



## 日本鳗鲡巨噬细胞移动抑制因子的基因鉴定及表达分析

武亚方<sup>1</sup>, 黄文树<sup>1,2,3</sup>, 段明珠<sup>1</sup>, 李文星<sup>1</sup>,  
熊静<sup>1,2</sup>, 梁英<sup>1,2</sup>, 黄贝<sup>1,2\*</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;

3. 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 是一类进化上古老的多功能细胞因子, 广泛分布于细菌、植物和动物中。哺乳动物 MIF 兼具酶催化活性和趋化作用, 在机体炎症反应中具有十分重要的作用。为探究 MIF 在鱼类免疫系统中的作用, 本实验利用 PCR 技术克隆获得了日本鳗鲡 MIF 基因 (*AjMIF*)。预测的 *AjMIF* 前体肽含 MIF 特征性的硫醇蛋白氧化还原酶活性基序 Cys<sub>57</sub>-Ala-Leu-Cys<sub>60</sub>, 以及异构酶活性相关的保守氨基酸残基, 如 Pro<sub>2</sub> 和 Cys<sub>81</sub> 等。荧光定量结果显示, *AjMIF* 在日本鳗鲡不同组织中均有表达, 且在肝脏中表达量最高, 其次为中肾和肠。脂多糖刺激 8 h 后, 头肾、中肾和鳃中 *AjMIF* 表达量显著上调; PolyI:C 刺激 8 h 后, 鳃、皮肤和肠中 *AjMIF* 表达量显著上调。迟缓爱德华氏菌人工感染 8 h 后, 肠和鳃中 *AjMIF* 表达量极显著上调; 感染 16 h 后, 鳃组织中 MIF 表达量显著升高; 感染 24 h 后皮肤和鳃中 MIF 基因表达量显著上调。此外, 本研究构建了 *AjMIF* 原核表达质粒, 在获得重组蛋白的基础上研究了 r*AjMIF* 异构酶活性。结果显示, 1 nmol 重组蛋白在 pH 6.2 时异构酶活性为 2.6 U, 而在 pH 8.0, 酶活性为 36.6 U。本研究结果为进一步解析 MIF 在鱼类免疫系统中的作用奠定了基础。

**关键词:** 日本鳗鲡; 巨噬细胞移动抑制因子; 组织表达; 互变异构酶活性

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

1966 年, David 和 Bloom 在活化的 T 细胞中发现一种可溶性细胞因子, 可抑制巨噬细胞的移动, 并促进巨噬细胞在 IV 型超敏反应中聚集, 故将其命名为巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF)<sup>[1-2]</sup>。进一步研究发现, 除 T 细胞外, B 细胞、单核/巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞、内分泌细胞等也可合成和储存 MIF。此外, MIF 也可储存于下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴中<sup>[3]</sup>。近年来的研究表明, 哺乳动物的 MIF 是一种多效因子, 既是重

要的细胞因子, 又具有酶活性, 还可发挥激素样物质的作用, 参与机体的生理和病理过程<sup>[2-4]</sup>。MIF 以前体肽的形式存在于细胞内, 在机体受到免疫刺激、感染或过敏性疾病时, MIF 作为前炎症细胞因子, 诱导白细胞介素 2 (Interleukin 2, IL-2)、IL-6、伽马干扰素等炎症因子的表达, 参与调节机体炎症反应<sup>[5]</sup>。MIF 亦可在多种癌症部位表达, 通过拮抗 p53 功能, 从而阻碍癌细胞凋亡<sup>[6-7]</sup>。MIF 还可作为激素样物质, 调控胰岛素及糖皮质激素等, 故与肥胖症、糖尿病及动脉粥样硬化

收稿日期: 2020-05-22 修回日期: 2020-09-09

资助项目: 福建省自然科学基金(2018J01452); 国家自然科学基金(U1805233)

通信作者: 黄贝, E-mail: huangbei@jmu.edu.cn

等代谢性疾病密切相关<sup>[8-9]</sup>。此外, MIF 具有异构酶活性, 催化 4-羟基丙酮酸的酮烯醇异构反应, 烯醇式丙酮酸在机体的糖酵解循环中起重要作用<sup>[9]</sup>。MIF 还具有氧化还原酶的活性, 协同谷胱甘肽还原胰岛素二硫键, 使胰岛素  $\beta$  链形成沉淀, 进而调节机体胰岛素的分泌和糖代谢<sup>[10-11]</sup>。因此, MIF 已经成为近年来药物研发的重要靶点<sup>[12]</sup>。

迄今为止, 研究人员已从动物、植物和细菌中克隆到 MIF, 该基因在进化上高度保守。在鱼类中, Ito 等<sup>[13]</sup>研究发现斑马鱼 (*Danio rerio*) MIF 可促进胚胎的增殖与分化; Jin 等<sup>[14]</sup>从黑青斑河鲀 (*Tetraodon nigroviridis*) 中克隆到 MIF, 发现其可抑制巨噬细胞的移动; 哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 人工感染 6 h 后, 大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 肝脏中 MIF 基因的表达量极显著上调, 在头肾中显著上调<sup>[15]</sup>; LPS 刺激 6 h 后, 日本黑鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 头肾中 MIF 极显著上调<sup>[16]</sup>; LPS 刺激 3 h 后, 黑青斑河鲀脾脏中 MIF 表达量增加, 12 h 后恢复到正常水平<sup>[14]</sup>。目前有关鱼类 MIF 的研究主要集中在免疫方面, 而有关酶学方面的研究甚少。

本研究以中国重要的养殖鱼类——日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 为对象, 在克隆获得 MIF 的基础上, 检测了正常养殖以及常见鳗鲡致病菌——迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 感染、LPS 和 PolyI:C 等刺激后, AjMIF 在日本鳗鲡体内的转录表达情况。构建了原核表达质粒并获得重组 AjMIF 蛋白, 分析了异构酶活性。研究结果为进一步阐释鱼类 MIF 的生物学功能奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及采样

日本鳗鲡 (80 ± 20)g 购于福建莆田某养殖场, 于本实验室暂养, 暂养水温为 (25 ± 1)°C。采样前用 0.05% 丁香酚麻醉。采集血液、鳃、心脏、肝脏、肠、胃、脾脏、头肾、中肾、鳔、皮肤和性腺, 用于研究日本鳗鲡 MIF (*AjMIF*) 转录子的组织分布。

**免疫刺激实验** 设 PBS 对照组、PolyI:C (1 mg/100 g, Sigma) 刺激组、LPS (1 mg/100 g, Sigma) 刺激组、迟缓爱德华氏菌感染组 (2 × 10<sup>7</sup> cfu/100 g)。采用腹腔注射, 分别于注射后 8、16、24 和 72 h 采样, 每组每个时间点随机选取鳗鲡

6 尾, 每尾鱼分别采集头肾、中肾、皮肤、肠、鳃和鳔组织, 用于研究免疫刺激、感染后 *AjMIF* 基因的表达变化。

### 1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

总 RNA 提取参照 Trizol<sup>®</sup> Reagent 试剂盒说明书。琼脂糖凝胶电泳法检测总 RNA 的完整性, 分光光度法 NanoDrop2000 (Thermo, 美国) 检测 RNA 浓度和纯度。反转录参照 GoScrip<sup>™</sup> Reverse Transcription System 试剂盒 (Promega, 美国) 说明书, 取 2  $\mu$ g 组织总 RNA 进行反转录制备模板, 并用 1 × TE buffer 稀释后, 保存于 -20 °C 备用。

### 1.3 日本鳗鲡 MIF 基因克隆

以斑马鱼 MIF 基因作为种子序列, 对日本鳗鲡基因组数据 (GenBank 登录号: AVPY000000.1) 进行比对, 根据比对结果, 利用 Primer Premier 6.0 软件设计引物 (表 1)。

以脾脏 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系: dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, 10 × EX Taq buffer 2.5  $\mu$ L, EX Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, AjMIF-F 和 AjMIF-R 引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 补充无菌水至总体积 25  $\mu$ L, PCR 反应参数: 94 °C, 3 min; 再进行 35 个循环: 94 °C, 30 s; 56 °C, 30 s; 72 °C 30 s; 循环结束后, 72 °C 延伸 7 min。

### 1.4 AjMIF 序列分析

利用 NCBI 的 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行基因同源性搜索; 利用 EXPASY 网站的 Translate 软件 (<http://web.expasy.org/translate/>) 进行蛋白质序列翻译, 氨基酸序列多重比对使用 CLUSTAL 软件。蛋白质二级结构通过 Predictprotein 软件 (<http://www.emblheidelberg.de/predictprotein/SOPMA>) 分析, 通过 SWISS-MODEL 网站 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行三维模型构建。采用 MEGA 6.0 软件的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树, 设置参数为 JTT 模型, bootstrap 值为 1 000。

### 1.5 AjMIF 转录表达研究

利用 Lightcycler 480 II PCR 仪 (Roche, 德国), 采用 Lightcycler 480 SYBR Green I 试剂盒 (Roche, 德国) 进行荧光定量 PCR, 反应体系: cDNA 模板 4  $\mu$ L, 引物 (qAjMIF-F / qAjMIF-R, 10  $\mu$ mol/L) 各 0.25  $\mu$ L, LightCycler 480 SYBR Green

表 1 本研究所用引物序列

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primer name	引物序列 primer sequences (5'-3')	用途 application
AjMIF-F	ATGCCGATGTTTCGTAGTGAACA	基因克隆 gene cloning
AjMIF-R	TCAGCCGAAGGGGGTGTAT	
qMIF-F	CCTGCGCAGTACATCGCAG	荧光定量 PCR Real time PCR
qMIF-R	CCTGCGCAGTACATCGCAG	
qAj-actin-F	TCACCACCACAGCCGAAAG	
qAj-actin-R	CGCAGGATTCCATTCCCAGG	
pET32a/MIF-F	CGGggtaccATGCCGATGTTTCGTAGTGAACA	原核表达 prokaryotic expression
pET32a/MIF-R	CGCggatccTCAGCCGAAGGGGGTGTAT	
M13F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	序列验证 sequence confirmation
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	
pET32aF	GGCCCCAAGGGGTTATGCTAGT	
pET32aR	CTGGTTCTGGCCATATGCAC	

I Master (2×)10 μL, 补充水至 20 μL。反应参数: 95 °C 变性 3 min; 再进行 45 个循环: 95 °C, 20 s; 58 °C, 20 s; 72 °C, 25 s; 荧光采集温度 80 °C 2 s; 循环结束后绘制熔解曲线, 以检验产物的特异性。

参考以往研究, 采用  $\beta$ -actin 作为内参基因<sup>[17-18]</sup>, 用已知拷贝数的 *AjMIF* 和  $\beta$ -actin 质粒, 与实验样品同时进行 PCR 扩增, 绘制相应的标准曲线, 并计算引物的扩增效率, 以及样品中 *AjMIF* 和  $\beta$ -actin 拷贝数。为减少误差, 实验以  $\beta$ -actin 基因表达量校正 *AjMIF* 基因的表达量。刺激前后 *AjMIF* 基因表达的倍数变化是以同一时间点 (实验组 *AjMIF* 基因表达量)/(对照组 *AjMIF* 基因表达量) 的值来表示<sup>[17]</sup>。

**统计分析** 采用 Excel 软件处理数据, 利用单因素方差分析法和 Student *t*-test 分析不同组织样品和免疫原刺激样品间 *AjMIF* 表达量差异。P < 0.05 表示差异显著, P < 0.01 和 P < 0.001 表示差异极显著。采用 GraphPad Prism.v 5.0 软件作图, 图示数据为平均值±标准误 (mean ± SE, n = 6)。

## 1.6 原核重组表达

以脾脏 cDNA 为模板, 以 pET32a/MIF-F 和 pET32a/MIF-R 为引物, 进行 PCR 反应, 参数: 94 °C 3 min; 35 个循环: 94 °C, 30 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 30 s; 循环结束后, 72 °C 延伸 7 min。纯化的 PCR 产物用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam*H I

于 37 °C 酶切 3 h, 利用胶回收试剂盒 (Omega, 美国) 回收酶切产物。取 7 μL 酶切产物、1 μL 酶切 pET32a 载体、1 μL T<sub>4</sub> DNA Ligase、1 μL T<sub>4</sub> DNA Ligase Buffer (TaKaRa, 日本) 混匀, 于 16 °C 连接 6 h 后, 热激转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。经阳性克隆鉴定后扩大培养, 提取重组质粒, 经双酶切鉴定和测序验证正确后, 冻存备用。

将序列和插入方向正确的重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3), 涂布于 LB 固体培养基 (含氨苄霉素, 100 μg/mL) 上, 37 °C 培养 12 h; 挑取一个单菌落接种于 1 mL LB 液体培养基 (含氨苄霉素, 100 μg/mL) 中, 37 °C、180 r/min 培养 4 h 后, 转接于 50 mL 液体培养基, 培养 3 h; 加入不同体积的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导。细菌悬液用超声波破碎 (TZL-650WK): 破碎 8 s, 间隔 9 s, 功率 30 W 破碎 20 min; 破碎产物于 4 °C, 12 000×g 离心 30 min 后, 取上清液经 HisPur™ Ni-NTA Spin column (Thermo, 美国) 纯化, 洗脱液为含 250 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液。洗脱产物透析后, 通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定产物。

## 1.7 重组蛋白质 (rAjMIF) 异构酶活性的测定

以牛血清白蛋白 (BSA) 为参比品, 用 Bradford 方法测定 rAjMIF 质量; 底物 4-羟基苯丙酮酸 (4-hydroxyphenylpyruvic acid, 4-HPP) 用 50 mmol/L 醋

酸钠溶解 (pH 6.0) 后, 4 °C 平衡 4~5 d, 使其完全呈酮式, 加入 rAjMIF 催化酮烯醇异构化反应, 并保持稳定。酶活性测定: 根据实验设计, 在 96 孔酶标板的相应孔中加入不同浓度的 rAjMIF 50  $\mu$ L, 并加入 10 mmol/L 4-羟基苯丙酮酸 100  $\mu$ L 和磷酸缓冲液 (PBS) 50  $\mu$ L, 总体系为 200  $\mu$ L。测定 OD<sub>302</sub>, 并计算酶活性及反应速率。

## 2 结果

### 2.1 日本鳎 MIF 序列分析

日本鳎 MIF (*AjMIF*) cDNA 片段长度为 615 bp, 包括开放阅读框 (open reading frame, ORF) 348 bp (base pair, bp), 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 长度为 17 bp, 3' UTR 长度为 250 bp。预测 *AjMIF* 前体肽含有 115 个氨基酸, 分子量 12.47 ku, 等电点为 6.81。该前体肽含有 MIF 特征性基序和保守的氨基酸残基, 如硫醇蛋白氧化还原酶活性的重要基序 Cys<sub>57</sub>-Ala-Leu-Cys<sub>60</sub>, 以及异构酶活性相关的位置保守的氨基酸残基 Pro<sub>2</sub>、Lys<sub>32</sub>、Ile<sub>65</sub>、Cys<sub>81</sub>、Tyr<sub>96</sub>和 Asn<sub>98</sub>。基因结构分析结果显示, *AjMIF* 由 3 个外显子编码, 外显子长度分别为 106、175 和 67 bp, 其间隔的 2 个内含子长度分别为 1 133 和 372 bp (图 1)。

蛋白结构分析结果显示, *AjMIF* 蛋白质含有 2 个反平行  $\alpha$ -螺旋和 6 个  $\beta$ -折叠, 从 N-端到 C-端排列为  $\beta$ 1- $\alpha$ 1- $\beta$ 2- $\beta$ 3- $\alpha$ 2- $\beta$ 4- $\beta$ 5- $\beta$ 6。在 6 个  $\beta$  链中的 4 个 ( $\beta$ 1、 $\beta$ 2、 $\beta$ 4、 $\beta$ 5) 形成一个片层, 其上有 2 个上旋的  $\alpha$ -螺旋 (图 2, 图 3)。以人 MIF (GenBank 登录号: CAG28572.1) 为参考, 对 *AjMIF* 进行三维模型构建 (图 2), 结果显示, *AjMIF* 三聚体是以 3 个中心  $\beta$  片层围绕形成的一个桶形通道。

选取草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、斑马鱼等硬骨鱼类 MIF 与日本鳎 MIF 进行氨基酸序列相似性比较, 结果显示, 日本鳎 MIF 与斑点叉尾鲷同源物氨基酸序列的同一性达 85.22%; 与草鱼、大西洋鲑和斑马鱼的 MIF 分别为 84.35%、81.74% 和 79.13%。序列多重比对结果显示, 硬骨鱼类 MIF 含有 3 个位置保守的 Cys 残基, 其中, 第 1 个与第 2 个保守 Cys 残基组成 C<sub>57</sub>ALC<sub>60</sub> 基序。第 3 个位置保守的 Cys<sub>81</sub> 存在于大多数硬骨鱼类 MIF 中。在脊椎动物 MIF 中, 有 18 个位置保守的氨基酸残基, 与

MIF 异构酶催化活性相关, 而在日本鳎 MIF 中发现了其中的 15 个氨基酸残基 (图 3)。

系统进化分析结果显示, 哺乳动物与鱼类的 MIF 分别聚成簇, 其中日本鳎与斑点叉尾鲷聚为一支, 然后与鲤形目 (Cypriniformes) 鱼类, 包括斑马鱼、鲤 (*Cyprinus carpio*) 和草鱼 MIF 聚为一支; 最后与大西洋鲑、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、白斑狗鱼 (*Esox lucius*)、大唇朴丽鱼 (*Haplochromis chilotes*) 和大黄鱼 MIF, 以及鲈形目 (Tetraodontiformes) 的红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、黑青斑河鲀 MIF 共同构成了硬骨鱼类 MIF 簇 (图 4)。

### 2.2 *AjMIF* 转录子的组织分布

本研究利用荧光定量 PCR 检测了日本鳎各组织 *AjMIF* 基因的表达分布。结果显示, 所检测组织/器官中, *AjMIF* 均有不同程度的转录表达。其中, 肝脏中表达量最高, 约为  $\beta$ -actin 的 63.68 ( $\times 10^{-3}$ ) 倍, 显著高于其他组织; 其次是中肾、肠道和皮肤, 其他组织中表达量较低 (图 5)。

### 2.3 免疫刺激后 *AjMIF* 基因的转录表达变化

迟缓爱德华氏菌感染 8 h 后, 日本鳎肠和鳃中 *AjMIF* 基因转录表达量极显著上调 ( $P < 0.001$ ), 分别为对照组的 3.98 倍和 2.08 倍 (图 6); 感染 16 h 后, 鳃组织中 *AjMIF* 的表达量显著上调 ( $P < 0.05$ ); 感染 24 h 后, 皮肤和鳃组织中 *AjMIF* 的表达量极显著上调 ( $P < 0.01$ ), 此时在皮肤中的上调倍数达到最高, 为 3.47 倍; 感染 3 d 后, *AjMIF* 在头肾中极显著上调 ( $P < 0.01$ )。

LPS 刺激 8 h 后, 日本鳎中肾、鳃、头肾和皮肤中 *AjMIF* 表达量显著上调 ( $P < 0.05$ ), 与对照组相比, 上调倍数分别为 3.35、2.65、1.49 和 1.27 倍 (图 7); 刺激 16 h 后, 皮肤中 *AjMIF* 表达量显著下调 ( $P < 0.05$ ); 刺激 3 d 后, 肠组织中 *AjMIF* 表达量显著上调 ( $P < 0.05$ )。

PolyI:C 刺激 8 h 后, 日本鳎肠、皮肤和鳃中的 *AjMIF* 表达量显著上调 ( $P < 0.05$ ), 分别为对照组的 2.96、3.08 和 1.74 倍 (图 8); 刺激后 16 h, 皮肤中 *AjMIF* 表达量极显著上调 ( $P < 0.01$ ), 而头肾中 *AjMIF* 表达量极显著下调 ( $P < 0.001$ ); 刺激后 24 h, 皮肤和肠组织中 *AjMIF* 表达量显著上调, 皮肤组织中 *AjMIF* 表达量此时上调倍数达到最大值, 为对照组的 3.24 倍 ( $P < 0.01$ ); 而头肾和中肾组织中 *AjMIF* 表达量显著下调 ( $P <$





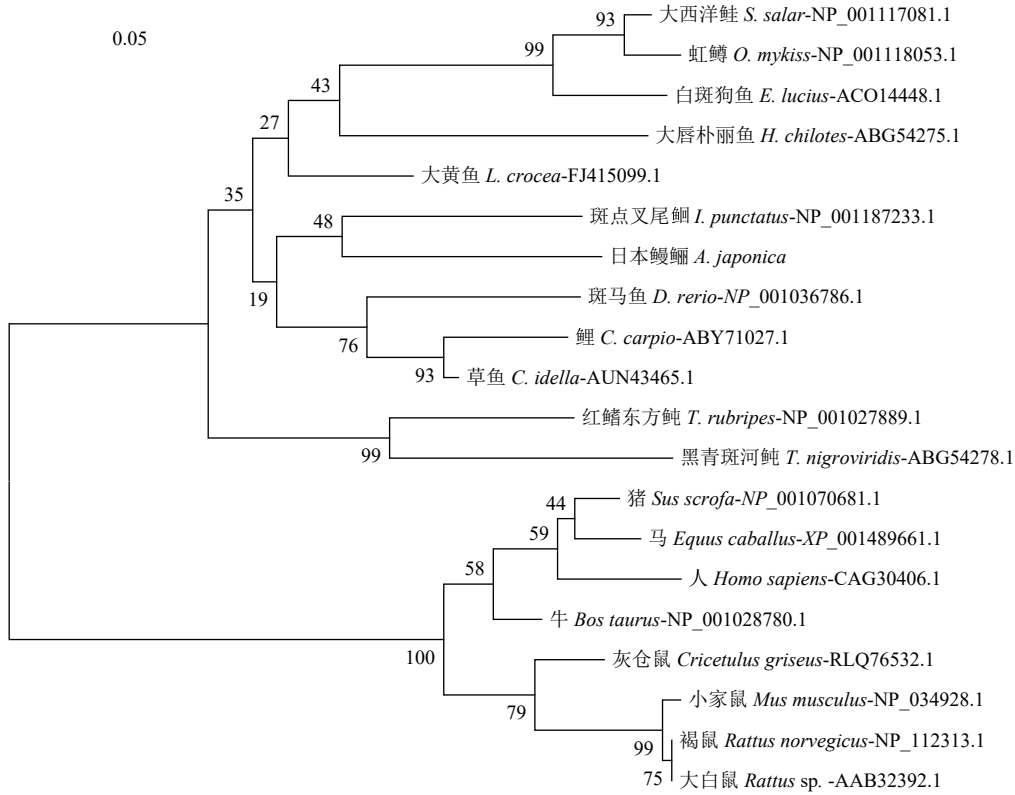


图 4 脊椎动物 MIF 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of vertebrate MIF

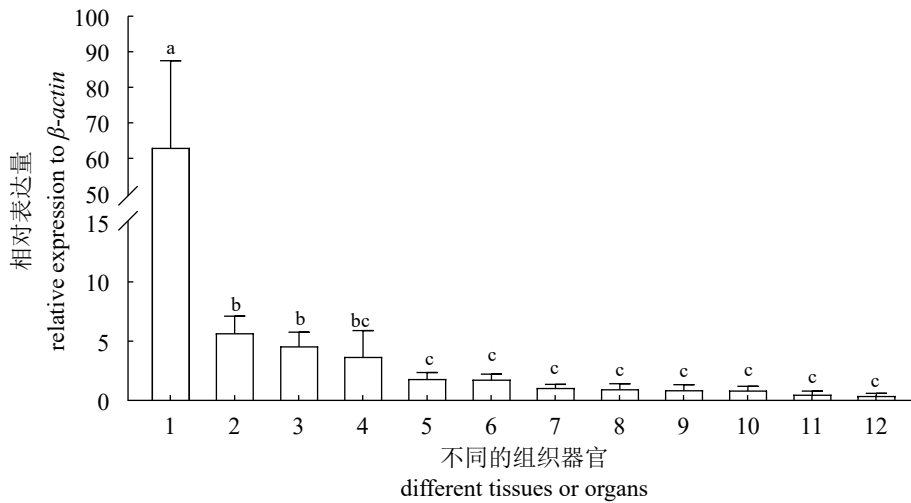


图 5 AjMIF 基因在健康日本鳗鲡不同组织/器官中的相对表达量

β-actin 为内参基因。1. 肝脏, 2. 中肾, 3. 肠道, 4. 皮肤, 5. 头肾, 6. 鳔, 7. 鳃, 8. 心脏, 9. 性腺, 10. 胃, 11. 血液, 12. 脾脏

Fig. 5 Expression of AjMIF in different tissues /organs of A. japonica

β-actin served as an internal control. 1. liver, 2. middle kidney, 3. intestine, 4. skin, 5. head kidney, 6. swim bladder, 7. gill, 8. heart, 9. gonad, 10. stomach, 11. blood, 12. spleen

通道<sup>[21]</sup>。在哺乳动物中的研究表明, 单体间的结合作用主要涉及两个关键区域的氨基酸残基, 包括单体 β3 区以及 MIF 羧基端的第 105~114 位氨基酸<sup>[22]</sup>。对 MIF 羧基端区域进行插入突变或

缺失突变后, MIF 的酶促活性以及 MIF 介导的巨噬细胞活化被抑制<sup>[23-25]</sup>。氨基酸序列比对结果显示, AjMIF 与其他脊椎动物 MIF 的 β3 和羧基端具有较高的相似性, 推测 AjMIF 的作用机理

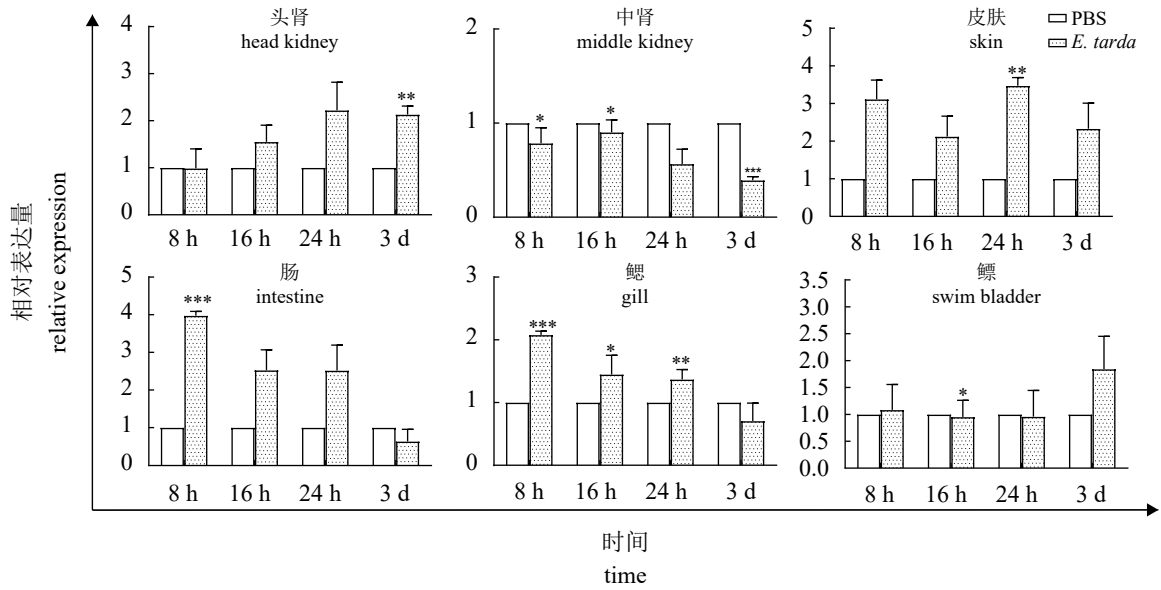


图 6 迟缓爱德华氏菌感染后, 日本鳗鲡不同组织 *AjMIF* 的表达变化

荧光定量检测腹腔注射迟缓爱德华氏菌 8 h、16 h、24 h 和 3 d 后日本鳗鲡的头肾、中肾、皮肤、肠、鳃和鳔组织中 *AjMIF* 表达变化;  $\beta$ -actin 为内参基因; 星号表示感染组和对照组存在显著性差异 (\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ ), 下同

Fig. 6 Expression change of *AjMIF* in tissues / organs of *A. japonica* infected with *E. tarda*

Fish were injected intraperitoneally with *E. tarda*. Tissues / organs, including head kidney, middle kidney, skin, intestine, gill and swim bladder were collected at 8 h, 16 h, 24 h and 3 days post injection for expression analysis.  $\beta$ -actin served as an internal control. The asterisk (\*) indicates the significant difference between the challenged group and control groups, the same below

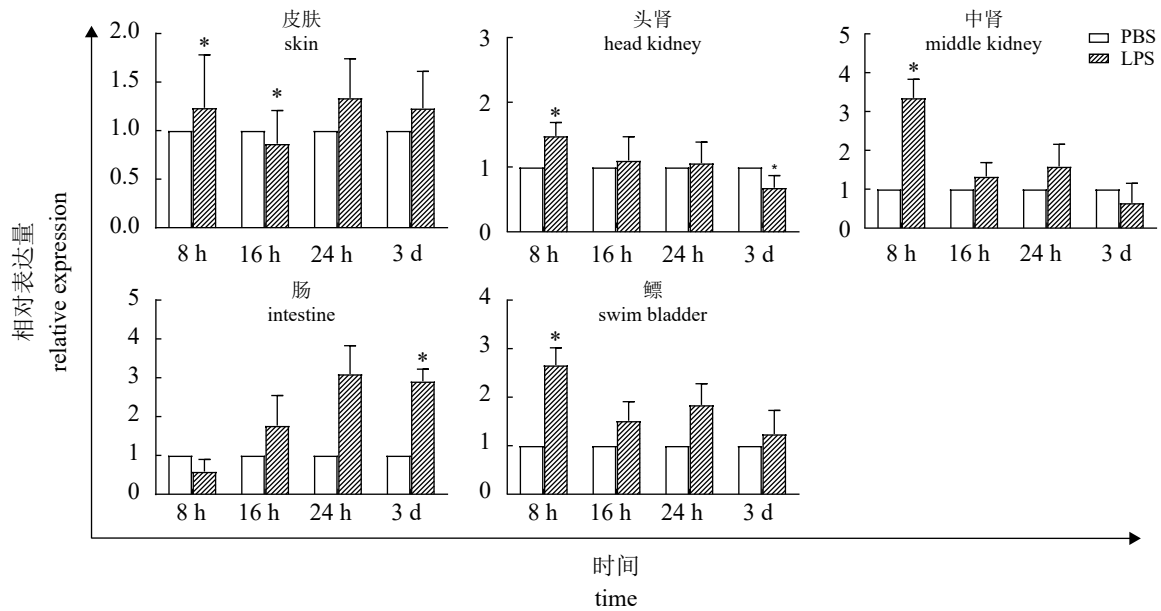


图 7 LPS 刺激后日本鳗鲡不同组织 *AjMIF* 的表达变化

荧光定量 PCR 检测腹腔注射 LPS 8 h、16 h、24 h 和 3 d 后日本鳗鲡的皮肤、头肾、中肾、肠和鳔组织中 *AjMIF* 的表达变化

Fig. 7 Expression change of *AjMIF* in tissues / organs of *A. japonica* following LPS stimulation

Fish were injected intraperitoneally with LPS and tissues / organs, including skin, head kidney, middle kidney, intestine and swim bladder were collected at 8 h, 16 h, 24 h and 3 days post injection for expression analysis

类似于高等哺乳动物。在后续的研究中, 可利用 X 光衍射或冷冻电镜技术等对其分子结构与

作用机制进一步解析和验证。在哺乳动物中, MIF 具有硫醇蛋白氧化还原酶活性和互变异构酶



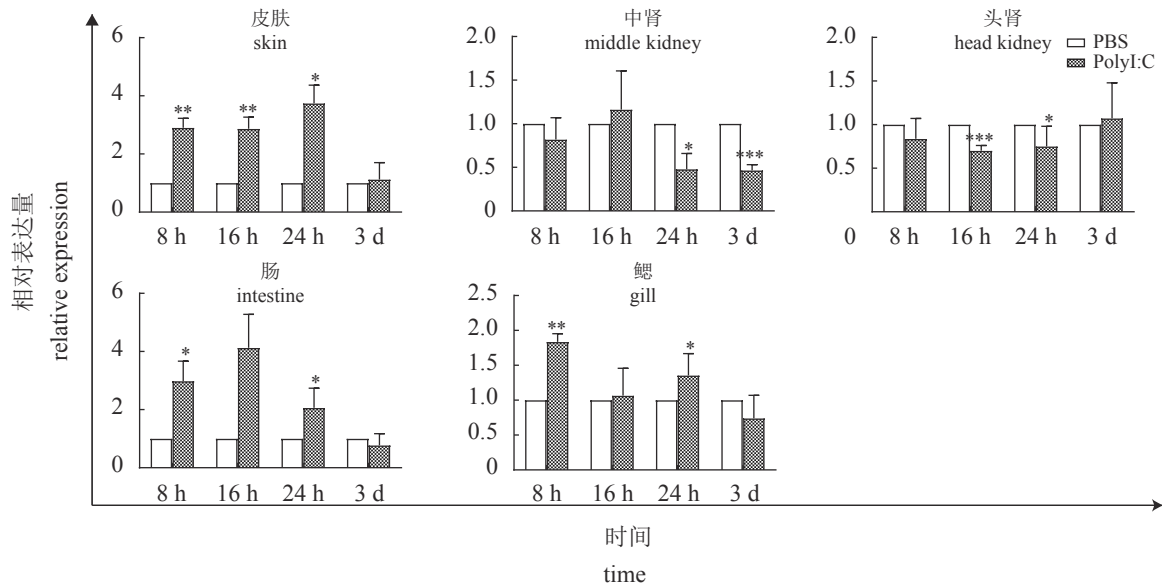


图 8 PolyI:C 刺激后日本鳗鲡不同组织 *AjMIF* 的表达变化

荧光定量检测腹腔注射 PolyI:C 8 h、16 h、24 h 和 3 d 后日本鳗鲡的皮肤、中肾、头肾、肠和鳃组织中 *AjMIF* 的表达变化

Fig. 8 Expression change of *AjMIF* in tissues / organs of *A. japonica* challenged with PolyI:C

Fish were injected intraperitoneally with PolyI:C and tissues, including skin, middle kidney, head kidney, intestine and gill were collected at 8 h, 16 h, 24 h and 3 days post injection for expression analysis

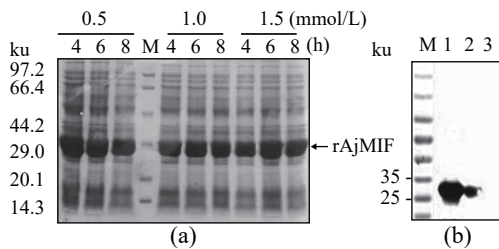


图 9 IPTG 浓度和诱导时间对 rAjMIF 表达的影响  
(a) 和 Western-blot 检测 rAjMIF 重组蛋白 (b)

M. 预染蛋白 Marker; 1. 上清液; 2. 沉淀; 3. pET32a 空载体

Fig. 9 Analysis of rAjMIF expression in different temperatures and different IPTG concentration by SDS-PAGE (a) and Western blot (b)

M. protein Ladder marker; 1. supernatant of rAjMIF; 2. precipitation of rAjMIF; 3. empty vector of pET32a

活性<sup>[10, 26-27]</sup>。其中硫醇蛋白氧化还原酶活性主要由位于第 57~60 位的 CXXC 基序介导, 该基序位于 JAB1 结合位点中<sup>[28]</sup>。CXXC 基序中的 2 个半胱氨酸可形成可逆的分子内二硫键, 对于 MIF 的三级结构极为重要。C<sub>60</sub> 突变后将导致 MIF 折叠发生改变<sup>[29]</sup>。MIF 成熟肽的第 1 位脯氨酸对其互变异构酶活性催化至关重要, 该位点极为保守。在 *AjMIF* 前体肽含有 C<sub>57</sub>ALC<sub>60</sub> 基序和异构酶活性相关的氨基酸残基, 推测 *AjMIF* 可能参与 JAB 通路的免疫调节, 并具有与哺乳动物

MIF 类似的异构酶催化活性。

Rosengren 等<sup>[10]</sup>以 p-HPP 为底物, 研究了人 MIF 的异构酶活性, 发现人 MIF 异构酶活性的反应速率可以达到 3.90 mmol/(L·mg·min)。截至目前, 有关鱼类 MIF 异构酶催化活性的研究较少。本研究构建了日本鳗鲡 *AjMIF* 原核表达质粒, 并实现可溶性原核表达。本研究所选用的 pET32a 表达载体中带有氨基端硫氧还原蛋白编码的标签序列, 有助于增加表达蛋白的溶解性。此外, 选用的表达菌株 DE3 可增加蛋白质二硫键的形成, 有助于可溶性蛋白的生成。并利用较低的 IPTG 诱导浓度, 有利于蛋白质有条件的正确折叠<sup>[30-31]</sup>。在获得重组 *AjMIF* 蛋白的基础上, 以 4-HPP 为底物分析了 rAjMIF 异构酶活性。研究结果显示 rAjMIF 蛋白具有异构酶活性, 且 pH 显著影响其酶活性。但是, 与人 MIF 相比, rAjMIF 的异构酶活性偏低, 其平均反应速率为 2.20 mmol/(L·mg·min)。在高等脊椎动物 MIF 中, 有 18 个位置保守的氨基酸残基与 MIF 异构酶催化活性相关, 而日本鳗鲡中仅发现了其中的 15 个氨基酸残基。rAjMIF 的异构酶活性偏低是否与其所含有的异构酶活性相关的保守氨基酸数偏低有关, 有待今后进一步研究。

已有的研究结果显示, 鱼类 *MIF* 基因的组

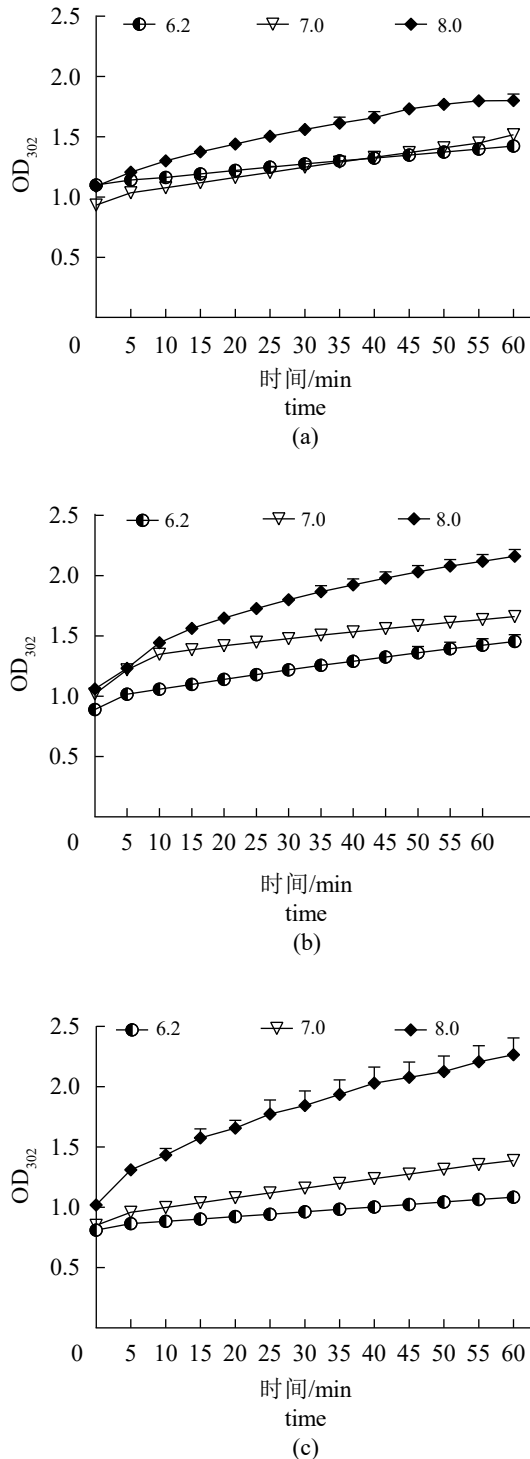


图 10 rAjMIF 异构酶活性的测定

(a) rAjMIF 蛋白量 0.2 nmol; (b) rAjMIF 蛋白量 1.0 nmol; (c) rAjMIF 蛋白量 2.0 nmol

Fig. 10 Hydroxyphenylpyruvate tautomerase activity of rAjMIF

(a) 0.2 nmol of rAjMIF; (b) 1.0 nmol of rAjMIF; (c) 2.0 nmol of rAjMIF

织表达模式复杂多样。大黄鱼 *MIF* 在脑中表达量最高，肝脏和鳃中次之，在肌肉、胃中表达

<https://www.china-fishery.cn>

量最低<sup>[15]</sup>；舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) *MIF* 在胸腺、头肾中表达量较高，肌肉中表达量最低<sup>[18]</sup>；在日本黑鲈中，*MIF* 在肝脏中表达量最高<sup>[16]</sup>；本研究结果显示，日本鳗鲡 *MIF* 在肝脏、头肾、中肾、鳃、肠道、肌肉等组织中广泛表达，但是，以肝脏中表达量最高，其次是中肾、肠，而脾脏中表达量最低。此外，不同免疫刺激物对鱼类 *MIF* 基因表达的影响不同。哈维氏弧菌可显著增强大黄鱼肝脏中 *MIF* 基因的表达，而在头肾中的表达量微量上调<sup>[15]</sup>；LPS 刺激可诱导日本黑鲈头肾 *MIF* 表达量上调<sup>[16]</sup>；而在黑青斑河鲀中，LPS 刺激 3 h 后，其脾脏中 *MIF* 开始上调，12 h 后缓慢恢复正常水平<sup>[14]</sup>，表明鱼类 *MIF* 参与了机体的抗病免疫应答。本研究较系统地比较了病原菌、LPS 和 PolyI:C 刺激日本鳗鲡后，不同时间点、不同组织中 *MIF* 基因表达量出现显著改变，但是模式较为复杂多样，推测不同的诱导剂或不同的剂量对 *MIF* 基因的诱导表达作用不同，其具体作用机制还有待于进一步研究。

#### 参考文献 (References):

- [1] Bloom B R, Bennett B. Mechanism of a reaction *in vitro* associated with delayed-type hypersensitivity[J]. *Science*, 1966, 153(3731): 80-82.
- [2] David J R. Delayed hypersensitivity *in vitro*: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1966, 56(1): 72-77.
- [3] Liu Y C, Tsai Y H, Tang S C, *et al.* Cytokine MIF enhances blood-brain barrier permeability: impact for therapy in ischemic stroke[J]. *Scientific reports*, 2018, 8(1): 743.
- [4] Bozza M T, Lintomen L, Kitoko J Z, *et al.* The role of MIF on eosinophil biology and eosinophilic inflammation[J]. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 2020, 58(1): 15-24.
- [5] Stosic-Grujicic S, Stojanovic I, Nicoletti F. MIF in autoimmunity and novel therapeutic approaches[J]. *Autoimmunity reviews*, 2009, 8(3): 244-249.
- [6] Zhang M, Li Z F, Wang H F, *et al.* MIF promotes perineural invasion through EMT in salivary adenoid cystic carcinoma[J]. *Molecular carcinogenesis*, 2019, 58(6): 898-912.

- [ 7 ] Wang D, Wang R Z, Huang A P, *et al.* Upregulation of macrophage migration inhibitory factor promotes tumor metastasis and correlates with poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncology reports*, 2018, 40(5): 2628-2636.
- [ 8 ] Kim B S, Pallua N, Bernhagen J, *et al.* The macrophage migration inhibitory factor protein superfamily in obesity and wound repair[J]. *Experimental & molecular medicine*, 2015, 47(5): e161.
- [ 9 ] Ahmed M, Miller E. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the development and progression of pulmonary arterial hypertension[J]. *Global cardiology science & practice*, 2018, 2018(2): 14.
- [10] Rosengren E, ÅmanAman P, Thelin S, *et al.* The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase[J]. *FEBS letters*, 1997, 417(1): 85-88.
- [11] Kleemann R, Mischke R, Kapurniotu A, *et al.* Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in cellular redox processes[J]. *FEBS letters*, 1998, 430(3): 191-196.
- [12] Hoi A Y, Iskander M N, Morand E F. Macrophage migration inhibitory factor: a therapeutic target across inflammatory diseases[J]. *Inflammation & allergy drug targets*, 2007, 6(3): 183-190.
- [13] Ito K, Yoshiura Y, Ototake M, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is essential for development of zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Developmental and comparative immunology*, 2008, 32(6): 664-672.
- [14] Jin H J, Xiang L X, Shao J Z. Molecular cloning and identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in teleost fish[J]. *Developmental and comparative immunology*, 2007, 31(11): 1131-1144.
- [15] Mao Y, Xu B, Su Y Q, *et al.* Cloning and mRNA expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2010, 29(3): 63-73.
- [16] Xu F, Shi Y H, Chen J. Characterization and immunologic functions of the macrophage migration inhibitory factor from Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus*[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2019, 86: 947-955.
- [17] Huang W S, Duan L P, Huang B, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) family in arthropods: Cloning and expression analysis of two MIF and one D-dopachrome tautomerase (DDT) homologues in mud crabs, *Scylla paramamosain*[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2016, 50: 142-149.
- [18] Buonocore F, Randelli E, Facchiano A M, *et al.* Molecular and structural characterisation of a macrophage migration inhibitory factor from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2010, 136(3-4): 297-304.
- [19] Wasiel A A, Rozeboom H J, Hauke D, *et al.* Structural and functional characterization of a macrophage migration inhibitory factor homologue from the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus*[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(35): 7572-7581.
- [20] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity[J]. *Nature reviews Immunology*, 2003, 3(10): 791-800.
- [21] Sun H W, Bernhagen J, Bucala R, *et al.* Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(11): 5191-5196.
- [22] El-Turk F, Fauvet B, Ashrafi A, *et al.* Characterization of molecular determinants of the conformational stability of macrophage migration inhibitory factor: leucine 46 hydrophobic pocket[J]. *PloS one*, 2012, 7(9): e45024.
- [23] El-Turk F, Cascella M, Ouertatani-Sakouhi H, *et al.* The conformational flexibility of the carboxy terminal residues 105-114 is a key modulator of the catalytic activity and stability of macrophage migration inhibitory factor[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(40): 10740-10756.
- [24] Bendrat K, Al-Abed Y, Callaway D J, *et al.* Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(49): 15356-15362.
- [25] Mischke R, Gessner A, Kapurniotu A, *et al.* Structure activity studies of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) reveal a critical role for its carboxy terminus[J]. *FEBS letters*, 1997, 414(2): 226-232.
- [26] Rosengren E, Bucala R, Aman P, *et al.* The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction[J]. *Molecular Medicine*, 1996, 2(1): 143-149.
- [27] Kleemann R, Kapurniotu A, Frank R W, *et al.* Disulfide

- analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase[J]. *Journal of molecular biology*, 1998, 280(1): 85-102.
- [28] Kleemann R, Hausser A, Geiger G, *et al.* Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1[J]. *Nature*, 2000, 408(6809): 211-216.
- [29] Burger-Kentischer A, Finkelmeier D, Thiele M, *et al.* Binding of JAB1/CSN5 to MIF is mediated by the MPN domain but is independent of the JAMM motif[J]. *FEBS letters*, 2005, 579(7): 1693-1701.
- [30] Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Maekawa T, *et al.* Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin[J]. *The Journal of biological chemistry*, 1995, 270(43): 25328-25331.
- [31] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. *Current opinion in biotechnology*, 1999, 10(5): 411-421.

## Characterization and expression analysis of *MIF* gene from *Anguilla japonica*

WU Yafang<sup>1</sup>, HUANG Wenshu<sup>1,2,3</sup>, DUAN Mingzhu<sup>1</sup>, LI Wenxing<sup>1</sup>,  
XIONG Jing<sup>1,2</sup>, LIANG Ying<sup>1,2</sup>, HUANG Bei<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Engineering Research Center of the Modern Industry Technology for Eel, Ministry of Education, Xiamen 361021, China;

3. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is evolutionarily ancient and has been found across kingdoms including animals, plants and bacteria. In mammals, MIF has been suggested as chemokine-like cytokine with enzymatic activities, which plays a critical role in inflammatory response against pathogen infections. In this study, we cloned a MIF-like (named after *AjMIF*) gene for the first time in Japanese eel, *Anguilla japonica*. The *AjMIF* precursor processes MIF signature sequence motif, Cys<sub>57</sub>-Ala-Leu-Cys<sub>60</sub>, for its thiol-protein oxidoreductase activity, and several conserved residues which are critical for its isomerase activity, such as Pro<sub>2</sub> and Cys<sub>81</sub>. Expression analysis showed that *AjMIF* is expressed in various organs / tissues with the highest in liver, followed by middle kidney and intestine. The expression level of *AjMIF* was significantly increased in head kidney, middle kidney and swim bladder after challenged with lipopolysaccharides at 8 hours post-injection (hpi). Significant increase in *AjMIF* expression was also observed in gill, skin and intestine at 8 hpi following stimulation with polyinosinic-polycytidylic acid. In addition, significant increase of *AjMIF* mRNA in gill and intestine was observed at 8 hpi, and in gill at 16 and 24 hpi, and in skin at 24 hpi when infected with *Edwardsiella tarda*. Furthermore, pH-dependent tautomerase activity of *AjMIF* has also been found by a recombinant r*AjMIF* using a prokaryotic expression system. Our results showed that 1 nmol of r*AjMIF* exhibited 2.6 U of tautomerase activity at pH 6.2, but 36.6 U at pH 8.0. Overall, our study provides a basis for future research aiming at a better understanding the functions of *MIF* in fish immune system.

**Key words:** *Anguilla japonica*; MIF; tissue expression; tautomerase activity

**Corresponding author:** HUANG Bei. E-mail: huangbei@jmu.edu.cn

**Funding projects:** Science Foundation of the Fujian Province (J01452 2018); National Natural Science Foundation of China (U1805233)