainly in the cytoplasm. Nuclear DNA was stained with DAPI, blue fluorescence, pEGFP-N1 was used as negative control. Bar = 10 μ m

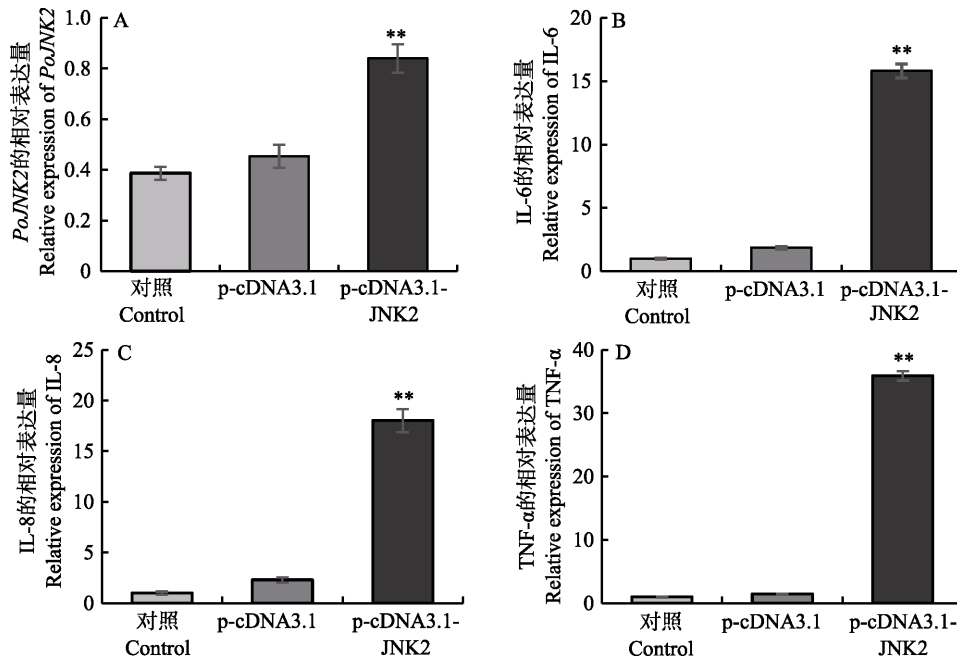


图 8 *PoJNK2* 过表达对 TNF- α 刺激的 FG 细胞中通路下游细胞因子的表达的影响
Fig.8 Effect of *PoJNK2* overexpression on the expression of cytokines downstream of pathway in FG cells stimulated by TNF- α

A: qRT-PCR 显示 *PoJNK2* 过表达后, mRNA 表达量升高; B、C、D: 转染 24 h 后, 细胞用 TNF- α 刺激(20 ng/ml)刺激 24 h, 通过 qRT-PCR 分析 IL-6 和 IL-8、TNF- α 的表达水平

A: The expression of mRNA increased after overexpression of *JNK2* by qRT-PCR. B, C, and D: The expression levels of IL-6, IL-8 and TNF- α were analyzed by qRT-PCR. The cells were stimulated with TNF- α (20 ng/ml) for 24 hours after transfection

2.7 *PoJNK2* 基因过表达对下游 AP-1 的转录调控作用

为确定 *PoJNK2* 基因过表达后是否会对 MAPK 信号通路下游的转录因子 AP-1 有激活作用, 设计双荧光素酶报告实验, 结果如图 9 所示, 与空白对照组

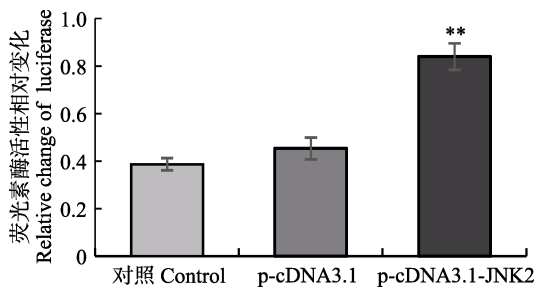


图 9 *PoJNK2* 过表达对 AP-1 报告基因活性的影响
Fig.9 The effect of overexpression of *PoJNK2* on the activity of AP-1 reporter gene in Japanese flounder

转染 24 h 后检测荧光素酶活性。未转染质粒和转染 p-cDNA3.1 作为对照, 显著差异由星号表示 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

The results showed that AP-1 luciferase reported the change of fluorescence intensity of plasmids. Luciferase activity was detected 24 hours after transfection. The difference between untransfected plasmid and transfected p-cDNA3.1 was indicated by asterisk (* $P < 0.05$; * $P < 0.01$)

和转染 p-cDNA3.1 组相比, *JNK2* 的过表达显著增强 MAPK 信号通路下游转录因子 AP-1 的转录活性。

3 讨论

在以往研究中, 从节肢动物到哺乳动物, JNK 作为保守的应激激活蛋白激酶, 可被多种免疫刺激物激活, 并在宿主防御和免疫反应方面发挥重要作用 (Delaney *et al.*, 2006)。然而, 对于硬骨鱼类, 特别是牙鲆 JNK 功能的了解还十分有限。本研究对牙鲆 *JNK* 基因进行了序列鉴定和功能探究。

本研究发现, 牙鲆 *JNK2* 具有典型的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶催化结构域 S_TKc, 且通过氨基酸序列分析显示, 牙鲆 *JNK2* 的 S_TKc 结构域与其他硬骨鱼的 S_TKc 结构域高度保守, 说明牙鲆 *JNK2* 与大部分硬骨鱼的 *JNK* 的同源性较高。

根据 Zapata 等(2006)研究发现, 鱼类的免疫器官主要包括肾脏、脾脏、胸腺和肠道相关淋巴组织。同时, 也有报道证实鱼类的鳃在抗病毒免疫方面发挥着重要作用(Li *et al.*, 2014)。本研究发现, *PoJNK2* 在脑、鳃和肠中表达较高, 因此, 推测 *PoJNK2* 在牙鲆对抗外来病原体的免疫防御中可能起着重要作用。为了探究这种免疫防御机制, 使用迟缓爱德华氏菌感染牙鲆

的脾脏、头肾和鳃,定量检测 *PoJNK2* 的表达变化。结果发现,经迟缓爱德华氏菌刺激后,这3个组织中的 *PoJNK2* 的表达水平显著增加,基本呈现先升高后降低或者先升高后降低又升高的趋势。该结果进一步阐明了 *PoJNK2* 在牙鲆免疫防御中发挥的保护作用。然而,还需要进一步的研究来揭示这种免疫防御机制。

PolyI:C 是一种病毒 dsRNA 类似物,在体内可以作为干扰素抑制剂(Liu *et al.*, 2017)。TNF- α 是一种由巨噬细胞衍生的具有抗肿瘤活性的细胞因子,与炎症、免疫调节、抗病毒防御、内毒素休克和有丝分裂等多种生物学过程有关(Hattori *et al.*, 1996)。PolyI:C 和 TNF- α 经常在实验中被用来模拟病毒对细胞进行刺激。Nishitoh 等(1998)向 293T 细胞中转染含 HA 标记的 *JNK* (HA-*JNK*)后,再使用 TNF- α 刺激,用免疫复合物激酶法检测 *JNK* 活性发现,TNF- α 可诱导 *JNK* 活化,并推测 TNF- α 对 *JNK* 的激活可能是依赖于硫醇/二硫键的交换反应。本研究免疫刺激实验结果表明,PolyI:C、TNF- α 和迟缓爱德华氏菌均能使 *PoJNK2* 的表达上调,但上调幅度有所不同。这说明 *PoJNK2* 在面对不同的免疫刺激其产生的免疫应答效果是不同的,其原因可能是细胞对于特定的免疫刺激物和活细菌的反应机制不一样。通过本研究结果可以确认细菌和病毒类似物均可刺激 *PoJNK2* 表达增加,说明 *PoJNK2* 在牙鲆抗菌抗病毒反应中可能发挥一定的作用。

炎症细胞因子是一类控制炎症细胞反应的免疫调节分子,主要包括 IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-18 和 TNF- α 等。细胞因子可与特定的细胞因子抑制剂和可溶性细胞因子受体协同作用,调节人体的免疫应答(Giorgos *et al.*, 2014)。已有研究证实,哺乳动物中一些胞内类型的细菌感染可强烈激活 *JNK* 通路,而且在免疫刺激下,*JNK* 激活是产生多种炎症细胞因子所必需的(Chu *et al.*, 1999)。本研究证实了以上结论,*PoJNK2* 过表达后能显著上调 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的表达。这些结果表明, *PoJNK2* 在牙鲆体内发挥免疫作用的机制可能是通过调节细胞因子从而产生促炎反应。

据研究,MAPK 信号通路能够介导从细胞外到细胞质或细胞核的信号转导,从而调节多种细胞过程(Yang *et al.*, 2012)。与其他 MAPK 成员相似,*JNK* 蛋白主要分布在胞浆中,没有外部信号。在适当的环境刺激下,特异性上游 MKK4 或 MKK7 激酶通过双重磷酸化激活 *JNK*。然后,磷酸化的 *JNK* 转移到细胞核,激活转录因子以改变靶基因的表达(Davis, 2000)。在 Dunn 等(2002)的研究中,证实 *JNK* 可以激活下游

转录因子 AP-1,然后调控着对病原体的反应起重要作用的各种炎症细胞因子的产生。Qu 等(2015)研究表明,*JNK* 通路可以调节 AP-1 在软体动物中对藻溶弧菌感染的反应。同样,在本研究中, *PoJNK2* 的过表达显著激活了 AP-1 荧光素酶报告质粒的活性。这些发现表明,在牙鲆的感染过程中, *PoJNK2* 可能是通过激活转录因子 AP-1 改变靶基因的表达,进而参与免疫反应。

综上所述,本研究首次在牙鲆中克隆验证了 *PoJNK2* 基因,核酸、氨基酸序列比对及系统进化分析都显示出 *JNK2* 基因与大多数硬骨鱼具有较高的保守性。组织表达表明, *PoJNK2* 主要在牙鲆的免疫组织中表达。体内注射迟缓爱德华氏菌和体外免疫刺激(包括 PolyI:C、TNF- α 和迟缓爱德华氏菌)均能够增强 *PoJNK2* 的表达;作为胞内蛋白, *PoJNK2* 在细胞内过表达会激活 MAPK 通路下游 AP-1 的转录,并显著上调炎症细胞因子 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的表达。本研究为海水鱼类抗病育种和疾病防治提供了理论参考。

参 考 文 献

- Abayneh T, Colquhoun DJ, Sørum H. *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114: 644–654
- Cao DD, Liu JX, Wang ZG, *et al.* Expression analysis and functional characterization of NOD2 in the resistance of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to *Edwardsiella tarda* infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 53–64 [曹丹丹, 刘金相, 王志刚, 等. 牙鲆 NOD2 基因的表达分析及在抗迟缓爱德华氏菌感染过程中的功能. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 53–64]
- Castro N, Toranzo AE, Barja JL, *et al.* Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta maxima* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 2010, 29(9): 541–547
- Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 2001, 410: 37–40
- Chu WM, Ostertag D, Li ZW, *et al.* *JNK2* and *IKK β* are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*, 1999, 11(6): 721–731
- Davis RJ. Signal transduction by the *JNK* group of MAP kinases. *Cell*, 2000, 103: 239–252
- Delaney JR, Stoven S, Uvell H, *et al.* Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the *JNK* and NF- κ B signaling pathways. *EMBO Journal*, 2006, 25: 3068–3077
- Dérillard B, Hibi M, Wu IH, *et al.* *JNK1*: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, 1994, 76: 1025–1037

- Dunn C, Wiltshire C, Maclaren A, *et al.* Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cellular Signalling*, 2002, 14: 585–593
- Giorgos B, Arseneau KO, Fabio C. Cytokines and mucosal immunity. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2014, 30: 547–552
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, *et al.* Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO Journal*, 1996, 15: 2760–2770
- Hattori A, Hayashi K, Kohno M. Tumor necrosis factor (TNF) stimulates the production of nerve growth factor in fibroblasts via the 55-kDa type 1 TNF receptor. *FEBS Letters*, 1996, 379: 157
- Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, 12: 186–192
- Li QM, Chen LJ, Rao YL, *et al.* Gill mediates immune responses after grass carp reovirus challenge in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38: 834–840
- Li ZY, Chen SL, Guo H, *et al.* Screening of disease-resistant and fast growing families and subculture breeding for resistance against *Edwardsiella tarda* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 36–43 [李泽宇, 陈松林, 郭华, 等. 牙鲆抗迟缓爱德华氏菌病家系的继代选育与早期速生家系筛选. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 36–43]
- Ling SHM, Wang XH, Xie L, *et al.* Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiology*, 2000, 146: 7
- Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ. Reconstructing immune phylogeny: New perspectives. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 866–879
- Liu Y, Du Y, Wang H, *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) up-regulates IL-8 expression through TAK-1/JNK/AP-1 pathways. *Virology*, 2017, 506: 64–72
- Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, *et al.* TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes & Development*, 1999, 13: 1015
- Marchalonis JJ, Schluter SF. A stochastic model for the rapid emergence of specific vertebrate immunity incorporating horizontal transfer of systems enabling duplication and combinatorial diversification. *Journal of Theoretical Biology*, 1998, 193: 429
- Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, *et al.* ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Molecular Cell*, 1998, 2: 389–395
- Qu F, Xiang Z, Wang F, *et al.* A novel molluscan Fos gene with immune defense function identified in the Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 51: 194–201
- Rao PS, Srinivasa Lim TM, Leung KY. Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates. *Infection & Immunity*, 2001, 69: 5689
- Sluss HKS. A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes & Development*, 1996, 21
- Whyte SK. The innate immune response of finfish--A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23: 1127–1151
- Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*, 2012, 513: 1–13
- Zapata A, Diez B, Cejalvo T, *et al.* Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 20: 126–136

(编辑 冯小花)

Expression Analysis and Functional Characterization of *JNK2* in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

SI Yu, WANG Xuangang, WANG Mengya, WANG Xintong,
YU Haiyang, ZHANG Quanqi, WANG Zhigang^①

(Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, College of Marine Life Sciences,
Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract The immune system of teleost, similar to mammals, is divided into two subsystems: Innate immune system and acquired immune system. Acting as the first line of defense against invading pathogens and pathogenicity factors, the innate immune system can be activated by the pattern recognition receptor (PRRs) which can recognize the pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) and activate the downstream inflammatory response accordingly. MAPK(mitogen-activated protein kinase) signaling pathway is an important signal transduction system in eukaryote cells, which can mediate extracellular signaling into the cell and participate in various cellular processes such as cell proliferation, apoptosis, and immune response. JNK (c-Jun N-terminal kinase) signal pathway is an important branch of MAPK signal pathway. *JNK* have been extensively studied in mammals, but not adequately in the teleost. In this research, we designed experiments to study the role of *JNK2* genes in the antimicrobial reaction of Japanese flounder and their effects on the downstream of the pathway in order to provide a theoretical basis for the study of *JNK* signaling pathway in fish.

In this study, the *JNK2* gene sequences of Japanese flounder were obtained from the transcription database of flounder and named after *PoJNK2*. The *PoJNK2* ORF region encodes is 1263 bp and encodes 420 amino acids. The domains of *PoJNK2* genes were predicted by SMART server. The results showed that the *JNK2* gene had a typical serine-threonine protein kinase domain S_TKc. The expression levels of *PoJNK2* genes in different tissues of flounder were analyzed by the qRT-PCR technique. It was found that *PoJNK2* were widely expressed in the immune tissue of Japanese flounder. Therefore, it was preliminarily speculated that *PoJNK2* played a major role in the immune response of Japanese flounder. We designed an infection experiment of *Edwardsiella tarda* *in vivo* and immune stimulatory cell experiments *in vitro* to investigate the role of *PoJNK2* in the immune response of Japanese flounder. The expression of *PoJNK2* was up-regulated in the spleen, kidney, and gill of Japanese flounder after injecting *E. tarda* *in vivo*. At the same time, the gill cells of flounder (FG) were stimulated by *E. tarda*, Poly I:C and TNF- α . The expression of *PoJNK2* was up-regulated at different time points. In addition, we overexpressed *PoJNK2* in FG by cell transfection and it was found that *PoJNK2* had significant regulatory effects on the regulation of downstream pro-inflammatory cytokines and transcription factor AP-1. The role of *PoJNK2* in regulating the immune response of Japanese flounder was further clarified.

Key words Japanese flounder; *JNK2*; *Edwardsiella tarda*; Innate immunity

① Corresponding author: WANG Zhigang, E-mail: zgwang@ouc.edu.cn