

棘腹蛙白细胞介素-34基因的克隆与组织表达分析*

刘静¹, 景晓玲², 罗洁¹, 李晓英¹, 樊汶樵¹

(1. 重庆文理学院 林学与生命科学学院 水生动物疫病防控研究所, 重庆 永川 402168;

2. 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715)

摘要:【目的】考察棘腹蛙(*Rana boulengeri*)白细胞介素-34(Interleukin-34, IL-34)基因的信息和该基因组织表达特性。【方法】基于实验室构建的棘腹蛙皮肤转录组数据库,采用反转录PCR从棘腹蛙皮肤组织中克隆IL-34基因的全长cDNA序列,并用荧光定量PCR法检测IL-34基因在棘腹蛙各组织中的表达情况。【结果】棘腹蛙IL-34基因的cDNA全长为864 bp,包含564 bp的开放阅读框,编码187个氨基酸;预测IL-34理论分子量大小为70.56 kDa,理论等电点为4.85。荧光定量PCR分析表明IL-34基因在棘腹蛙皮肤、脑、肝脏、脾脏、胃、肌肉等组织中均有表达,在脾脏组织中表达量最高。【结论】成功克隆了棘腹蛙IL-34基因并探明了它的组织表达模式,为深入研究棘腹蛙IL-34的生物学功能提供了理论依据。

关键词:棘腹蛙;白介素-34;克隆;组织表达

中图分类号:Q812;S917.1

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2018)06-0029-05

白细胞介素是一类具有重要调节作用的细胞因子,由多种细胞产生同时又作用于多种细胞,与血细胞生长因子协同完成造血和免疫功能的调节^[1]。白细胞介素-34(Interleukin-34, IL-34)是一种新发现的可通过与集落刺激因子-1受体(Colony stimulating factor-1 receptor, CSF-1R)结合来调节单核和巨噬细胞的增殖、分化和生存的细胞因子^[2]。它不仅可以调节细胞的生物活性,亦在类风湿性关节炎、肾炎、肺炎、动脉粥样硬化等炎症疾病中可促进细胞发炎,在免疫调节过程中具有重要作用^[3-5]。

棘腹蛙(*Rana boulengeri*)属于两栖纲(Amphibia)无尾目(Anura)蛙科(Ranidae)棘蛙属(*Rana*),常栖息于山涧溪流中,主要分布在中国的四川、重庆、贵州等地,是中国特有的一种土著大型蛙类^[6]。作为一种名贵营养滋补食品,棘腹蛙不仅体大肥壮、肉质白嫩,而且它的皮肤中含有多种活性物质,能够治疗小儿虚瘦、产后或病后虚弱等病症,因而具有广阔的市场前景^[7-9]。近些年来,由于水体污染、气候变化、人类大肆捕杀等多种因素造成该物种的种群规模不断缩小,现已被《中国濒危物种红皮书》列为“易危”物种^[9]。

截至目前,关于棘腹蛙以及两栖类动物的白细胞介素类细胞因子的研究尚处初级阶段;开展棘腹蛙IL-34的生物学功能研究,对于了解该类细胞因子如何介导动物免疫系统调节具有重要指导意义,同时也为广谱抗病毒生物制剂的生产研发奠定基础。本研究鉴定分析了棘腹蛙IL-34基因及它所编码蛋白质的有关特征,探明了棘腹蛙IL-34基因的组织表达模式,为深入研究两栖动物IL-34生物学功能和作用机制提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和试剂

实验用棘腹蛙为将捕获自重庆市江津四面山野生棘腹蛙置于笔者所在实验室内进行人工繁殖后得到的子

* 收稿日期:2018-03-03 修回日期:2018-05-17 网络出版时间:2018-10-25 10:41

资助项目:重庆市基础科学与前沿技术研究重点专项(No. cstc2015jcyjBX0013);重庆市社会事业与民生保障科技创新专项科技扶贫一般项目(No. cstc2017shms-kjfp80006);重庆市教育委员会科学研究项目(No. KJ1601123;No. KJ1601109);重庆文理学院人才引进专项(No. R2013LS14);重庆文理学院校级重点项目(No. 2017ZLX20)

第一作者简介:刘静,女,助理实验师,研究方向为基因工程和生物信息学,E-mail:liujinglxxy206@126.com;通信作者:樊汶樵,男,副教授,博士,E-mail:wonderbreeze@126.com.

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20181025.1041.018.html>

二代两岁龄成蛙,饲养于重庆文理学院水生动物疫病防控研究所流水养殖系统中。Trizol 试剂盒(Invitrogen, 美国)和 DEPC 购自上海生工;Taq 酶、cDNA 合成试剂盒和 PCR 纯化试剂盒购自 Promega 公司;Trans2K DNA marker 购自大连宝生物工程公司;凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 基因序列验证

摘取棘腹蛙皮肤组织放入经 DEPC 处理的冷冻离心管内,迅速液氮处理。随后用 Trizol 试剂盒参照说明书提取总 RNA,利用质量分数为 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,采用紫外分光光度计(Amersham, 美国)测定 RNA 浓度,随后用 cDNA 合成试剂盒制备 cDNA 模板。根据实验室自测的棘腹蛙皮肤组织转录组数据,利用 Primer 5.0 软件设计基因特异性引物 IL-34-F 和 IL-34-R(表 1)。用高保真 DNA Taq 酶进行基因扩增,产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,使用凝胶回收试剂盒进行回收,阳性产物送苏州金唯智生物科技有限公司测序。

1.3 生物信息学分析

用 SMART, SignalP 3.0, BoxShade Server 软件分别对 IL-34 基因进行功能结构域、信号肽和同源比对。在 GenBank 数据库中检索 IL-34 的同源序列,用 ClustalX 1.83 软件比对多重序列,再用 MEGA 5.0 软件对 IL-34 的家族基因进行临近法构建系统进化树,取 1 000 次重复检验以估算各个分枝的置信值。

1.4 IL-34 基因在不同组织的表达分析

采用双毁髓法处死体质量相近的棘腹蛙 10 只,分别取脑、肝脏、脾脏、胃、肌肉、皮肤等组织约 100 mg。用 Trizol 试剂盒并参照说明书提取以上各组织的总 RNA。根据棘腹蛙 IL-34 基因开放阅读框(ORF)设计荧光定量 PCR(qRT-PCR)引物 IL-34-QF 和 IL-34-QR,以转录组数据库中自测的棘腹蛙 β -actin 为内参基因,设计引物 β -actin-F 和 β -actin-R(表 1)。

表 1 棘腹蛙 IL-34 基因克隆与定量分析所用引物

Tab. 1 Primers used to amplify and express the IL-34 gene in *R. boulengeri*

| 引物名称 | 序列(5'—3') | 作用 | 扩增 DNA 片段大小/bp |
|------------------|----------------------------|---------|----------------|
| IL-34-F | GACTGCTCTGGGCTGCCTGCACACC | 基因克隆 | 864 |
| IL-34-R | TTGGGTTTCGGGATATTTGGGGAGAC | 基因克隆 | 864 |
| IL-34-QF | GGTGTCAGAACATCACAACA | QRT-PCR | 94 |
| IL-34-QR | GTCTGCAGGACACTCTCATT | QRT-PCR | 94 |
| β -actin-F | ACGTGACCTGACAGACTACC | QRT-PCR | 105 |
| β -actin-R | CAGAGCTTCTCCTTGATGTC | QRT-PCR | 105 |

以反转录得到的各组织 cDNA 为模板,利用 Real-time PCR(LightCycler Nano System, Roche, 德国)检测 IL-34 基因在各组织中的相对表达量。根据荧光定量试剂盒(Faststar essential DNA Green Master, Roche, 德国)说明书配制 20 μ L 的反应体系,以 β -actin 作为内参基因,每个组织样品设定 3 个重复。PCR 反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 8 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,52 $^{\circ}$ C 退火 10 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环。相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[10]。所得数据均以“平均值 \pm 标准差”显示,并采用单因素方差分析以及多重比较(LSD)进行分析,当 $p < 0.05$ 时,统计结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-34 基因验证

通过特异性引物进行 PCR 扩增,获得了长约 864 bp 的目的片段(图 1a)。扩增产物测序结果如图 1b 显示。该 cDNA 序列的 ORF 为 564 bp,共编码 187 个氨基酸——其中酸性氨基酸为 21 个,碱性氨基酸为 25 个。IL-34 理论分子质量为 70.56 kDa,理论等电点为 4.85。

2.2 IL-34 基因同源性及系统进化分析

从 GenBank 数据库中下载已公布的其他物种来源 IL-34 氨基酸序列,与本研究分析得到的棘腹蛙 IL-34 氨基酸序列进行比对。结果表明,IL-34 含有 1 个长度为 17 个氨基酸残基的信号肽序列,从第 16 位至第 173 位氨基酸残基为 IL-34 的保守功能结构域,表明棘腹蛙的 IL-34 为功能相对保守的分泌型蛋白(图 2)。

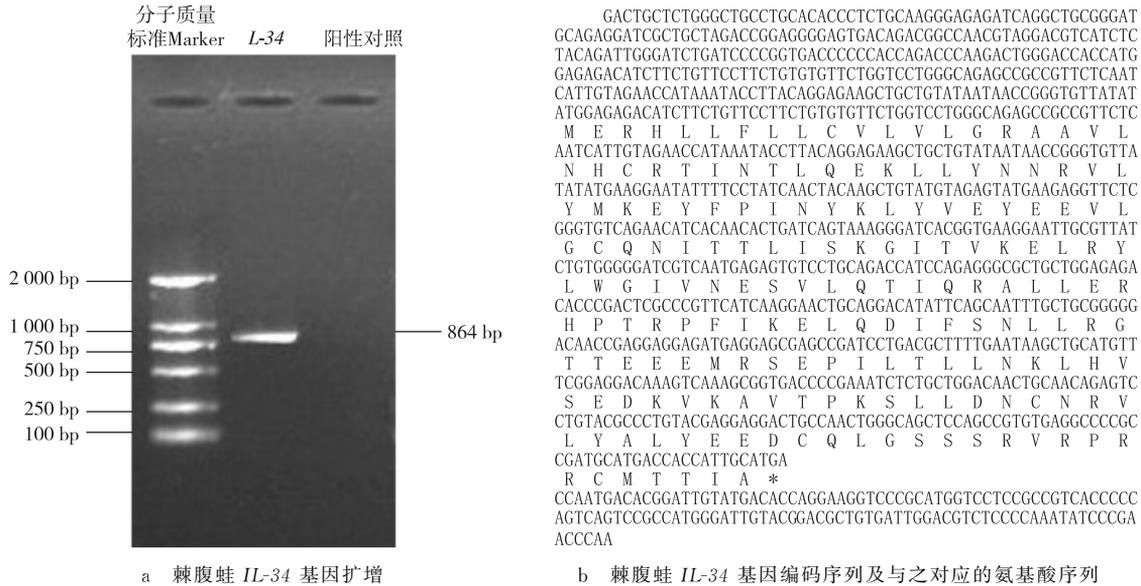
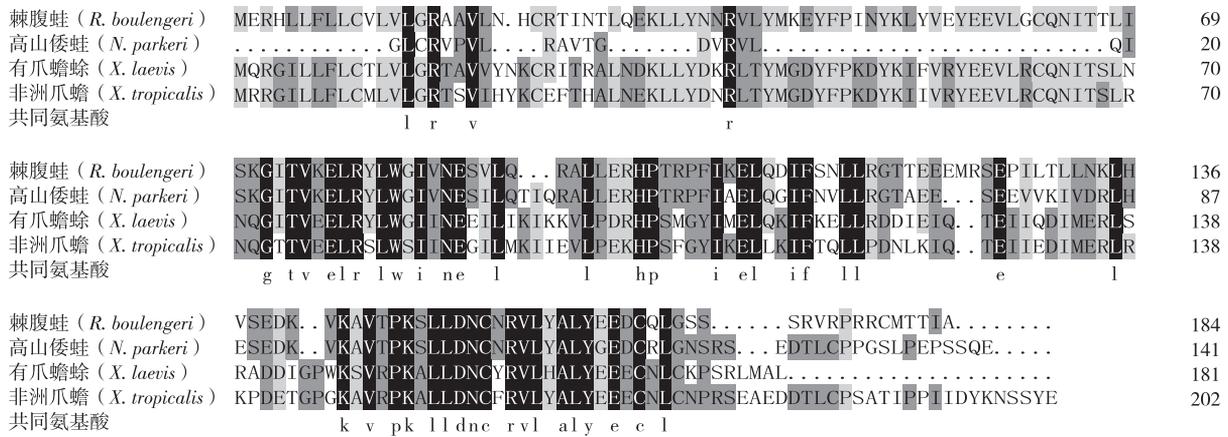


图 1 棘腹蛙 IL-34 基因克隆

Fig. 1 Cloning of IL-34 of *R. boulengeri*



注:高山倭蛙、有爪蟾和非洲爪蟾的 Genbank 登录号分别为 xp-018429647.1, xp-018116129.1 和 xp-012817098.1

图 2 棘腹蛙与其他物种的 IL-34 氨基酸序列

Fig. 2 The amino acid alignments of IL-34 of *R. boulengeri* and another species

利用邻接法对棘腹蛙与其他物种的 IL-34 氨基酸序列构建遗传进化树,结果如图 3 所示:棘腹蛙 IL-34 与高山倭蛙(*Nanorana parkeri*)的 IL-34 单独聚为一枝,且与有爪蟾(*Xenopus laevis*)和非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*)的 IL-34 较为近缘,而与啮齿目(Rodentia)、食虫目(Insectivora)、食肉目(Carnivora)和灵长目(Primates)动物亲缘关系较远。

2.3 IL-34 基因在棘腹蛙各组织中的表达

使用 qRT-PCR 技术检测 IL-34 基因在棘腹蛙脑、肝脏、脾脏、胃、肌肉以及皮肤中的表达情况。定量 PCR 溶解曲线仅显示 1 个特征峰,且通过电泳确定 QRT 扩增片段与预期扩增片段大小一致的视为阳性。对阳性检测产物进行相对定量分析,结果显示 IL-34 基因在棘腹蛙被检测的组织中均有表达。图 5 显示:该基因在脾脏中的相对表达量最高,与它在其他组织中的相对表达量相比,差异均具有统计学意义($p < 0.05$);该基因在脑中的相对表达量最低,与它在其他组织中的相对表达量相比,差异也均具有统计学意义($p < 0.05$)。

3 讨论

IL-34 是新发现的一种细胞因子,它可通过与受体 CSF-1R 结合来调节单核和巨噬细胞的增殖、分化和生存。自 IL-34 被发现以来,多项研究表明它不仅可调节细胞的生物活性,而且与很多炎症疾病的发生发展过程有关,多种炎症因子都能诱导 IL-34 基因表达,在免疫调节过程中具有重要作用^[11-12]。因此,开展对两栖类动物

IL-34 在脊椎动物中的进化及在濒危物种的疾病防治等方面的研究具有重要意义。

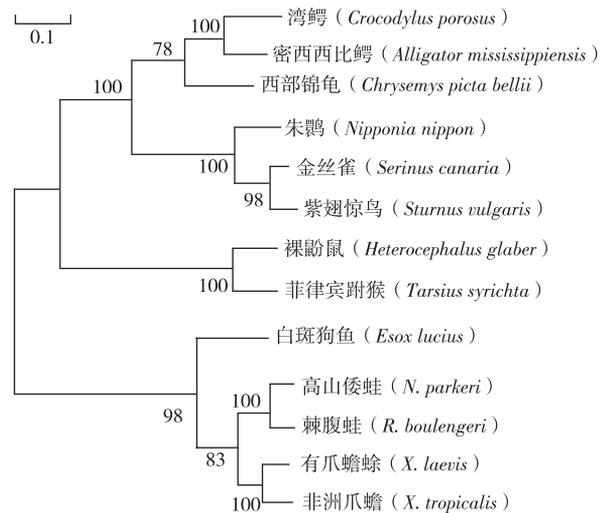
本研究基于棘腹蛙的转录组数据分析,以棘腹蛙的 cDNA 为模板,采用反转录 PCR 的方法获得了全长为 864 bp 的 *IL-34* 基因。经序列分析显示,它的 ORF 长为 564 bp,共编码 187 个氨基酸,预测 *IL-34* 理论分子量大小为 70.56 kDa,理论等电点为 4.85。与其他两栖类动物 *IL-34* 蛋白进行多重序列比对显示,此蛋白含有 1 个长为 17 个氨基酸残基的信号肽序列和 1 个 157 个氨基酸残基的保守功能结构域,表明该基因功能进化相对保守。通过邻接法构建的进化树进一步分析显示,棘腹蛙 *IL-34* 与高山倭蛙的 *IL-34* 单独聚为一支,与有爪蟾和非洲蟾的 *IL-34* 相对近缘,进化地位比较保守。

已有研究表明,*IL-34* 基因在人 (*Homo sapien*) 的脾脏和皮肤中有较高表达水平^[13],在小鼠 (*Mus musculus*) 皮肤和中枢神经中也有较高表达水平^[14];对 *IL-34* 基因在猪 (*Sus scrofa*) 的不同器官中的表达情况进行分析,发现 *IL-34* 基因在小肠中表达水平最高,其次为脑,在脾脏、肺和肾中的表达水平较低^[15]; *IL-34* 基因在硬骨鱼的肝脏、皮肤、肾、胸腺、脑、肌肉、鳞片、肠、尾鳍、脾和鳃中均有表达,且在不同组织中表达水平均相对较高^[16]。本研究结果显示, *IL-34* 基因在棘腹蛙被检测的组织中均有表达,在脾脏中的表达水平最高,在肝脏、胃、肌肉、皮肤中也有较高表达水平,在脑中的表达水平相对较低;这与 *IL-34* 在硬骨鱼的组织分布情况较为相似,可能与棘腹蛙和硬骨鱼的进化地位以及两者对水生环境的依赖性有关。此外,由于脾脏和皮肤均为水生动物较为重要的免疫器官,而 *IL-34* 基因在棘腹蛙中脾脏和皮肤中有较高表达水平,这说明 *IL-34* 可能在棘腹蛙的免疫调节过程中起着重要作用,这与 *IL-34* 在硬骨鱼类巨噬细胞谱系中起着稳定的作用观点相吻合^[16]。

综上所述,本研究通过对棘腹蛙 *IL-34* 基因的克隆及组织表达分析,为探索棘腹蛙主动免疫系统功能,提升棘腹蛙优质基因利用水平提供了理论支撑。

参考文献:

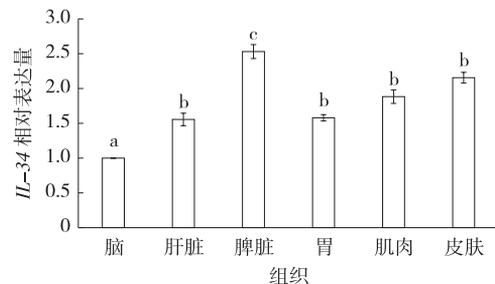
- [1] 许昌泰,李陕区. 白细胞介素研究新进展[J]. 武警后勤学院学报(医学版),2007,16(2):191-194.
XU C T, LI S Q. Current research progress in interleukins [J]. Journal of Logistics University of PAP (Medical Sciences), 2007, 16(2): 191-194.
- [2] BAEK J H, ZENG R, WEINMANNMENKE J, et al. IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease [J]. Journal of Clinical Investigation,



注:系统进化树构建所用物种的 GenBank 登录号分别为:湾鳄 XM 019535592.1;密西西比鳄 XM 006272776.3;西部锦龟 XM 008174775.1;朱鹮 XM 009470477.1;金丝雀 XM 009090681.2;紫翅惊鸟 XM 014880854.1;裸鼯鼠 XM 004842890.2;菲律宾跗猴 XM 008063313.1;白斑狗鱼 XM 013138990.2;高山倭蛙 XM 018574145.1;有爪蟾 XM 018260639.1;非洲蟾 XM 012961644.2。分枝上的数字代表置信值

图 3 棘腹蛙 *IL-34* 同源序列的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *IL-34* homolog derive from *R. boulengeri*



注:不同字母表示数据间差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)

图 5 棘腹蛙不同组织中 *IL-34* 基因的表达差异

Fig. 5 Differential expression of *IL-34* gene in different tissues of *R. boulengeri*

2015,125(8):3198-3214.

- [3] EDA H, ZHANG J, KEITH R H, et al. Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood [J]. Cytokine, 2010, 52(3): 215-220.
- [4] BAUD' HUIN M, RENAULT R, CHARRIER C, et al. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis [J]. Journal of Pathology, 2010, 221(1): 77-86.

- [5] 卫丽,马萍. IL-34 的生物学特性及与心血管疾病和自身免疫性疾病关系的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014,30(12):1335-1337.
WEI L, MA P. Biological characteristics of IL-34 and its relationship with cardiovascular and autoimmune diseases [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2014,30(12):1335-1337.
- [6] 费梁,叶昌媛,江建平,等. 中国两栖动物检索及图解[M]. 成都:四川科学技术出版社,2005.
FEI L, YE C Y, JIANG J P, et al. Chinese amphibian retrieval and graphics[M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 2005.
- [7] 温安祥,曾静康,何涛. 棘腹蛙肌肉嫩度及营养成分的初步分析[J]. 四川动物, 2001,20(4):211-212.
WEN A X, ZENG J K, HE T. Analysis on meat tenderness and nutritional composition of *Rana boulengeri* [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2001,20(4):211-212.
- [8] 温安祥,曾静康,刘昌宇. 棘腹蛙肌肉中氨基酸含量的初步测定[J]. 四川农业大学学报, 2001,19(1):97-99.
WEN A X, ZENG J K, LIU C Y. Determination of amino acid in *Rana boulengeri*'s muscle [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2001,19(1):97-99.
- [9] 李益得,廖常乐,毛寿林,等. 我国珍稀两栖动物:棘腹蛙[J]. 经济动物学报, 2012,16(2):119-122.
LI Y D, LIAO C L, MAO S L, et al. *Paa boulengeri*: rare amphibian animal in China [J]. Journal of Economic Animal, 2012,16(2):119-122.
- [10] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001,25(4):402-408.
- [11] GOW D J, VALERIE G, CLARE P, et al. Cloning and expression of feline colony stimulating factor receptor (CSF-1R) and analysis of the species specificity of stimulation by colony stimulating factor-1 (CSF-1) and interleukin-34 (IL-34) [J]. Cytokine, 2013,61(2):630-638.
- [12] FOUCHER E D, BLANCHARD S, PREISSER L, et al. Correction: IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ [J]. Cellular Immunology, 1986,98(2):467-476.
- [13] CHEN Z, BUKI K, VÄÄRÄNIEMI J, et al. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis [J]. Plos One, 2011,6(4):e18689.
- [14] 杨青,全雄志,廉虹,等. IL34 转基因小鼠的建立和表型分析[J]. 中国比较医学杂志, 2011,21(6):64-66.
YANG Q, QUAN X Z, LIAN H, et al. The establishment of interleukin 34 transgenic mice abstract [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2011,21(6):64-66.
- [15] 胡彝. 猪白细胞介素-34 (pIL-34) 的分子克隆、表达和生物学活性验证[D]. 武汉:华中农业大学, 2010.
HU B. Molecular cloning, expression and biological verification of porcine interleukin-34 (pIL-34) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010.
- [16] WANG T, KONO T, MONTE M M, et al. Identification of IL-34 in teleost fish: differential expression of rainbow trout IL-34, MCSF1 and MCSF2, ligands of the MCSF receptor [J]. Molecular Immunology, 2013,53(4):398-409.

Animal Sciences

Cloning and Expression Analysis of Gene of Interleukin-34 in *Rana boulengeri*

LIU Jing¹, JING Xiaoling², LUO Jie¹, LI Xiaoying¹, FAN Wenqiao¹

(1. Institute of Aquatic Animal Disease Prevention and Control, College of Life Science & Forestry, Chongqing University of Art & Science, Yongchuan Chongqing 402168;

2. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: [Purposes] To investigate gene information and tissue expression characteristics of gene of interleukin-34 (IL-34) in *Rana boulengeri*. [Methods] The complete open reading frame (ORF) sequence of *IL-34* was amplified by RT-PCR according to the transcriptome of *R. boulengeri* skin constructed by our laboratory. The tissue expression analysis was used by qRT-PCR in main tissues. [Findings] The results indicated that the full length cDNA sequence of *R. boulengeri IL-34* consist of 864 bp, containing an ORF of 564 bp. The putative *IL-34* is predicted to be a peptide of 187 amino acids, with a calculated molecular weight of 70.56 kDa and an isoelectric point of 4.85. The analysis of fluorescence quantitative PCR showed that *IL-34* was expressed in the skin, brain, liver, spleen, stomach and muscle tissues, and the highest expression was expressed in the spleen tissues. [Conclusions] *IL-34* from *R. boulengeri* was cloned successfully and the tissue distribution was analyzed, which provides a reference for the biological function of the late IL-34 dig.

Keywords: *Rana boulengeri*; interleukin-34; cloning; tissue expression

(责任编辑 方 兴)