

文章编号: 1674-5566(2023)03-0491-09

DOI:10.12024/jso.20220303802

## 鲤 *CISH* 基因克隆鉴定与组织特异性表达分析

杨 慧<sup>1,2</sup>, 周 杰<sup>1,2</sup>, 高 谦<sup>2,3</sup>, 刘明丽<sup>3</sup>, 翟万营<sup>3</sup>, 陈良标<sup>2,3</sup>, 谢海侠<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

**摘 要:** 克隆得到长度为 1 685 bp 的鲤 (*Cyprinus carpio*) *CISH* 基因 (Cytokine inducible SH-2 containing protein, *CISH*) 的 cDNA 全长序列, 开放阅读框 (ORF) 长 666 bp, 编码 221 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 24.91 ku。鲤 *CISH* 基因具有典型的 SOCS 家族结构特征, 含有 N 区、中央 SH2 结构域和 C 端 SOCS box 结构域。系统进化分析表明, 鲤 *CISH* 与同属鲤科的草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 的亲缘关系最近。鲤 *CISH* 基因的 mRNA 表达水平在血液中最高, 肝脏中最低。嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 刺激后, 鲤 *CISH* 基因在血液中表达量在 12~24 h 出现显著上升, 在第 48 小时恢复正常水平, 暗示鲤 *CISH* 基因在抵抗细菌感染过程中起作用。

**关键词:** 鲤; 细胞因子信号转导抑制因子; *CISH*; cDNA 全长; 组织表达

**中图分类号:** S 917 **文献标志码:** A

JAK 酪氨酸蛋白激酶-信号传导和转录激活因子 (Janus kinase-signal transducers and activators of transcription, JAK-STAT) 信号通路是动物体内普遍存在的重要细胞信号通路之一<sup>[1]</sup>, 对于调控生长因子分泌、造血、干细胞维持, 以及免疫系统中干扰素 (Interferon, IFN)、白细胞介素 (Interleukin, IL) 等细胞因子的表达具有重要作用<sup>[2-5]</sup>。细胞因子信号转导抑制因子 (Suppressor of cytokine signaling proteins, SOCS) 是一类能反馈性抑制细胞因子信号通路的负反馈 (Negative feedback) 调节因子, 特别是负调控 JAK-STAT 信号途径<sup>[6-7]</sup>, 防止因细胞因子过度表达而干扰机体正常的代谢平衡和细胞功能, 对于机体免疫应答和生长发育具有重要意义<sup>[8]</sup>。SOCS 家族成员都具有氨基酸长度不等的 N 区、中央的 SH2 结构域及 C 端 SOCS box 结构域等保守的功能结构域<sup>[9-10]</sup>。

细胞因子诱导的含 SH2 蛋白 (Cytokine inducible SH-2 containing protein, *CISH*) 是 SOCS 家族中最先被发现的成员, 当初作为由 IL-1、IL-2

和 EPO 诱导的立刻早期基因被克隆, 并由此命名<sup>[11]</sup>。哺乳类 *CISH* 是 STAT5 信号通路的负反馈调节因子, 通过其 SH2 结构域与细胞因子受体的磷酸化酪氨酸残基相结合, 从而掩盖 STAT5 的结合位点<sup>[6]</sup>。*CISH* 可抑制由不同细胞因子诱导的 STAT5, 包括促红细胞生成素 EPO 和生长激素 GH<sup>[12-13]</sup>。人 *CISH* 基因受 IL-2 诱导表达水平上调, 并通过负反馈调节相关细胞因子的信号传导, 进而调控 T 细胞分化、增殖和存活, *CISH* 基因变异直接影响人体对感染性疾病的易感性<sup>[14-16]</sup>。

在鱼类中, 斑马鱼 (*Danio rerio*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、绿河豚 (*Tetraodon nigroviridis*)、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、鲮鱼 (*Liza haematocheila*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、金鲳 (*Trachinotus ovatus*) 和黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 的 *CISH* 基因已被克隆鉴定<sup>[9-10, 17-20]</sup>。本研究克隆、鉴定鲤 *CISH* 基因, 为进一步研究鲤 *CISH* 的免疫调节功能及其与疾病易感性的关系奠定基础。

收稿日期: 2022-03-30 修回日期: 2022-05-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31272666); 国家科技支撑计划课题 (2012BAD25B0202)

作者简介: 杨 慧 (1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类免疫学。E-mail: 18771141680@163.com

通信作者: 高 谦, E-mail: qgao@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

健康鲤[体质量(200 ± 20) g]运回实验室后,于20℃左右水温驯养7 d,以备实验之用。

### 1.2 鲤总RNA提取与cDNA合成

麻醉后,尾静脉取血;解剖鱼体,每尾鱼分别取脑、鳃、心脏、头肾、肠、肝、肌肉、皮肤和脾脏组织各约200 mg,立即投入1 mL Trizol(Invitrogen)中,1.5 mL离心管置于冰上;以手持匀浆器(IKA)匀浆,按照Trizol试剂盒使用说明提取各样品总RNA。利用RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Scientific)合成鲤各组织的cDNA第一链。

参照SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)操作手册,以鲤脾脏总RNA,合成用于3'-RACE-与5'-RACE PCR的cDNA模板。具体步骤如下:取RNA 50 ng,制备5'-RACE cDNA模板时加入5' CDS和SMART II各1 μL,制备3'-RACE cDNA模板时则只加入1 μL 3' CDS,加DEPC处理水至12 μL,72℃保温3 min;立即于冰上冷却2 min,随后在各管中加入5 × buffer 4 μL、10 mmol/μL dNTP 2 μL、RNase Inhibitor 1 μL、MMLV逆转录酶1 μL,20 μL反应体系在42℃反应1 h,72℃15 min。所有cDNA样品均置于-20℃冰箱保存备用。

### 1.3 鲤CISH基因cDNA全长的扩增

#### 1.3.1 引物设计

首先根据GenBank数据库中的斑马鱼(NM\_001076617.2)、草鱼(GU384205.1)与牛(NM\_001046586.1)CISH基因的保守区域设计简并引物CISH-F与CISH-R(表1),从鲤脾脏cDNA第一链中扩增相应序列,根据测序得到的中间片段设计扩增鲤CISH基因cDNA全长的RACE PCR引物。

#### 1.3.2 鲤CISH基因中间片段的扩增

利用引物CISH-F与CISH-R,PCR扩增CISH基因的片段。取1 μL cDNA作为模板,加入10 μmol/μL的正、反向引物各1 μL,5 U/μL Premix rTaq 25 μL,加水至50 μL。PCR反应条件:94℃预变性3 min;94℃30 s,50℃30 s,72℃1 min,35个循环;72℃10 min;12℃5 min。根据琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(Omega)使用说明,回收

PCR产物中的DNA目的片段,连接pMD18-T载体(TaKaRa),转化DH5α感受态细胞,涂含氨苄(50 μg/mL)琼脂平板,培养后挑选阳性克隆,送上海生工测序。

#### 1.3.3 鲤CISH基因3'-与5'-端扩增

依据所获得的鲤CISH cDNA中间片段序列,参考SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)试剂盒的技术原理,设计合成3'-RACE和5'-RACE基因特异性引物(Gene specific primer,GSP)和接头通用引物UPM和NUP。3'-RACE基因特异性外、内侧引物分别是CISH-GSP-3和CISH-NGSP-3;用于5'-RACE的基因特异性外、内侧引物分别是CISH-GSP-5和CISH-NGSP-5。参照上述试剂盒的使用说明,依次进行Touchdown PCR和Nest PCR,50 μL Touchdown PCR体系包括:2.5 μL cDNA、5 μL 10 × UPM、1 μL 10 μmol/μL CISH-GSP-3或CISH-GSP-5、41.5 μL Master Mix;50 μL Nest-PCR体系包括:0.5 μL Touchdown PCR产物、1 μL 10 × NUP、1 μL CISH-NGSP-3或CISH-NGSP-5和47.5 μL Master Mix。

3'-RACE Touchdown PCR程序:94℃预变性3 min;94℃30 s,66℃30 s,72℃2 min,反应5个循环;94℃30 s,64℃30 s,72℃2 min,反应5个循环;94℃30 s,62℃30 s,72℃2 min,25个循环;72℃10 min;12℃5 min。Nest PCR程序:94℃预变性3 min;94℃30 s,60℃30 s,72℃2 min,35个循环;72℃10 min,12℃5 min。

5'-RACE Touchdown PCR程序:94℃预变性3 min;94℃30 s,60℃30 s,72℃40 s,7个循环;94℃30 s,58℃30 s,72℃40 s,25个循环;72℃10 min;12℃5 min。Nest PCR程序:94℃预变性3 min;94℃30 s,53℃30 s,72℃40 s,35个循环;72℃10 min,12℃5 min。

回收、连接、转化、涂含氨苄琼脂平板同上,挑选阳性克隆送上海生工测序。

### 1.4 基因序列特征分析

对所测定的中间片段及5'和3'端片段序列,使用DNAMAN软件进行拼接,获得的全长cDNA序列通过NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行Blast同源序列搜索分析;使用ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>)进行ORF预测和氨基酸序列推断;SignalP 3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

SignalP) 进行蛋白信号肽预测; SMART 和 Scan Prosite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>) 用于蛋白质结构域预测。使用 SWISS-MODEL

(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测蛋白 3D 模型。

表 1 实验中所用引物的名称与序列  
Tab.1 Primers used in experiments

引物名称 Primer	引物序列(5' - 3') Sequence(5' - 3')	用途 Application
<i>CISH</i> -F	GGGTGGCATCTCTGCCAGTGAGGCC	<i>CISH</i> 中间片段扩增
<i>CISH</i> -R	TGCTGGTGTGTTTGTGTGATGACC	<i>CISH</i> 中间片段扩增
<i>CISH</i> -GSP-3	CAGGAACAAAGGGGAGGAGAAAAG	3' RACE-PCR
<i>CISH</i> -NGSP-3	AAGCCAATCCATCGTCCTCAAGCCT	3' RACE-PCR
<i>CISH</i> -GSP-5	GCTGAGGCTTTTACTCGACTTCCA	5' RACE-PCR
<i>CISH</i> -NGSP-5	GAGCGATGGCAAACAGTCCGAGAT	5' RACE-PCR
LongUP	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC AGTGGTATCAACGCAGAGT	
ShortUP	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
RT- <i>CISH</i> -F1	ATGACGTGACTCAACTTCTG	荧光定量 PCR
RT- <i>CISH</i> -R1	CCAAGCTACGTATGTGCCTC	荧光定量 PCR
RT-Actin-F	CGACATCCGTAAGGACCTGT	荧光定量 PCR
RT-Actin-R	GCTGGAAGCTGGACAGAGAG	荧光定量 PCR

注:末尾字母为 F 表示上游引物; R 表示下游引物。

Notes: F means forward primer; R means reverse primer.

### 1.5 多重序列比对及系统进化树构建

在 GenBank 中搜索所有已知的 *CISH* 基因序列,采用 ClustalX 2.0 进行氨基酸序列多重比对。使用 MEGA 4.0 软件包,采用邻接法(Neighbor-joining method, NJ) 构建 *CISH* 基因的分子系统树,系统树各分支的相对遗传距离计算采用“Pairwise distance”,分支置信度经过 1 000 次自展重复检验。

### 1.6 鲤 *CISH* 基因组织表达分析

随机选择 5 尾约 200 g 的健康鲤,根据 1.2 节的方法制备鲤头肾、血液、脾脏、脑、肠、鳃、肌肉、心脏、皮肤和肝脏共 10 种组织的 cDNA。qRT-PCR(引物为表 1 中 *CISH*-F/R) 检测 *CISH* 基因在鲤不同组织中的表达。20  $\mu$ L RT-qPCR 反应体系包括:cDNA 模板 1  $\mu$ L, SYBR Green I 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 的正、反向引物各 1  $\mu$ L, 水 7  $\mu$ L。以  $\beta$ -actin 作为内参基因,使用 SYBR Green 染液在 CFX96 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, USA) 进行定量分析。PCR 反应程序:95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 75  $^{\circ}$ C 读板 5 s, 85  $^{\circ}$ C 读板 5 s, 40 个循环。反应结束后进行溶解曲线分析,温度区间为 65 ~ 95  $^{\circ}$ C, 每 0.5  $^{\circ}$ C 读板 5 s。每个样本重复 3 次,根据  $C_t$  (Threshold

cycles) 值 ( $15 < C_t < 35$ ), 利用公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  得出每一样本 *CISH* 基因的相对表达值。使用 GraphPad Prism 5 作图。

### 1.7 嗜水气单胞菌感染后鲤血液 *CISH* 表达水平定量

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 由本实验室保存。取保存的菌株复苏后按照体积比 1:50 加到含有 60 mL TSB (2% NaCl) 培养基中, 28  $^{\circ}$ C 振荡 (200 r/min) 培养至对数生长期, 收集菌体, 用 PBS 洗涤并配制成细菌悬液。将健康鲤分为实验组和对照组。实验组鲤腹腔注射细菌悬液的剂量为  $1.5 \times 10^6$  cfu/100 g, 对照组注射相同体积的 PBS, 于注射后的 0、3、6、24、36 和 48 h 这 6 个时间点分别从实验组和对照组采集鲤血液, 每组每个时间点取 5 条鱼。血液 RNA 提取及 cDNA 合成方法同 1.2 节。以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 使用 SYBR Green 染液在 CFX96 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, USA) 进行定量分析。方法同 1.3 节。

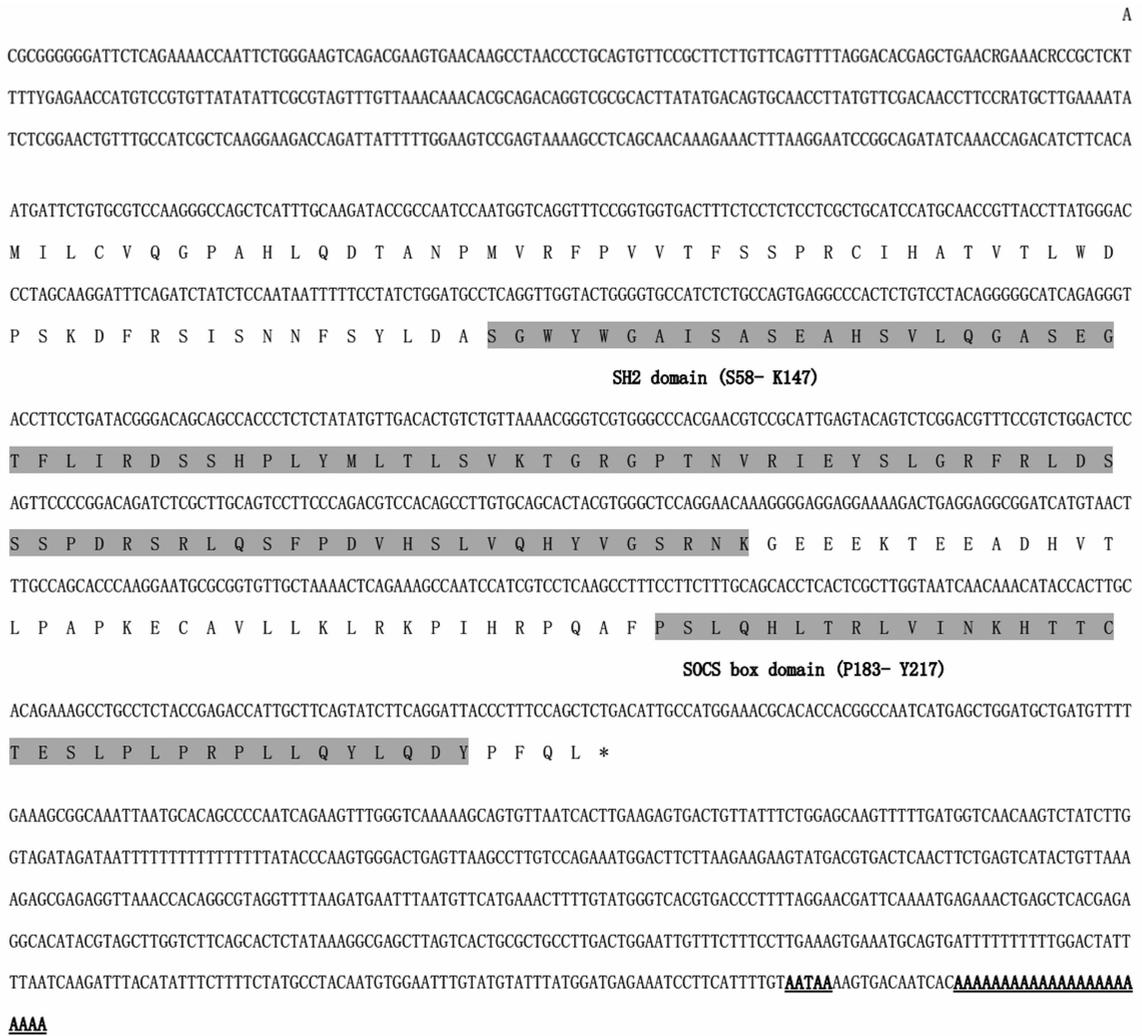
## 2 结果

### 2.1 鲤 *CISH* 基因 cDNA 全长及其序列特征

鲤 *CISH* 基因 cDNA 全长为 1 685 bp, 包括 5'

端非编码区域 (Untranslated region, UTR) 361 bp, ORF 编码区域 666 bp 和 3'端非编码区域 658 bp。其 3'端有一个“AATAA”加尾信号和保守的 Poly (A) 序列 (图 1)。ORF 编码区域编码 221 个氨基酸, Pi 软件预测所编码蛋白的分子量为 24.91 ku, 理论等电点为 8.69。SignalP 软件预测此氨基酸序列无信号肽区段, 推测其为非分泌型蛋白。

SMART 工具软件蛋白结构预测显示, CISH 蛋白具有典型的 SOCS 家族结构特征 (图 2), 包括 N 区 (a. a. 1 ~ 57)、中央 SH2 结构域 (a. a. 58 ~ 147) 和 C 端 SOCS box 结构域 (a. a. 183 ~ 217)。使用 SWISS-MODEL 构建了鲤 CISH 蛋白 3D 结构如图 3 所示。



Poly (A) 加尾信号 (AATAA) 与 poly (A) 分别用下划线及加粗字体标出。CISH 的结构域用阴影表示。“\*”指示终止密码子。The polyadenylation signal sequences (AATAA) and poly (A) were underlined and shown in bold, respectively. The CISH domains were indicated by shadowing in gray. The stop codon was indicated by using the asterisk (\*).

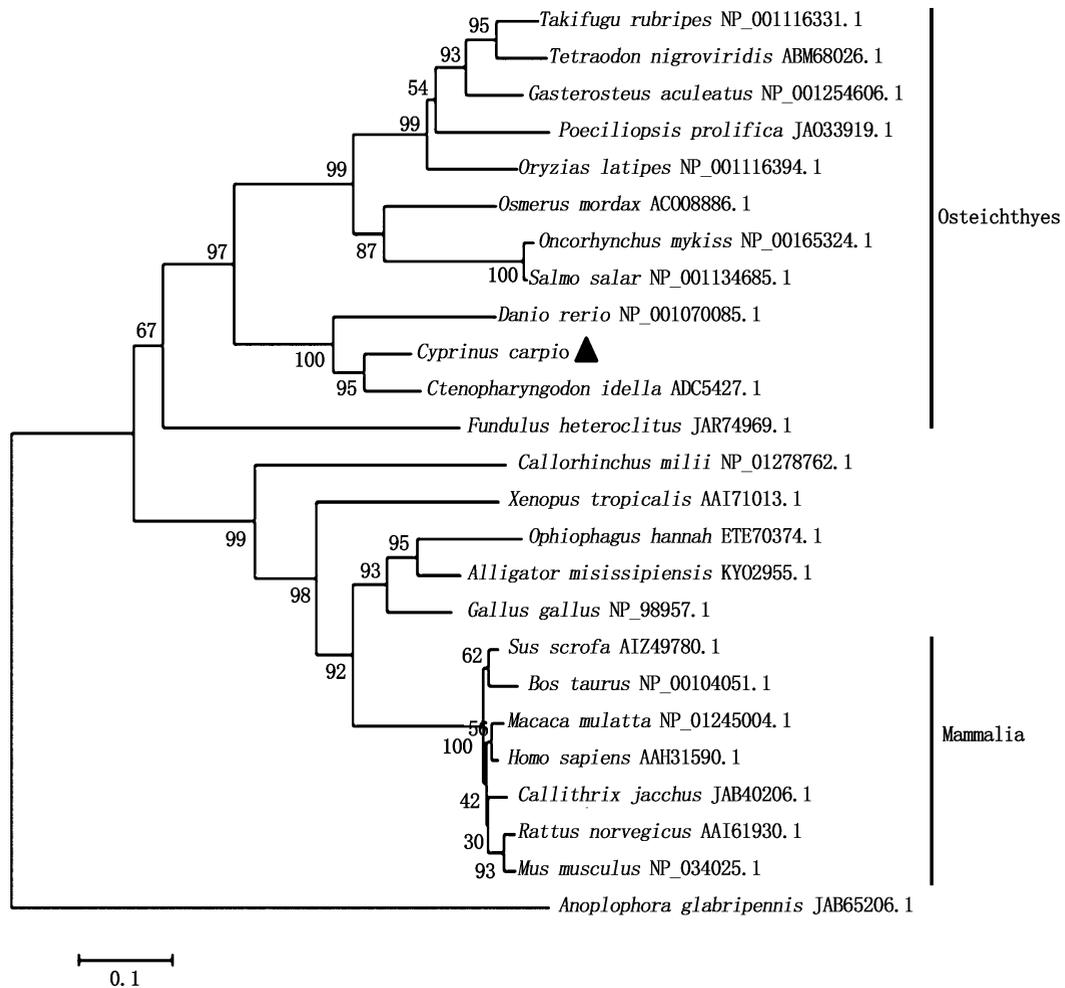
图 1 鲤 CISH 基因核苷酸及推导的氨基酸序列  
 Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Cyprinus carpio* CISH

### 2.2 基于 CISH 氨基酸序列多重比对构建的分子系统进化树

选择包括不同鱼类、两栖类和哺乳类动物的 CISH 序列 (表 2), 在使用 DNAMAN 和 ClustalX 进行氨基酸序列比对的基础上, 构建系统进化树。

结果表明: 鲤 CISH 氨基酸序列和草鱼的一致性最高 (87.4%); 其次是斑马鱼, 同一性为 72.5%; 与家鼠、猕猴和人的序列一致性相对较低 (33.62% ~ 44.19%)。鱼类 CISH 的 SH2 和 SOCS box 结构域均具有高度保守性, 尤其是 SOCS box (图





采用 ClustalX 2.0 对不同物种 CISH 的氨基酸序列进行多重比对。使用 MEGA 4.0 软件包中的邻接法 (Neighbor-joining method, NJ) 构建 CISH 的分子系统树, 系统树各分支的置信度经过 1 000 次自展重复检验。

The amino acid sequences of CISHs from various species were aligned using the ClustalX 2.0 program. The phylogenetic tree was constructed using N-J method by MEGA 4.0 program, and the bootstrap test for phylogeny was calculated with 1 000 replicates.

图 5 CISH 氨基酸序列系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of CISH proteins from various species

### 2.3 鲤 CISH 在 mRNA 水平的组织表达模式

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 在所检测的鲤 10 种组织器官中, *CISH* 基因 mRNA 均有表达 (图 6), 血液中表达水平最高, 心脏、皮肤、头肾、鳃中表达量次之, 肝脏中最低。

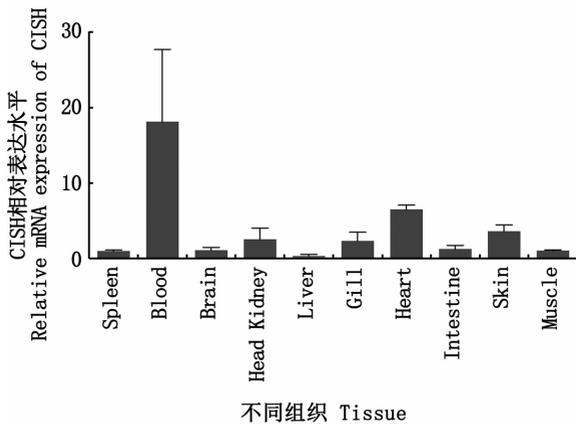
### 2.4 嗜水气单胞菌腹腔注射后鲤血液 *CISH* 基因 mRNA 表达的时间进程

定量 PCR 检测嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 刺激后不同时间点的 mRNA 表达水平, 检测结果表明, 在注射嗜水气单胞菌后第 24 小时, 鲤血液 *CISH* 基因的 mRNA 表达量显著上升, 在注射后第 48 小时恢复到正常水平 (图 7)。

## 3 讨论

哺乳类 SOCS 家族成员的结构和功能已有深入的研究, 研究<sup>[1-2, 21]</sup>表明它们参与了各种炎症和免疫反应的调控过程, 并与多种自身免疫性疾病和肿瘤的发生发展相关。但迄今对于鱼类 SOCS 家族成员, 特别是鱼类 CISH 的功能知之甚少。本研究利用同源克隆获得可能的鲤 *CISH* 基因 cDNA 全长, 氨基酸序列多重比对结果显示, 包括鲤在内所有已知的鱼类 CISH 的氨基酸序列相似率均高于 50%, 且 SH2 和 SOCS box 结构域高度保守, SOCS box 功能域的序列相似率超过 80%。

在本研究构建的系统进化树中, *CISH* 分别按鱼类、两栖类和哺乳类聚为 3 大支; 鲤 *CISH* 和草鱼 (*C. idella*)、斑马鱼 (*D. rerio*) 的系统发育关系与它们同属鲤科的物种亲缘关系相吻合; 其他鱼类 *CISH* 聚类拓扑图序也与物种亲缘关系远近相一致。可见, 通过生物信息学和系统进化分析揭示鱼类 *CISH* 蛋白在进化上具有保守性, 也初步鉴定了鲤 *CISH* 基因。

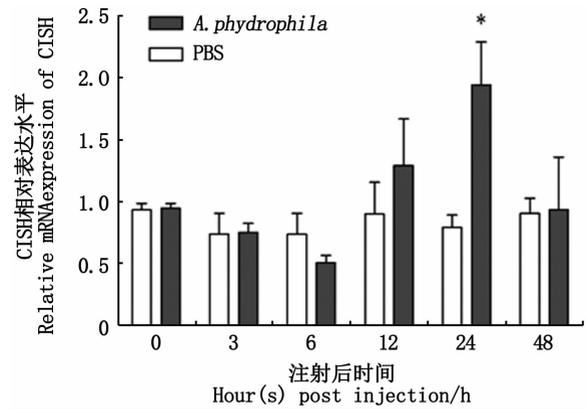


采用实时荧光定量 PCR 检测鲤 10 种组织器官中 *CISH* 在 mRNA 水平的表达情况。以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 根据  $C_t$  (Threshold cycles) 值 ( $15 < C_t < 35$ ), 利用公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  得出每一样本 *CISH* 基因的相对表达值, 将各组织中 *CISH* 的相对表达值与脾脏的相比较, 并认定脾脏中 *CISH* 的表达水平为 1.0。数据表示为 3 个平行样品的平均值  $\pm$  标准差。The mRNA expression of *Cyprinus carpio CISH* in 10 selected tissues and organs was detected by quantitative real-time PCR; Relative gene expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method with initial normalization of *CISH* against  $\beta$ -actin within each sample, then comparison of tissue expression levels with *CISH* expression in spleen (arbitrarily set at 1.0). Data represent Mean  $\pm$  SD values from three independent replications. Error bars represent SD.

图 6 鲤不同组织器官中 *CISH* 在 mRNA 水平的表达情况  
Fig. 6 Tissue transcriptional profiles of *Cyprinus carpio CISH*

根据系统发育关系, SOCS 分子被分为 2 个亚族, I 型包括 SOCS-4、SOCS-5、SOCS-5b、SOCS-6、SOCS-7、SOCS-9, II 型包括 *CISH*、SOCS-1、SOCS-2、SOCS-3a、SOCS-3b、SOCS-8<sup>[9-10]</sup>。果蝇中只存在 I 型亚族的 SOCS5、SOCS6 和 SOCS7 基因类型<sup>[11]</sup>, JIN 等<sup>[10]</sup>推测 II 型亚族可能是在无脊椎动物向脊椎动物进化过程中通过 I 型亚族成员的基因复制而产生。鱼类具有更多特有的 SOCS 分子, 其 I 型亚族中的 SOCS4、SOCS5 和 SOCS9 在系统进化树上聚为一支, SOCS6 和 SOCS7 聚为另一支; II 型亚族的 *CISH*、SOCS2 和 SOCS8 聚为一组, SOCS1 和 SOCS3a、SOCS3b 为另一组, 暗示在

鱼类进化历程中存在类似的基因复制过程<sup>[10]</sup>。斑马鱼具有 *CISHa* 和 *CISHb* 2 个旁系同源基因<sup>[17]</sup>, 虹鳟 (*O. mykiss*) 则有 *CISHa1*、*CISHa2*、*CISHb1*、*CISHb2* 4 个旁系同源物<sup>[22]</sup>。虹鳟的 4 个 *CISH* 基因在脾脏、头肾、血液、心脏中相对高表达; 用重组虹鳟白细胞介素 rIL-15 和 rIL-21 刺激虹鳟头肾白细胞, *CISHa2* 表达水平变化大, *CISHa1* 受影响较小, 推测虹鳟 *CISHa* 旁系同源物可能与 IL-15 和 IL-21 信号传导存在关联; IL-1 $\beta$ 、植物凝集素、佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸钠 (Phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) 也对虹鳟头肾白细胞中 *CISHa2* 表达产生影响, 推测 *CISHa2* 是控制头肾巨噬细胞免疫应答过程的重要旁系同源物<sup>[22]</sup>。本研究在鲤中仅克隆获得 1 个 *CISH* 基因, 鲤 *CISH* 是否有旁系同源物尚待验证。



实验组鲤腹腔注射 *A. hydrophila* 悬液, 对照组注射相同体积的 PBS。采用实时荧光定量 PCR 测定注射后 0、3、6、24、36 和 48 h 鲤血液 *CISH* 基因 mRNA 表达水平, 以  $\beta$ -actin 作为内参基因。数据表示为 3 个平行样品的平均值  $\pm$  标准差。使用配对样品的事后 Duncan 氏多重范围检验,  $P < 0.05$  (\*) 表示差异具有显著性。

*C. carpio* were injected with *A. hydrophila* or PBS (control). The *CISH* mRNA level was determined using qPCR at 0, 3, 6, 12, 24, and 48 h post-injection. Data represent mean  $\pm$  SD values from three independent replications. Error bars represent SD. The P value was calculated using post hoc Duncan's multiple range tests for paired samples, and significant differences were accepted when  $P < 0.05$  (\*).

图 7 嗜水气单胞菌刺激后鲤血液 *CISH* 基因 mRNA 表达时序

Fig. 7 The time regularity of the mRNA expression in the blood of *C. carpio CISH* in response to *A. hydrophila* challenge

绿河鲈 (*T. nigroviridis*) *CISH* 在头肾中表达水平最高, 在脾脏组织中最低<sup>[8]</sup>; 虹鳟 *CISHa1* 在血液中表达量最高, *CISHa2* 和 *CISHb1* 在肝脏中

表达量最低<sup>[22]</sup>。与虹鳟中类似,鲤 *CISH* 在血液中表达量最高,在头肾和皮肤中也有较高表达,在肝脏中表达量最低。鱼类血液中含有各种淋巴细胞、巨噬细胞等免疫相关细胞,血液中表达高暗示 *CISH* 可能在相关免疫反应过程中起作用。LPS 刺激后,绿河鲃头肾 *CISH* 的 mRNA 表达量在前期(6 h 及之前)很低,第 12 小时显著上调,第 24 小时回调到 6 h 水平<sup>[8]</sup>。虹鳟头肾 *CISHa1* mRNA 表达水平在 LPS 刺激后第 4 小时无明显变化,第 8 小时显著升高,第 24 小时达到高水平;ploy (I:C) 刺激后 *CISHa1* 表达量变化趋势与 LPS 刺激的类似<sup>[22]</sup>。细菌表面存在大量不同类型的 PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns),加之感染后病原菌在机体内增殖,其所诱导的免疫反应不同于 LPS 等单一 PAMP 的刺激。嗜水气单胞菌广泛存在于各种自然水体,能导致鱼类患细菌性败血症或局部感染。在腹腔注射人工感染后,鲤血液 *CISH* mRNA 表达量在注射后第 12、24 小时显著上调,第 48 小时表达水平恢复到正常。上述 3 种鱼类 *CISH* 的 mRNA 水平在受到病原或病原类似物免疫刺激后,均在 12~24 h 显著上调,暗示鱼类 *CISH* 可能在应对病毒或细菌感染时均起免疫调控作用。免疫刺激后鱼类 *CISH* mRNA 表达量的上调相对滞后于细胞因子,滞后时段内大量产生的鱼类细胞因子诱导 *CISH* 表达,进而负反馈调控细胞因子信号通路,抑制鱼类细胞因子过度表达,由此推测鱼类 *CISH* 在细胞因子表达调控过程中也行使负调控功能。

#### 参考文献:

- [1] HU X Y, LI J, FU M R, et al. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1): 6.
- [2] MONTERO P, MILARA J, ROGER I, et al. Role of JAK/STAT in interstitial lung diseases; molecular and cellular mechanisms [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(12): 6211.
- [3] MURRAY P J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 178(5): 2623-2629.
- [4] EZEONWUMELU I J, GARCIA-VIDAL E, BALLANA E. JAK-STAT Pathway: a novel target to tackle viral infections [J]. *Viruses*, 2021, 13(12): 2379.
- [5] WANG L, HU Y, SONG B H, et al. Targeting JAK/STAT signaling pathways in treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Inflammation Research*, 2021, 70(7): 753-764.
- [6] DURHAM G A, WILLIAMS J J L, NASIM M T, et al. Targeting SOCS proteins to control JAK-STAT signalling in disease[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2019, 40(5): 298-308.
- [7] YOSHIMURA A, ITO M, MISE-OMATA S, et al. SOCS: negative regulators of cytokine signaling for immune tolerance [J]. *International Immunology*, 2021, 33(12): 711-716.
- [8] WANG T H, GORGOGLIONE B, MAEHR T, et al. Fish suppressors of cytokine signaling (SOCS): gene discovery, modulation of expression and function[J]. *Journal of Signal Transduction*, 2011, 2011: 905813.
- [9] SONG Y J, CHENG X X, JIANG X Y, et al. Identification and expression analysis of suppressors of cytokine signaling (SOCS) from soiny mullet (*Liza haematocheila*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 102-108.
- [10] JIN H J, SHAO J Z, XIANG L X, et al. Global identification and comparative analysis of SOCS genes in fish: Insights into the molecular evolution of SOCS family [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(5): 1258-1268.
- [11] YOSHIMURA A, OHKUBO T, KIGUCHI T, et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors[J]. *The EMBO Journal*, 1995, 14(12): 2816-2826.
- [12] JEGALIAN A G, WU H. Differential roles of SOCS family members in EpoR signal transduction [J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2002, 22(8): 853-860.
- [13] MIQUET J G, SOTELO A I, BARTKE A, et al. Desensitization of the JAK2/STAT5 GH signaling pathway associated with increased CIS protein content in liver of pregnant mice[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2005, 289(4): E600-E607.
- [14] JIN P, WANG E, PROVENZANO M, et al. Molecular signatures induced by interleukin-2 on peripheral blood mononuclear cells and T cell subsets [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2006, 4(1): 26.
- [15] ANDERSON S T, BARCLAY J L, FANNING K J, et al. Mechanisms underlying the diminished sensitivity to prolactin negative feedback during lactation; reduced STAT5 signaling and up-regulation of cytokine-inducible SH2 domain-containing protein (CIS) expression in tuberoinfundibular dopaminergic neurons[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(3): 1195-1202.
- [16] KHOR C C, VANNBERG F O, CHAPMAN S J, et al. *CISH* and susceptibility to infectious diseases [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2010, 362(22): 2092-2101.
- [17] LEWIS R S, NOOR S M, FRASER F W, et al. Regulation of embryonic hematopoiesis by a cytokine-inducible SH2 domain homolog in Zebrafish [J]. *The Journal of Immunology*, 2014, 192(12): 5739-5748.
- [18] QIAO R F, XIE Y Y, LIU Y H, et al. Molecular

- characterization and expression analysis of suppressors of cytokine signalling from golden pompano (*Trachinotus ovatus*) [J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(12): 6087-6097.
- [19] XU T B, SU J G. Genome-wide identification, evolution, and transcriptome-based expression profiling analysis of suppressors of cytokine signaling (SOCS) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Aquaculture*, 2021, 536: 736484.
- [20] YE H M, ZHAO T, WU L X, et al. Molecular characterization of nine suppressors of cytokine signaling (SOCS) genes from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their changes in mRNA expression to dietary carbohydrate levels[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 906-912.
- [21] 黄元兰, 闫伟, 付兆强, 等. 细胞因子信号转导抑制因子 (SOCS) 与免疫调节[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(3): 205-210.
- HUANG Y L, YAN W, FU Z Q, et al. The suppressor of cytokine signaling and immunoregulation [J]. *Journal of Molecular Diagnostics and Therapy*, 2015, 7(3): 205-210.
- [22] MAEHR T, VECINO J L G, WADSWORTH S, et al. Four *CISH* paralogues are present in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: differential expression and modulation during immune responses and development [J]. *Molecular Immunology*, 2014, 62(1): 186-198.

## Molecular identification of cytokine inducible SH-2 containing protein (CISH) gene from common carp *Cyprinus carpio* and its expression pattern

YANG Hui<sup>1,2</sup>, ZHOU Jie<sup>1,2</sup>, GAO Qian<sup>2,3</sup>, LIU Mingli<sup>3</sup>, ZHAI Wanying<sup>3</sup>, CHEN Liangbiao<sup>2,3</sup>, XIE Haixia<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Janus kinase-signal transducers and activators of transcription (JAK-STAT) signaling pathway is one of the most important ubiquitous cell signaling pathways in animals. In vertebrates, it is mainly involved in regulating the expression and secretion of many cytokines. The members of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) family are the important JAK-STAT pathway inhibitory factors. Cytokine-induced SH-2 containing protein (CISH) is one known family members of SOCS, with its main function involved in regulating the signaling of interleukin-2. In this study, the full-length cDNA sequence of *Cyprinus carpio* *CISH* with the length of 1 685 bp was cloned. The open reading frame (ORF) was 666 bp in length and encoded 221 amino acids. The molecular weight of the deduced protein was 24.91 ku. *C. carpio* *CISH* possesses typical SOCS family structure, with three functional domains including N region, central SH2 domain and C terminal SOCS box domain, the latter two being conservatively present in *CISH* proteins of other bony fish. The phylogenetic analysis showed that the common carp *CISH* was the closest to *CISH*s of grass carp and zebrafish, which also belong to Cyprinidae. The results showed that the mRNA expression level of *C. carpio* *CISH* in blood was the highest, and the lowest expression level in liver. After being stimulated by *Aeromonas hydrophila*, the expression of *C. carpio* *CISH* in blood was up-regulated significantly at 24 h, and returned to the normal level at 48 h, suggesting that it may play an important role in the process of the resistance to bacterial infection.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; SOCS; *CISH*; full-length cDNA; tissue expression