

香鱼*IL-12B*基因序列及其表达与鳙利斯顿氏菌感染的相关性分析

沈广强 陈炯* 史雨红 周前进 陆新江

(宁波大学生物与海洋科学系, 宁波 315211)

摘要 白介素-12B(interleukin-12B, IL-12B)是组成IL-12分子的亚基, 参与病原菌感染引起的免疫反应。该研究经香鱼(*Plecoglossus altivelis*)巨噬细胞转录组测序获得其*IL-12B*基因, 包括完整的开放阅读框在内, 序列大小为1 152 bp, 预测编码的前体蛋白由303个氨基酸组成, N-端22个氨基酸残基为信号肽序列。序列比对及进化树分析表明, 香鱼IL-12B与大西洋鲑IL-12B进化关系最近, 氨基酸序列同源性达50%。香鱼*IL-12B*基因mRNA在健康香鱼头肾组织和外周血白细胞中表达量最高, 在脾脏、腮和肠等组织也有少量表达。荧光定量PCR分析揭示, 鳙利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)感染后, 香鱼头肾组织和外周血白细胞*IL-12B*基因mRNA表达显著上调, 12 hpi(hours post infection)时达到峰值。随后原核表达了香鱼IL-12B, 并制备抗血清。Western blot结果揭示, 香鱼血清IL-12B含量在鳙利斯顿氏菌感染后4 hpi时尚无显著变化, 8 hpi后显著上调, 并表现持续增加。综上, 香鱼*IL-12B*基因的表达变化与鳙利斯顿氏菌感染过程密切相关, 揭示香鱼*IL-12B*基因可能在病原菌感染引起的免疫反应中发挥重要作用。

关键词 白介素-12B; 香鱼; 鳙利斯顿氏菌; 基因表达

Sequence Analysis of Sweetfish (*Plecoglossus altivelis*) Interleukin-12B Gene and Its Expression Changes upon *Listonella anguillarum* Infection

Shen Guangqiang, Chen Jiong*, Shi Yuhong, Zhou Qianjin, Lu Xinjiang

(Faculty of Life and Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Interleukin-12B (IL-12B), a subunit of IL-12, plays an important role in the inflammatory response in mammals against intracellular pathogenic bacteria. In this study, the cDNA sequence encoding *IL-12B* gene of sweetfish, 1 152 bp in length excluding 3'-poly A tail, was obtained from de-novo transcriptome sequencing of sweetfish macrophages. The sequence contained a complete open reading frame (ORF), which encoded a propeptide of 303 amino acids (aa). A 22 aa signal peptide was predicted to be existed at its N-terminus. Sequence analysis showed that sweetfish IL-12B shared the highest homology with that of Atlantic salmon with 50% protein sequence identity or 50% amino acid sequence identity. *IL-12B* mRNA was mainly expressed in the head kidney and peripheral blood leukocytes (PBL), weakly expressed in the spleen, gills and intestine of healthy sweetfish. Upon *Listonella anguillarum* infection, *IL-12B* mRNA expression dramatically increased in the head kidney and PBL, and

收稿日期: 2013-05-07 接受日期: 2013-06-17

国家自然科学基金(批准号: 31201970)和浙江省自然科学基金重点项目(批准号: LZ13C190001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0574-87609571, E-mail: jchen1975@163.com

Received: May 7, 2013 Accepted: June 17, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31201970) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No.LZ13C190001)

*Corresponding author. Tel: +86-574-87609571, E-mail: jchen1975@163.com

网络出版时间: 2013-08-26 14:39 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130826.1439.002.html>

reached peak value at 12 hpi (hours post infection). Western blot analysis indicated that serum IL-12B significantly increased in sweetfish infected by *L.anguillarum*. In conclusion, IL-12B might be involved in the progress of immune response in sweetfish against microbial infections.

Key words interleukin-12B; sweetfish; *Listonella anguillarum*; gene expression

IL-12(interleukin-12, IL-12)是一个关键的免疫调节细胞因子,是由白介素-12A(IL-12A)亚基和白介素-12B(IL-12B)亚基通过共价键形成的异二聚体分子,具有诱导NK细胞分泌干扰素- γ 以及促进CD4⁺T细胞向Th1细胞分化等多重生物学功能。IL-12分子作为一个肿瘤易感分子标志物,为肿瘤治疗提供了新的策略^[1]。在哺乳动物中,IL-12B仅在能产生活性IL-12分子的抗原呈递细胞中表达^[2],且表达量远大于IL-12A的表达量。它在小鼠体内大量表达时,以同源二聚体结构竞争性IL-12受体的 β 1亚基结合,对IL-12分子产生拮抗作用,从而抑制Th1型免疫反应^[3-4];它能趋化巨噬细胞,诱导肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等的表达,启动机体炎症反应^[5-7];它能促进活化的树突细胞迁移^[8]。由于其重要性,IL-12B的研究日益受到人们关注。然而,在鱼类中研究报道很少,仅河豚鱼、鲤鱼和大西洋大比目鱼等鱼类的*IL-12B*基因得到鉴定^[9-12]。

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)是中国、朝鲜和日本等东亚国家特有的一种名贵经济鱼类,属于胡瓜鱼目(Osmeriformes)香鱼科(Plecoglossidae),经济价值高,发展前景大,非常适合绿色水产养殖^[13]。近年来,由于国际市场对香鱼需求量日趋增加,国内香鱼养殖迅速兴起,集约化程度持续提高,香鱼病害爆发频繁,由鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)、假单胞杆菌(*Pseudomonas plecoglossicida* sp. Nov.)等病原菌感染导致的养殖病害已成为香鱼养殖产业发展的制约性因素之一^[14-15]。病原的复杂多变性给防治工作带来了很大困难,而抗生素的滥用更是产生了抗生素残留和细菌耐药性等诸多问题。近年来,日本对从我国进口的香鱼规定了112种兽药、饲料添加剂和重金属限量指标,给香鱼的出口创汇带来了严峻考验。因此,有必要对香鱼免疫相关基因进行研究,为后续相关病害的防治及抗病品种选育奠定理论基础^[16]。本文经香鱼巨噬细胞转录组测序获得香鱼*IL-12B*基因的cDNA序列,通过序列比对和进化树构建分析该基因序列结构特征以及系统进化关系。分别利用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)技术和

Western blot技术分析*IL-12B*基因在鳃利斯顿氏菌感染前后mRNA转录水平和血清蛋白水平的表达变化,为研究*IL-12B*基因在鱼类中的免疫学功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

健康香鱼(20~30 g)购自宁海鳊溪香鱼养殖场。鳃利斯顿氏菌香鱼分离株ayu-H080701、大肠杆菌TG1和BL21 pLys E菌株、pET-28a载体等由实验室保存。RNAiso Reagent、pMD19-T Simple Vector、AMV逆转录酶、Ex Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、*Nde* I、*Bam*HI和SYBR Premix Ex Taq试剂盒等购自TaKaRa公司。ECL化学发光试剂盒、显影定影试剂盒、柯达X-OMAT BT胶片和压片暗盒等购自碧云天生物技术有限公司。ICR小鼠购自浙江医学科学院实验动物中心。SDS-PAGE低分子量蛋白标准购自中国科学院上海生物化学研究所。Gel Extraction Kit购自Omega公司。二抗(辣根酶标记山羊抗小鼠IgG)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。引物合成及序列测序工作由上海英骏生物工程公司完成。

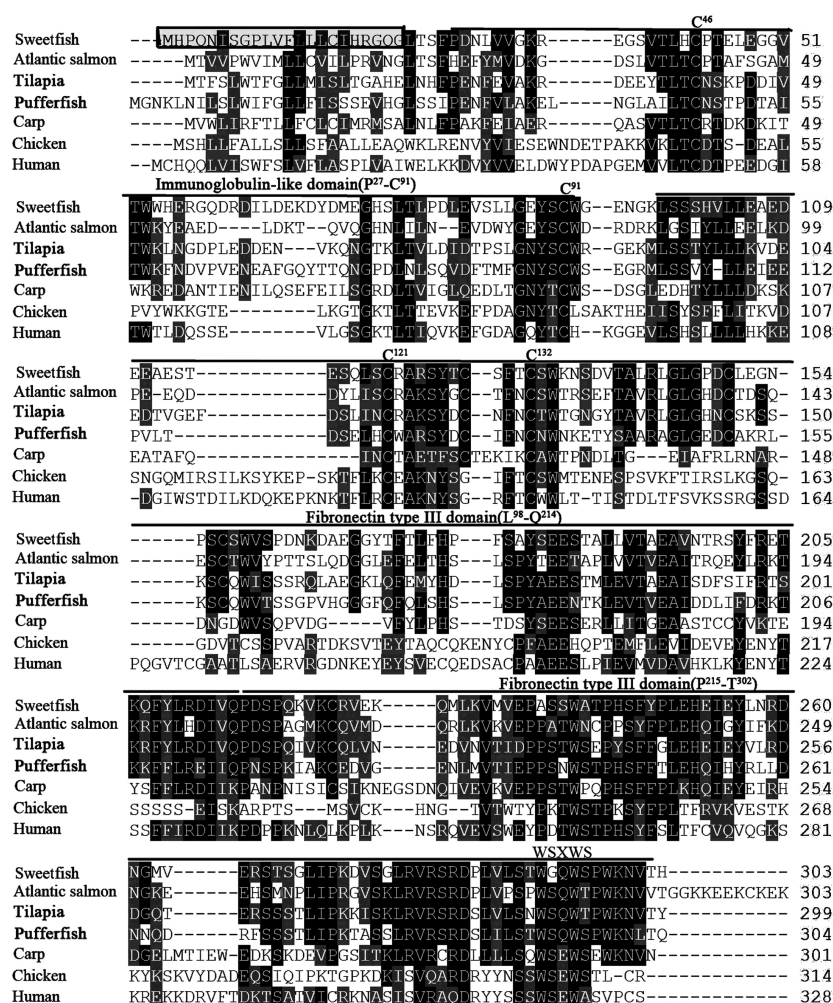
1.2 方法

1.2.1 香鱼*IL-12B*基因cDNA序列获得及序列分析 健康香鱼头肾巨噬细胞的分离和培养参考Lu等^[17]的方法,采用Illumina HiSeq 2000测序平台进行转录组测序,从中获得香鱼*IL-12B*基因cDNA序列(JP727752),随后采用常规PCR和RACE方法从香鱼巨噬细胞cDNA中扩增并测序验证,所获得的序列与转录组测序结果一致。采用ClustalW在线程序进行多重序列比对(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>),MEGA 4.0软件构建系统进化树,SignalP 3.0在线程序预测信号肽序列(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。

1.2.2 健康香鱼*IL-12B*基因mRNA的组织表达特征分析 取健康香鱼头肾、脾、脑、心、肝、肌肉、鳃和肠等组织以及香鱼外周血白细胞进行RT-qPCR的检测,具体操作参照Chen等^[18]的方法。总RNA提取采用RNAiso试剂,经过DNase I(RNase-free)处理

后, 取总量1 μg RNA作为模板, 以oligo(dT)₃₀为起始引物, 采用RNA PCR kit(AMV) Ver.3.0(TaKaRa)合成第一链cDNA。根据已获得的香鱼*IL-12B*基因cDNA序列设计检测引物, *sIL-12B* text(-): 5'-TTC CGT TGT CCC TGT TTA GG-3'和*sIL-12B* text(+): 5'-GCC CAC AGA AGG TCA AAT GT-3'; 选择香鱼看家基因 β -actin作为内参, 根据其cDNA序列(AB020884)设计引物*pActin2*(-): 5'-CGC ACT TCA TGA TGC TGT TG-3'和*pActin2*(+): 5'-TCG TGC GTG ACA TCA AGG AG-3'。RT-qPCR检测体系及程序参考Huang等^[13]的方法。

1.2.3 鳗利斯顿氏菌感染实验及Real-time qPCR
把菌株ayu-H080701接种到普通营养肉汤, 过夜培养(28 $^{\circ}\text{C}$), 按照1:50比例扩大培养, 洗涤、计数并用生理盐水将菌体稀释至 10^5 cfu/mL的终浓度。随机选取健康香鱼(40尾)分成实验组和对照组(各20尾), 实验组香鱼腹腔注射菌悬液, 0.1 mL/尾, 对照组注射等量无菌生理盐水。分别在0, 4, 8, 12, 24 hpi(hours post infection)时取样, 分别收集头肾组织和外周血白细胞, 具体操作参照Chen等^[18]的方法。总RNA抽提, 第一链cDNA合成及RT-qPCR扩增操作同1.2.2描述, 检测体系及程序采用Huang等^[13]的



黑色方框中代表香鱼IL-12B信号肽序列, 四个保守的半胱氨酸残基、三个结构域和保守的WSXWS基序在图中都已标出, 灰色和黑色阴影分别表示氨基酸残基的相似性和同一性, 各物种IL-12B序列登录号分别为: 香鱼: JP727752; 大西洋鲑: ACI68915; 罗非鱼: XP_003451134; 河豚鱼: XP_003975202; 鲤鱼: CAF32324; 鸡: CAD91902; 人: NP_002178。

The black box labeled the signal peptide sequence; The conserved cysteine residues, the three structural domains and the conserved WSXWS motif were marked. Identical residues were shadowed black and similar residues shadowed gray. GenBank accession numbers of sequences: Sweetfish (*Plecoglossus altivelis*): JP727752; Atlantic salmon (*Salmo salar*): ACI68915; Tilapia (*Oreochromis niloticus*): XP_003451134; Pufferfish (*Takifugu rubripes*): XP_003975202; Carp (*Cyprinus carpio*): CAF32324; Chicken (*Gallus gallus*): CAD91902; Human (*Homo sapiens*): NP_002178.

图1 动物IL-12B氨基酸序列的多重序列比对

Fig.1 Multiple alignment of the amino acid sequences of animal IL-12B

方法。实验结果采用SPSS单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计, $P < 0.05$ 为显著差异。

1.2.4 香鱼*IL-12B*的原核表达和抗血清制备 设计原核表达引物pET-sIL-12B(+): 5'-CCA TAT GCT CAC CTC GTT CCC CGA CAA-3'和pET-sIL-12B(-): 5'-CGG ATC CTC AGT GGG TTA CAT TTT TCC-3', 该引物对扩增编码香鱼*IL-12B*成熟肽的序列, 其中下划线标注部分为引物设计时添加的限制性内切酶*Nde* I和*Bam*H I识别序列。预期大小的PCR扩增产物经*Nde* I、*Bam*H I双酶切, 插入到经同样酶切处理的原核表达载体pET-28a中, 转化大肠杆菌BL21 pLysE菌株。随后经IPTG诱导表达, SDS-PAGE电泳检测表达情况。预期大小的蛋白条带切胶纯化后免疫小鼠制备抗血清, 参考Huang等^[13]的方法。

1.2.5 Western blot分析 将1.2.4中收集的香鱼血清样品通过Bradford法定量。Western blot检测方法: 电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育、显影, 详细操作参考Huang等^[13]的方法。根据Quantity One软件进行灰度值计算分析实验结果。

2 结果

2.1 香鱼*IL-12B*基因cDNA序列分析

香鱼*IL-12B*基因cDNA序列包括一个完整开放阅读框(ORF), 序列共有1 152个核苷酸组成, 预测编码一个含有303个氨基酸、分子量大小约为33.5

kDa的前体蛋白。软件分析表明, 香鱼*IL-12B*氨基酸序列的N-末端含有一个22个氨基酸残基的信号肽序列; 序列中还包含三个保守的结构域: 一个免疫球蛋白结构域(P²⁷-C⁹¹)和两个III型纤维蛋白结构域(L⁹⁸-Q²¹⁴和P²¹⁵-T³⁰²); N-端四个保守半胱氨酸残基(Cys)分别在基因序列的第46、91、121、132位, C-端有一个保守的WSXWS基序(图1)。

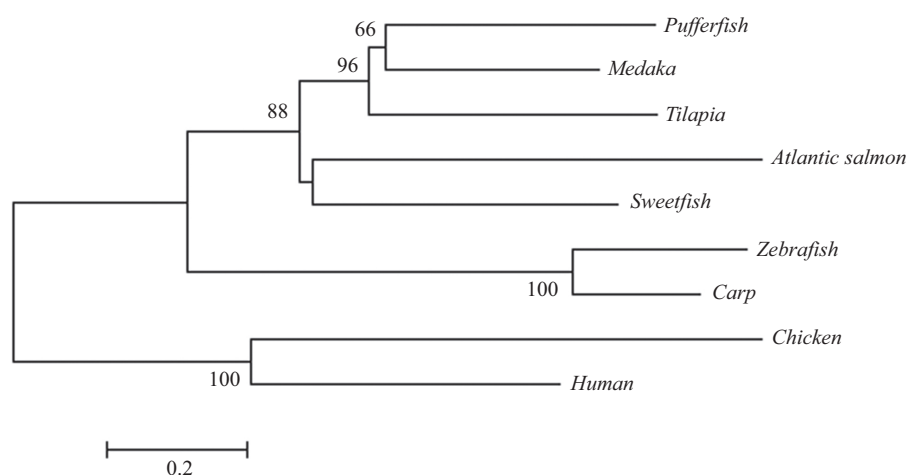
氨基酸序列分析表明, 香鱼*IL-12B*与大西洋鲑的*IL-12B*进化关系最近, 同源性为50%。在系统进化树中, 香鱼与大西洋鲑的*IL-12B*独立成簇(图2), 与哺乳动物*IL-12B*簇远缘相关。

2.2 香鱼*IL-12B*基因mRNA组织表达差异

取健康香鱼头肾、脾、脑、心、肝、肌肉、鳃和肠等组织以及外周血白细胞进行RT-qPCR分析, 实验结果表明, *IL-12B*基因mRNA主要在健康香鱼头肾和外周血白细胞中表达, 在脾、肠和鳃等组织中少量表达, 其它组织中未检测到(图3)。

2.3 鳗利斯顿氏菌感染前后香鱼*IL-12B*基因mRNA的表达差异

鳗利斯顿氏菌注射感染香鱼后, 实验组呈现出典型的细菌感染症状, 并能从内脏组织中培养出病原菌, 对照组香鱼表现正常。由于*IL-12B*在头肾组织和外周血白细胞的表达量最高(图3), 因此我们分别选取鳗利斯顿氏菌感染香鱼4, 8, 12, 24 hpi的香鱼头肾组织以及外周血白细胞, 进行Real-time qPCR分

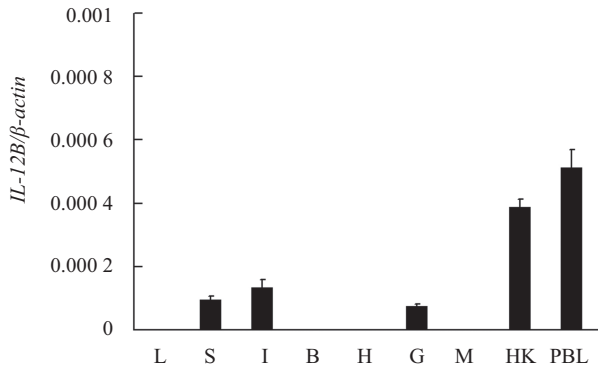


置信度数值表示1 000次重复抽样所得到的置信度百分比, 只显示置信度60%以上的数值。标尺长度表明每个位点发生0.2次置换。各物种*IL-12B*的序列登录号: 青鳉鱼: XP_004072315; 斑马鱼: XP_001341726; 其余详见图1。

The confidence value indicated the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1 000 replicates; shown only when >60%). The scale bar showed the number of substitutions per site. GenBank accession numbers of sequences: Medaka (*Oryzias latipes*): XP_004072315; Zebrafish (*Danio rerio*): XP_001341726; The others listed in Figure 1.

图2 基于NJ法构建的*IL-12B*氨基酸序列系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of the amino acid sequences of *IL-12B* using neighbor-joining method

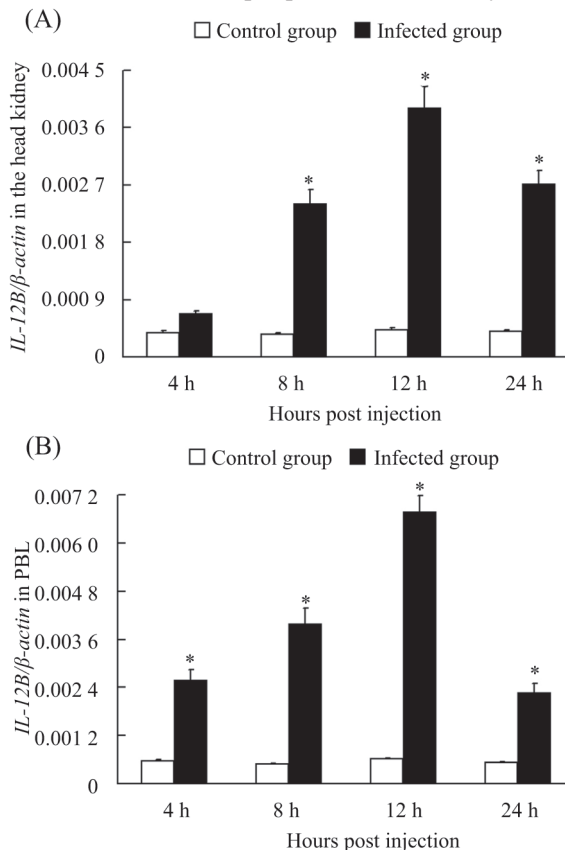


IL-12B 基因 mRNA 在健康香鱼各组织及外周血白细胞中的表达差异。L: 肝; S: 脾; HK: 头肾; B: 脑; H: 心; G: 腮; M: 肌肉; I: 肠; PBL: 外周血白细胞。

Differential expression of *IL-12B* mRNA in various tissues from healthy sweetfish. L: liver; S: spleen; HK: head-kidney; B: brain; H: heart; G: gill; M: muscle; I: intestine; PBL: peripheral blood leukocytes.

图3 香鱼 *IL-12B* 基因 mRNA 在组织及外周血白细胞中的表达特征

Fig.3 The mRNA expression patterns of sweetfish *IL-12B* in various tissues and peripheral blood leukocytes

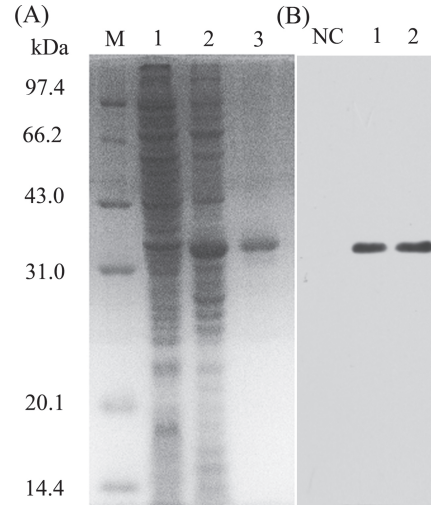


* $P < 0.05$, 与对照组比较。鳃利斯顿氏菌感染后 *IL-12B* 基因 mRNA 在香鱼头肾组织(A)和外周血白细胞(B)中的表达变化。

* $P < 0.05$ vs control group. *IL-12B* mRNA transcript changes in the head-kidney (A) and PBL (B) of sweetfish upon *L. anguillarum* infection.

图4 鳃利斯顿氏菌感染后香鱼 *IL-12B* 基因 mRNA 在头肾和外周血白细胞中的表达变化

Fig.4 *IL-12B* mRNA transcript changes in the head kidney and PBL of sweetfish upon *L. anguillarum* infection



A: *sIL-12B* 基因原核表达的 SDS-PAGE 检测。M: 低相对分子质量标准蛋白; 1: IPTG 诱导转化 pET-28a 空载体的 BL21 pLys E; 2: IPTG 诱导转化有 pET-28a-sIL-12B 重组载体的 BL21 pLys E; 3: 纯化的诱导产物。B: 检测 sIL-12B 抗血清特异性 Western blot 结果。NC: 空白阴性对照; 1: 香鱼血清; 2: 原核表达产物。

A: analysis of prokaryotic expressed *sIL-12B* by SDS-PAGE. M: protein molecular weight standards (kDa); 1: BL21 pLys E transformed pET-28a, induced by IPTG; 2: BL21 pLys E transformed pET-28a-sIL-12B, induced by IPTG; 3: purified recombinant sIL-12B; B: test antiserum by Western blot. NC: Negative control, 1: sweetfish serum, 2: recombinant sIL-12B.

图5 香鱼 *IL-12B* 基因原核表达和 Western blot 验证抗血清

Fig.5 Prokaryotic expression of sweetfish *IL-12B* and the test of anti-*IL-12B* antiserum

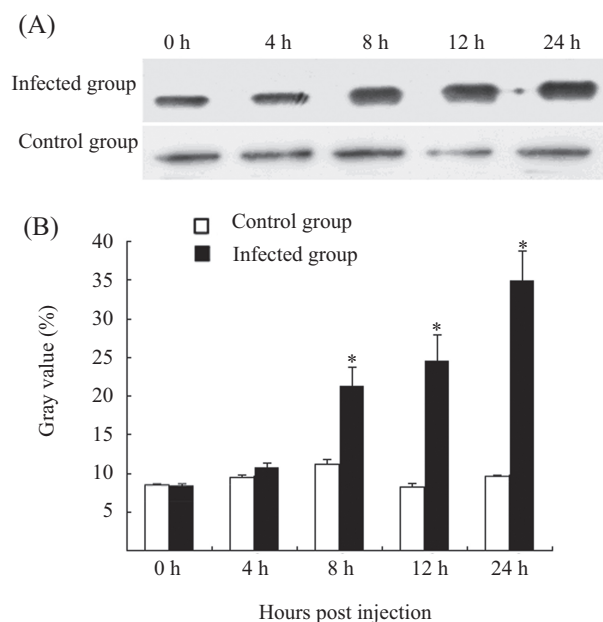
析。结果表明, 头肾中 4 hpi 时 *IL-12B* 基因 mRNA 的表达量无明显变化; 8 hpi 后, 表达量显著增加 ($P < 0.05$); 并且在 12 hpi 时, 表达量达到峰值, 为对照组的 10.31 倍(图 4 A), 而实验组外周血白细胞 *IL-12B* 基因 mRNA 表达量在 4 hpi 时就呈现显著性差异, 并在 12 hpi 时达到峰值, 为对照组的 11 倍 ($P < 0.05$, 图 4 B)。

2.4 香鱼 *IL-12B* 的原核表达和抗血清制备

经测序验证构建的原核表达质粒 pET-28a-sIL-12B 中插入的香鱼 *IL-12B* 序列无误, 重组质粒转入 BL21 pLys E 大肠杆菌, IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分析发现, 31 kDa 偏上处出现一条高表达的蛋白条带(图 5 A), 与香鱼 *IL-12B* 的预测蛋白相对分子质量大小一致(不含信号肽)。随后切胶纯化并免疫小鼠, 制备抗血清。Western blot 结果显示所制备的抗血清与香鱼血清中 *IL-12B* 特异性杂交(图 5 B)。

2.5 Western blot 检测病原感染相关的香鱼血清 *IL-12B* 含量变化

通过 Western blot 技术分析 1.2.3 中收集的各时



* $P < 0.05$, 与对照组比较。A: 感染香鱼各时段血清中IL-12B Western blot条带; B: Western blot条带灰度值分析。

* $P < 0.05$ vs control group. A: Western blot analysis of serum sweetfish IL-12B in different time points post *L. anguillarum* infection; B: Gray value analysis of serum sweetfish IL-12B based on the Western blot results shown in A.

图6 Western blot检测香鱼血清中IL-12B蛋白表达变化与鳗利斯顿氏菌感染的相关性

Fig.6 Expression changes analysis of sweetfish serum IL-12B during *L. anguillarum* infection detected by Western blot

段对照组以及实验组香鱼血清中IL-12B蛋白含量。结果显示, 分别与对照相比, 4 hpi时, 鳗利斯顿氏菌感染香鱼血清中IL-12B含量未发生明显变化; 8 hpi后含量明显增加($P < 0.05$), 并随感染时间延长, 血清中的含量持续增加, 24 hpi时为对照组的4倍(图6)。

3 讨论

IL-12(IL-12p70)是由IL-12A和IL-12B两个亚基组成的细胞因子, 具有诱导T细胞的分化和提高NK细胞分泌干扰素- γ 的能力。研究发现, 其在哺乳动物体内能够有效增强机体抗病原菌感染引起的免疫反应, 如沙门氏菌(*Salmonella species*)^[19]、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)^[20]等。本文通过香鱼巨噬细胞转录组测序首次获得香鱼*IL-12B*基因cDNA序列。序列分析揭示, 香鱼IL-12B N-端有4个保守半胱氨酸残基, C-端有WSXWS保守基序, 它与大西洋鲑的IL-12B氨基酸序列同源性最高, 为50%。系统进化树分析表明, 鱼类IL-12B独立成簇, 香鱼与大西洋鲑IL-12B进化相关性最高。组织表达特征分

析发现, *IL-12B*基因在健康香鱼头肾、外周血白细胞中表达量最高, 在脾、肠和鳃等中也有少量表达, 但在其它组织中几乎不表达, 表明*IL-12B*基因主要在鱼类免疫相关组织和细胞中表达, 这与河豚鱼^[9]、鲤鱼^[10]等鱼类中的研究结果一致。

已有的研究表明, 哺乳动物IL-12B参与病原菌感染引起的免疫反应, 例如IL-12B在鼠体内大量表达时, 对巨噬细胞有趋化作用^[7,21]; IL-12分子缺乏的情况下, IL-12B可使小鼠对鸟结核分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)感染具有短暂免疫力^[22]; 近年来, 鱼类中IL-12B的表达与细菌感染的相关性也有一些研究报道, 例如LPS刺激河豚后, *IL-12B*基因表达无明显变化^[9]; LPS刺激鲤鱼头肾巨噬细胞后, *IL-12B*基因mRNA表达上调15~300倍^[10]; 美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela* ssp. *Piscicida*)感染海鲈后12 hpi头肾组织*IL-12B* mRNA表达量显著上调, 24 hpi后恢复至正常水平, 但脾组织表达变化不显著^[11]。本研究表明, 香鱼IL-12B的表达与鳗利斯顿氏菌感染紧密相关, 实验组香鱼头肾组织和外周血白细胞的*IL-12B*基因mRNA分别在细菌感染香鱼8 hpi和4 hpi时, 表达量显著增加, 12 hpi时, 表达量达到峰值, 与海鲈感染美人鱼发光杆菌后的表达变化相似; 鳗利斯顿氏菌感染香鱼后, 血清IL-12B蛋白含量在炎症初期变化不显著, 8 hpi开始显著增加, 24 hpi达到对照的4倍, 揭示随着全身性炎症反应的加剧, 香鱼表达分泌更多的IL-12B参与免疫反应, 对抗感染。

综上, 本文对香鱼*IL-12B*基因cDNA序列、组织表达特征和感染鳗利斯顿氏菌前后香鱼*IL-12B*基因的表达变化进行了研究, 揭示了香鱼*IL-12B*基因可能参与细菌感染引起的免疫反应, 研究结果为进一步深入分析鱼类IL-12B的功能和作用机理奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Yuzhalin AE, Kutikhin AG. Interleukin-12: Clinical usage and molecular markers of cancer susceptibility. *Growth Factors* 2012; 30(3): 176-91.
- 2 Stern AS, Magram J, Presky DH. Interleukin-12 an integral cytokine in the immune response. *Life Sci* 1995; 58(8): 639-54.
- 3 Kato K, Shimozato O, Hoshi K, Wakimoto H, Hamada H, Yagita H, et al. Local production of the p40 subunit of interleukin 12 suppresses T-helper 1-mediated immune responses and prevents allogeneic myoblast rejection. *Immunology* 1995; 93(17): 9085-9.
- 4 Yoshimoto T, Wang CR, Yoneto T, Waki S, Sunaga S, Komagata

- Y, *et al.* Reduced T helper 1 responses in IL-12 p40 transgenic mice. *J Immunol* 1998; 160(2): 588-94.
- 5 Pahan K, Sheikh FG, Liu XJ, Hilger S, McKinney M, Petro TM. Induction of nitric-oxide synthase and activation of NF-kappaB by interleukin-12 p40 in microglial cells. *J Biol Chem* 2001; 276(11): 7899-905.
- 6 Jana M, Dasgupta S, Saha RN, Liu X, Pahan K. Induction of tumor necrosis factor- α (TNF- α) by interleukin-12 p40 monomer and homodimer in microglia and macrophages. *J Neurochem* 2004; 86(2): 519-28.
- 7 Ha SJ, Lee CH, Lee SB, Kim CM, Jang KL, Shin HS, *et al.* A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages. *J Immunol* 1999; 163(5): 2902-8.
- 8 Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, Jelley-Gibbs DM, Swain S, Pearl JE, *et al.* Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 2006; 203(7): 1805-15.
- 9 Yoshiura Y, Kiryu I, Fujiwara A, Suetake H, Suzuki Y, Nakanishi T, *et al.* Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics* 2003; 55(5): 296-306.
- 10 Huising MO, van Schijndel JE, Kruiswijk CP, Nabuurs SB, Savelkoul HF, Flik G, *et al.* The presence of multiple and differentially regulated interleukin-12p40 genes in bony fishes signifies an expansion of the vertebrate heterodimeric cytokine family. *Mol Immunol* 2006; 43(10): 1519-33.
- 11 Nascimento DS, do Vale A, Tomás AM, Zou J, Secombes CJ, dos Santos NM. Cloning, promoter analysis and expression in response to bacterial exposure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-12 p40 and p35 subunits. *Mol Immunol* 2007; 44(9): 2277-91.
- 12 Øvergård AC, Nepstad I, Nerland AH, Patel S. Characterisation and expression analysis of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) cytokines: IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-12 β and IFN γ . *Mol Biol Rep* 2012; 39(3): 2201-13.
- 13 黄左安, 陈 炯, 陆新江, 史雨红, 李明云. 香鱼凝血因子X基因表达与鳃利斯顿氏菌感染的相关性. 动物学研究(Huang Zuoan, Chen Jiong, Lu Xinjiang, Shi Yuhong, Li Mingyun. Alteration on the expression of ayu coagulation factor X gene upon *Listonella anguillarum* infection. *Zool Res*) 2011; 32(5): 492-8.
- 14 Nishimori E, Kita-Tsukamoto K, Wakabayashi H. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Int J Sys Evol Microbiol* 2002; 50(1): 83-9.
- 15 李长红, 陈 炯, 史雨红, 李明云. 宁海地区香鱼弧菌病原菌鉴定. 微生物学报(Li Changhong, Chen Jiong, Shi Yuhong, Li Mingyun. Characterization of *Listonella anguillarum* as the aetiological agent of vibriosis occurred in cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Ninghai country, China. *Acta Microbiol Sin*) 2009; 49(7): 931-7.
- 16 Chen J, Shi YH, Li MY, Ding WC, Niu H. Molecular cloning of liver angiotensinogen gene in ayu (*Plecoglossus altivelis*) and mRNA expression changes upon *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 24(5): 659-62.
- 17 Lu XJ, Hang XY, Yin L, He YQ, Chen J, Shi YH, *et al.* Sequencing of the first ayu (*Plecoglossus altivelis*) macrophage transcriptome and microarray development for investigation the effect of LECT2 on macrophages. *Fish Shellfish Immunol* 2013; 34(2): 497-504.
- 18 Chen J, Lu XJ, Yang HY, Shi YH. An interaction between a C-type lectin receptor and leukocyte cell-derived chemotaxin 2 of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Shellfish Immunol*. 2010; 28(1): 245-8.
- 19 Mastroeni P, Harrison JA, Chabalgoity JA, Hormaeche CE. Effect of interleukin 12 neutralization on host resistance and gamma interferon production in mouse typhoid. *Infect Immun* 1996; 64(1): 189-96.
- 20 Cooper AM, Roberts AD, Rhoades ER, Callahan JE, Getzy DM, Orme IM. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 1995; 84(3): 423-32.
- 21 Russell TD, Yan Q, Fan G, Khalifah AP, Bishop DK, Brody SL, *et al.* IL-12 p40 homodimer-dependent macrophage chemotaxis and respiratory viral inflammation are mediated through IL-12 receptor. *J Immunol* 2003; 171(12): 6866-74.
- 22 Ehlers S, Lehmann J, Mossmann H, Alber G, Hölscher C. Interleukin-12p40 mediates transient protection against *Mycobacterium avium* infection in the absence of interleukin-12. *Immunobiology* 2005; 210(2/3/4): 217-27.