

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00017

白介素 17 的进化及结构分析

李 君¹, 宋军健², 马 川^{3,4}, 杨勇骥^{1*}, 赵华强^{3,4*}

1. 第二军医大学基础部生物物理学教研室, 上海 200433
2. 山东卫生报刊社《山东医药》编辑部, 济南 250014
3. 山东大学山东省口腔生物重点实验室, 济南 250012
4. 山东大学口腔医院口腔颌面外科, 济南 250012

[摘要] **目的** 从系统发生学和结构生物信息学的角度探讨脊椎动物白介素 17(IL-17) 基因的起源及其蛋白质结构。

方法 从美国国家生物技术信息中心(NCBI)及联合基因组研究所(JGI)数据库搜索得到全部已知的人、斑马鱼和文昌鱼 IL-17 蛋白质序列, 同时从另外几个数据库中搜索得到鸡、海鞘等 7 种常见模式生物的部分 IL-17 蛋白质序列。利用 MEGA 软件为这些蛋白质序列构建系统发生树, 并用 MODELLER 软件预测斑马鱼、文昌鱼、海鞘、线虫 IL-17 的三维结构, 再与已有的人 IL-17F 晶体结构进行比较分析。**结果** 虽然所有 IL-17 蛋白质序列中都含有 4 个保守的可能形成一个“半胱氨酸结”构象的半胱氨酸残基, 但文昌鱼展示出两种不同的分布模式, 其中一种与脊椎动物的分布模式相似, 另一种是文昌鱼自身特有。系统发生树显示, 脊椎动物 IL-17 基因的直系同源(ortholog)在文昌鱼基因组中没有出现, 而出现于海鞘基因组中。IL-17 蛋白质三维模型的结果与系统发生树一致。**结论** 文昌鱼的 IL-17 可能是 IL-17 进化的分枝点, 脊椎动物 IL-17 基因的直系同源可能最早出现于尾索动物。

[关键词] 白介素 17; 比较基因组学; 系统发生树; 蛋白质结构

[中图分类号] R 394.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)01-0017-07

Evolution and structural analysis of interleukin-17

LI Jun¹, SONG Jun-jian², MA Chuan^{3,4}, YANG Yong-ji^{1*}, ZHAO Hua-qiang^{3,4*}

1. Department of Bio-physics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Editorial Department of *Shandong Medicine*, Medical Publishing House of Shandong Province, Jinan 250014, Shandong, China
3. Shandong Key Laboratory of Oral Biology, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China
4. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Shandong Stomatology Hospital, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To investigate the origin and protein structures of vertebrate *interleukin-17* (IL-17) genes via phylogenetic and bioinformatic approaches. **Methods** All the known IL-17 protein sequences of human, zebrafish and amphioxus were retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Joint Genome Institute (JGI) databases. Also, partial IL-17 sequences from seven other model organisms were collected from several specific databases. MEGA software package was used to reconstruct a phylogenetic tree for these sequences and MODELLER software was used to predict IL-17 three-dimensional models of zebrafish, amphioxus, ciona and caenorhabditis, and these models were then compared with the known crystal structure of human IL-17F. **Results** Although all the IL-17 protein sequences contained four conservative cysteine residues that may be involved in the formation of a typical cysteine knot, amphioxus IL-17 revealed two different distribution patterns, with one similar to that of vertebrates and one unique to amphioxus. Phylogenetic analysis and cysteine analysis showed that amphioxus genome had no ortholog of vertebrate IL-17 genes, but urochordate ciona genome had it. The structural comparison result of our three-dimensional models supported the phylogenetic tree. **Conclusion** Amphioxus IL-17 might be the divergent point in the IL-17 evolution. The ortholog of vertebrate IL-17 genes might first appear in urochordates.

[收稿日期] 2012-07-22 **[接受日期]** 2012-11-07

[基金项目] 山东省科技发展计划(2012G0021833). Supported by Science and Technology Development Plan of Shandong Province (2012G0021833).

[作者简介] 李 君, 硕士. E-mail: 838121309@qq.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81870923, E-mail: yjyang22@163.com; Tel: 0531-88382840, E-mail: zhaohq@sdu.edu.cn

[Key words] interleukin-17; comparative genomics; phylogenetic tree; protein structure

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(1): 17-23]

在哺乳动物中已经发现 6 种白介素 17(IL-17)的同源基因 (IL-17A~F) 及 5 种 IL-17 的受体 (IL-17RA~E)^[1-3]。IL-17A 又称 IL-17 或细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 8(CTLA8), 最早从小鼠的毒性 T 淋巴细胞杂交瘤 cDNA 文库中克隆得到。哺乳动物的 IL-17A 在很多炎症反应和自身免疫反应中起着重要作用, 如类风湿、牛皮癣、哮喘等^[4]。IL-17F 和 IL-17A 最为相似(序列相似性约 50%), 都是由辅助 T 细胞 17(Th17)分泌产生^[5]。IL-17F 可以诱导炎症因子、CXC 趋化因子、急性时相蛋白、粒细胞集落刺激因子和骨代谢调控因子的表达^[6-9]。虽然 IL-17B~E 与 IL-17A 的同源性较低, 但所有 IL-17 的蛋白质序列中都含有 4 个十分保守的半胱氨酸残基。这 4 个半胱氨酸残基可以相互联络形成一个特定的结构, 称为“半胱氨酸结”^[10-11]。IL-17B~D 可以在广泛的组织中表达, 是促炎反应的主导者^[12]。IL-17E 主要在 Th2 细胞中表达, 它可以诱导 Th2 细胞因子(IL-4、5 和 13)的分泌, 上调嗜酸粒细胞活化趋化因子的表达并使组织的嗜酸粒细胞增多^[13-14]。新近研究表明, IL-17 基因在脊椎动物中十分保守, 起着宿主防御作用^[10-11]。但迄今为止, 有关脊椎动物 IL-17 蛋白质家族起源及进化的研究并不充分。文昌鱼作为一个具有代表性的低等脊索动物, 是脊椎动物的祖先, 本研究围绕文昌鱼, 从系统发生学和结构生物信息学的角度探讨脊椎动物 IL-17 基因的起源及其蛋白质结构。

1 资料和方法

1.1 IL-17 基因的进化分析

人 (*Homo sapiens*) 与斑马鱼 (*Danio rerio*) 的全部已知 IL-17 蛋白质序列经美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 通过关键词搜索加人工过滤得到, 关键词分别为 “IL-17 AND human” 和 “IL-17 AND zebrafish”。共获得人 IL-17 序列 6 条, 分别为 IL-17A~F, 斑马鱼 IL-17 序列 5 条。在 NCBI 中尚无对文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*) IL-17 基因的注解, 因此, 我们通过对联合基因组研究所 (JGI) 数据库 (<http://genome.jgi-psf.org/>) 进行 BLASTP 搜索得到文昌鱼的潜在 IL-17 蛋白质序列^[15]。以人与斑马鱼的 IL-17 蛋白质序列为搜索起始序列, 返回结果的 E 值坎值设置为 0.1, 共获得潜在的文昌鱼 IL-17 序列 12 条。将这些文昌鱼序列再一一作为搜索起始

序列在 NCBI 中进行 BLASTP 搜索, 并以返回的最相似的序列名称命名该搜索起始序列。

为了进行系统的进化分析, 我们又从 NCBI 和 JGI 这两个数据库中搜索得到鸡 (*Gallus gallus*)、非洲蟾蜍 (*Xenopus laevis*)、河豚 (*Taki fugu rubripes*)、海鞘 (*Ciona intestinalis*)、线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的部分 IL-17 蛋白质序列; 从 WUGSC 数据库 (<http://genomeold.wustl.edu/tools/blast>) 搜索得到七鳃鳗 (*Petromyzon marinus*) 的 IL-17 蛋白质序列; 从 SpBase 数据库 (<http://www.spbase.org/SpBase/search>) 搜索得到海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 的 IL-17 蛋白质序列。与前面所有蛋白质序列一起共计 69 条。使用 ClustalW 软件^[16]对所有得到的全长蛋白质序列进行多序列比对, 只截取其中保守的 IL-17 结构域部分用于之后的系统发生树构建。文昌鱼的 IL-17C5 序列因只含有部分 IL-17 结构域被排除在建树序列之外。我们使用 MEGA 4.0 软件包^[17]中的近邻相接 (neighbour-joining, NJ) 算法构建系统发生树。输入数据分析使用 P-distance 法, 多序列比对中的空位列删除使用两两删除法 (pairwise deletion)。NJ 建树的拓扑结构稳固性使用 1 000 步循环评估, 即自检率值 (bootstrap) 等于 1 000。

1.2 IL-17 蛋白质分子的三维结构预测及分析

人 IL-17F 蛋白质分子的晶体结构是目前唯一已测定的 IL-17 蛋白质三维结构^[18], 其结构文件从 PDB (<http://www.pdb.org>) 中下载获得 (PDB code: 3JVF)。依据系统发生树中反映出来的亲缘关系, 我们选取斑马鱼 IL-17A/F、海鞘 IL-17D、文昌鱼 IL-17A/F 和线虫 IL-17 的结构模型, 使用 MODELLER 软件^[19], 以 3JVF 结构的 A 链为模板, 同源建模。设定 MOELLER 为每一个输入序列构建 5 个结构模型。之后利用模型质量评估软件 PROCHECK^[20] 和 ModFOLD^[21] 挑选其中的最优模型作为最终模型。模型的质量评估考虑了几何学、立体化学和能量分布 3 方面。最后, 使用网页版 SuperPose 结构比对软件 (<http://wishart.biology.ualberta.ca/SuperPose>) 分别将斑马鱼 IL-17A/F、海鞘 IL-17D、文昌鱼 IL-17A/F 和线虫 IL-17 三维结构与 人 IL-17F 晶体结构进行比较。

2 结果

2.1 IL-17 的系统发生树

除文昌鱼以外涉及到的

其他 9 个物种的 57 条 IL-17 序列及其在各个数据库中的序列号见表 1。文昌鱼的 12 个潜在 IL-17 基因分别根据它们与其他已知 IL-17 基因的相似性命名为 *Bf IL-17F1* ~ 5、*Bf IL-17C1* ~ 5 和 *Bf IL-17D1*~2(表 2)。在这些基因中, 两个 *Bf*

IL-17D 序列明显长于其他序列。虽然所有的 *Bf IL-17* 蛋白质中都含有典型的 IL-17 结构域, 但有两个 *Bf IL-17* 基因在 NCBI 数据库的 BLASTP 搜索中只得到了较差 E 值(>0.01)的搜索结果, 即这两个基因在已知的 IL-17 基因中没有十分相似者。

表 1 用于建树的序列名称、物种及序列号

Tab 1 Name, species and database ID of the sequences used to construct the phylogenetic tree

Invertebrate			Vertebrate		
Name	Species	Database ID	Name	Species	Database ID
IL-17B1	<i>Ciona</i>	296822	IL-17A	<i>Homo</i>	NP_002181.1
IL-17B2	<i>Ciona</i>	204641	IL-17B	<i>Homo</i>	CAG33473.1
IL-17D	<i>Ciona</i>	281829	IL-17C	<i>Homo</i>	AAQ88835.1
IL-17B1	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30184	IL-17D	<i>Homo</i>	AAQ89471.1
IL-17B2	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30185	IL-17E	<i>Homo</i>	AAQ89484.1
IL-17B3	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30186	IL-17F	<i>Homo</i>	NP_443104.1
IL-17D1	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q22838	IL-17A/F1 A	<i>Gallus</i>	NP_989791.1
IL-17D2	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q05983	IL-17A/F2 F	<i>Gallus</i>	XP_426223.2
IL-17D3	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q12844	IL-17B	<i>Gallus</i>	ENSGALP_00000034037
IL-17D4	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q12845	IL-17D	<i>Gallus</i>	NP_001103531.1
IL-17D5	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q19349	IL-17A/F1 A P	<i>Xenopus</i>	146326
IL-17D6	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q19350	IL-17A/F2 A	<i>Xenopus</i>	464096
IL-17D7	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q19351	IL-17A/F3 F P	<i>Xenopus</i>	146322
IL-17D8	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30199	IL-17A/F4 A	<i>Xenopus</i>	321802
IL-17D9	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30200	IL-17B	<i>Xenopus</i>	300117
IL-17D10	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30196	IL-17C	<i>Xenopus</i>	187452
IL-17E1	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q27904	IL-17D	<i>Xenopus</i>	175542
IL-17E2	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30188	IL-17A/F1 A	<i>Danio</i>	NP_001018623.1
IL-17E3	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30190	IL-17A/F2 A	<i>Danio</i>	NP_001018634.1
IL-17E4	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30191	IL-17A/F3 F	<i>Danio</i>	NP_001018626.1
IL-17E5	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30192	IL-17C	<i>Danio</i>	NP_001018624.1
IL-17E6	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30193	IL-17D	<i>Danio</i>	NP_001018625.1
IL-17E7	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30198	IL-17A/F1 F	<i>Takifugu</i>	717259
IL-17E8	<i>Strongylocentrotus</i>	SPU_Q30204	IL-17A/F2 A	<i>Takifugu</i>	578869
IL-171	<i>Caenorhabditis</i>	F25D1.3	IL-17C	<i>Takifugu</i>	717310
IL-172	<i>Caenorhabditis</i>	C44B12.6	IL-17D P	<i>Takifugu</i>	568639
IL-173	<i>Caenorhabditis</i>	T22H6.1	IL-17A/F F P	<i>Petromyzon</i>	Contig19681.1
			IL-17B P	<i>Petromyzon</i>	Contig3524.5
			IL-17C P	<i>Petromyzon</i>	Contig6241.1
			IL-17D	<i>Petromyzon</i>	Contig2190.2

The number that follows a gene name is the series number of the gene appearing in the species; as IL-17A and IL-17F have not differentiated from each other in vertebrate species lower than *Gallus* (including *Gallus*), they are designated together as IL-17A/F; the letter A or F after IL-17A/F indicates the current IL-17A/F is more like L-17A or more like IL-17F; the italic *P* indicates the corresponding sequence contains an incomplete IL-17 domain

人 IL-17 蛋白质序列含有 4 个十分保守的半胱氨酸残基, 形成一个“半胱氨酸结”构象^[22]。我们的序列分析提示, 在人 IL-17 中 4 个半胱氨酸以 1-3、2-4 形式形成的两个二硫键的状态在脊索动物文昌鱼的 IL-17 中依然存在。4 个半胱氨酸在序列水平上的分布模式如图 1 所示。文昌鱼 IL-17 有两种半

胱氨酸的分布模式, 第一种模式存在于 IL-17C 和 IL-17D 中, 这种模式与脊椎动物模式十分相似; 第二种模式存在于 IL-17F 中, 与脊椎动物和低等的线虫模式都不相似。这种模式可能是文昌鱼作为脊椎与非脊椎动物的过渡类型所特有的模式, 在文昌鱼 IL-17F 特有的功能方面也可能有重要的影响。

表 2 文昌鱼 IL-17 的序列信息

Tab 2 Sequence information of amphioxus IL-17 proteins

JGI ID	Length	The most similar known sequence	Full length E-value	IL-17 domain E-value
92872F1	178	<i>S. scrofa</i> IL-17F	0.006	4.1e-11
94805F2	178	<i>A. melanoleuca</i> IL-17F	0.007	3.8e-10
94820F3	157	<i>S. scrofa</i> IL-17F	0.006	1.4e-11
94821F4	255	<i>B. taurus</i> IL-17F	5e-04	4e-11
112862F5	172	<i>A. melanoleuca</i> IL-17F	0.062	2.2e-09
66165C1	152	<i>X. tropicalis</i> IL-17C	0.017	1e-09
117645C2	178	<i>X. tropicalis</i> IL-17C	1e-05	3e-16
127767C3	136	<i>B. taurus</i> IL-17C	2e-15	3.6e-29
127768C4	200	<i>X. tropicalis</i> IL-17C	1e-14	1.8e-32
230778C5	Partial	<i>T. guttata</i> IL-17C	5e-13	3.9e-30
67593D1	433	<i>O. anatinus</i> IL-17D	1e-13	5.9e-31
91950D2	435	<i>O. anatinus</i> IL-17D	2e-13	9.5e-31

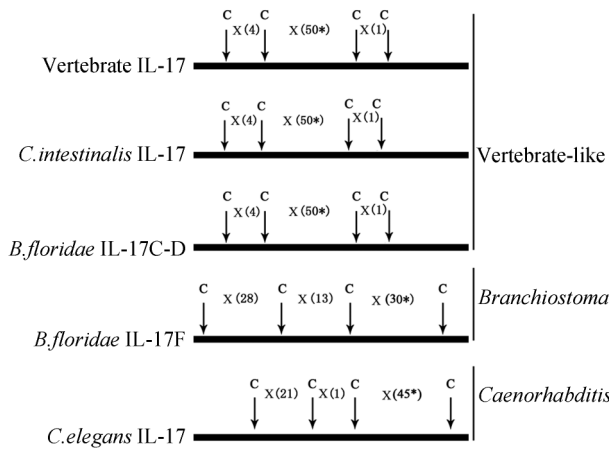


图 1 半胱氨酸在几种典型生物 IL-17 序列中的分布模式

Fig 1 Distribution patterns of cysteine in five typical species
“X” represents any amino acid; “C” represents cysteine; the number between parentheses indicates how many amino acids appearing; asterisk(*) indicates “about”

为了研究两侧对称动物 IL-17 在各等级生物间的进化关系,我们用 MEGA 软件包为所有搜集到的 IL-17 序列的 IL-17 结构域部分构建了系统发生树。如图 2 所示,系统发生树由两个主要的分化支构成,恰恰分别代表了脊椎动物组和非脊椎动物组。人 IL-17E 是唯一一个特例,被聚类在了非脊椎动物组。这一现象尚无文献报道或解释。因为 IL-17 是进化非常快的一个家族,不同成员的进化情况差异较大^[23],我们猜测这可能是由脊椎动物 IL-17E 与其他的 IL-17 成员(A~D、F)起源不同所致。海鞘属于尾索动物,目前普遍认为海鞘的进化等级高于文昌鱼。海鞘 IL-17 被聚类在了脊椎动物组,然而它们对应的聚类自检率只有 50%(自检率在图 2 中未显

示),值得注意的是海鞘的 IL-17 半胱氨酸的分布与脊椎动物类似。文昌鱼的个别 IL-17 虽然在序列水平上与脊椎动物有一定的相似度,但并未被聚类在脊椎动物组中。我们因此猜测,文昌鱼的 IL-17 可能是 IL-17 进化的分歧点,脊椎动物 IL-17 基因的直系同源可能最早出现于尾索动物。

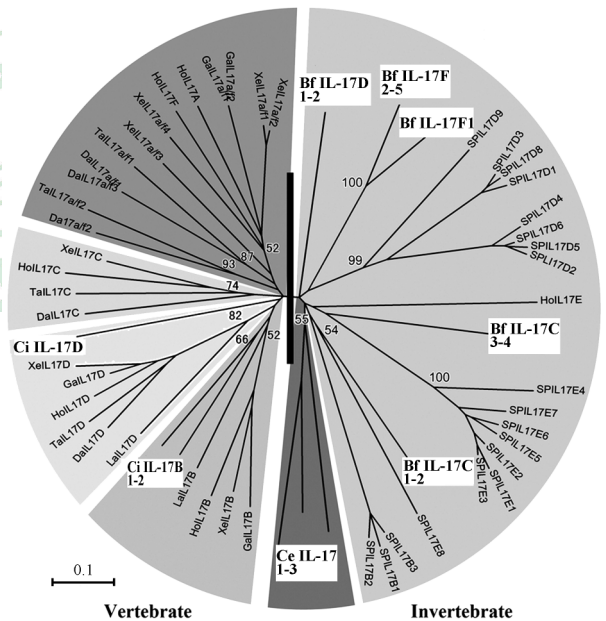


图 2 代表性 IL-17 家族成员的系统发生树

Fig 2 Phylogenetic tree of representative IL-17 family members
The number labeled on the tree branches are bootstrap values based on a 1 000 step evaluation. The IL-17 names used in Fig. 1 are bold-faced. Ho: *Homo sapien*; Ga: *Gallus gallus*; Xe: *Xenopus laevis*; Da: *Danio rerio*; Ta: *Takifugu rubripes*; Ci: *Ciona intestinalis*; Bf: *Branchiostoma floridae*; SP: *Strongylocentrotus purpuratus*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; La: Lamprey (*Petromyzon marinus*)

2.2 IL-17 的三维结构预测及分析 人 IL-17F 的晶体结构的单体显示出典型的半胱氨酸结折叠形式, 由两对反向平行的 β -折片组成(折片 1-2、折片 3-4), 其中折片 2 和折片 4 由两个二硫键相连(图 3A)。蛋白质 N 端有一段长度为 50 个氨基酸残基的延伸结构, 与另一 IL-17F 的折片 3、4 通过各种键的相互作用形成同源双体。依据系统发生树中反映出来的亲缘关系, 我们将斑马鱼 IL-17A/F、海鞘 IL-17D、文昌鱼 IL-17A/F 和线虫 IL-17 序列(表 3)分别提交给 MODELLER 软件, 依据 PROCHECK 和 ModFOLD 软件的评估, 得到 MODELLER 4 个返回的最优模型的分值(表 4), 人 IL-17F 的晶体结构也作为对照进行了评估。如图 3 所示, 斑马鱼、海鞘、文昌鱼和线虫的 IL-17 具有与人 IL-17F 相同的拓扑类型, 且

可以明显看出斑马鱼和海鞘与人具有相似的由两个二硫键维持的“半胱氨酸结”构象(C1-C3、C2-C4)。而文昌鱼 IL-17F 虽然也含有两个二硫键, 但 4 个半胱氨酸的组合情况却截然不同, 为 C1-C4、C2-C3。在较为原始的线虫 IL-17 中, 两个二硫键组合模式与人相同(C1-C3、C2-C4), 但由于线虫 IL-17 分子三维结构与人 IL-17F 的差异, 这两个二硫键在空间上的相对位置却与人的截然不同。

三维结构水平上的两两比对结果显示, 斑马鱼、海鞘、文昌鱼、线虫与人的全部原子的均方根偏差(RMSD)分别为 1.27、1.66、3.12 和 4.93 埃。这些数值从三维结构角度反映了上述物种之间的距离关系, 且这些关系恰恰与我们构建的系统发生树所展示出来的关系一致。

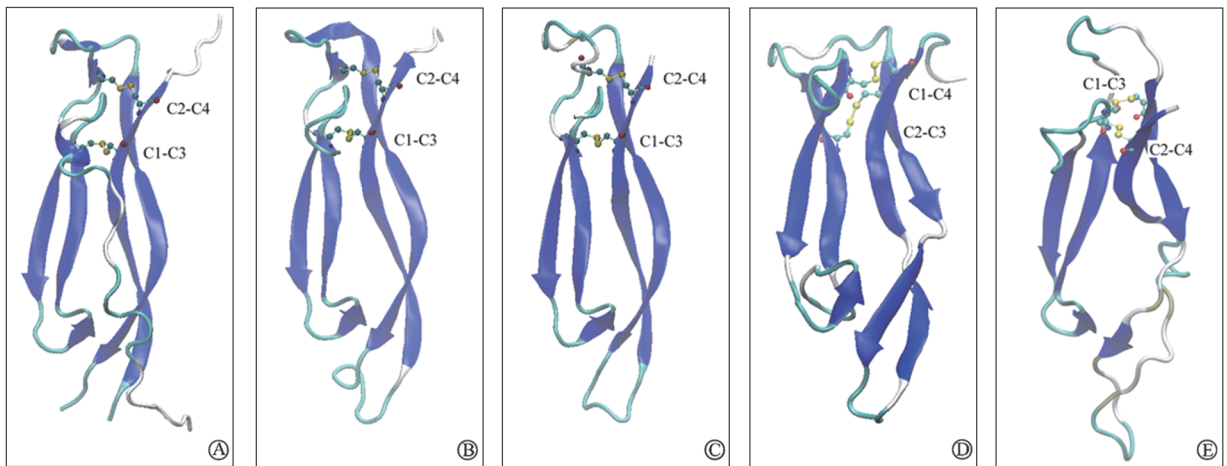


图 3 人 IL-17F 及斑马鱼、海鞘、文昌鱼和线虫的 IL-17 结构比较

Fig 3 Structural comparison of IL-17 of *Homo sapien*, *Danio rerio*, *Ciona intestinalis*, *Branchiostoma floridae* and *Caenorhabditis elegans*
A: Crystal structure of *Homo sapien* IL-17F; B: Structural model of *Danio rerio* IL-17A/F; C: Structural model of *Ciona intestinalis* IL-17D; D: Structural model of *Branchiostoma floridae* IL-17A/F; E: Structural model of *Caenorhabditis elegans* IL-17A/F. The four cysteines that form two disulphide bonds are represented by “balls and sticks”; sulphur atoms are represented by yellow balls

表 3 斑马鱼 IL-17A/F、海鞘 IL-17D、文昌鱼 IL-17A/F 和线虫 IL-17 序列
Tab 3 Sequence of IL-17A/F of *Danio rerio*, IL-17D of *Ciona intestinalis*,
IL-17A/F of *Branchiostoma floridae*, IL-17 of *Caenorhabditis elegans*

Name	Sequence
IL-17A/F of <i>Danio rerio</i>	IHNRSLSAWNWIPKFSPHRIPQVIFEACQSSEYCILPTGVDKRLNSVPIYQDI LVLKQEMERKKCFRAMFEKVIVGCTCVRAKTS
IL-17D of <i>Ciona intestinalis</i>	GIERSMCKWRYEDNVDPNRFSTLKVAVKEYTGSRCRDPATGAPRADLA CLPIDYELNVLKRNSEGEWQESYEFVTIGFTCAGSEPR
IL-17A/F of <i>Branchiostoma floridae</i>	RSTSPYVTELVDNKRIPRYLPQSKCLCSGCIASSNGRETIVGKSVPLVAQ IKVMRRNKTNSYSVVTEDEVITIGTCTCVL
IL-17 of <i>Caenorhabditis elegans</i>	KRHNVRRHVNGKWTDKHCEPPSLKEDLATWMQISMSGQFDDTAALEEW STNGKEPEICEKSPKADGVTTIMERALCPWDSRVNYQESR EPKLIAESVCL CRKSRGSTGAFCMPIVRKVPILRRVSCDRSTGLWNYVRSTELITVGCHSVL

表 4 结构模型质量评估
Tab 4 Model quality assessment

	Human IL-17F	Zebrafish IL-17A/F	Ciona IL-17D	Amphioxus IL-17A/F	Caenorhabditis IL-17A/F
PROCHECK	100%	100%	97%	97%	97.2%
ModFOLD <i>P</i> -value	3.03×10^{-3}	2.93×10^{-3}	1.91×10^{-3}	4.187×10^{-3}	4.47×10^{-3}

PROCHECK: Percentage of most rational and allowed amino acids in the Ramachandran plot; ModFOLD *P*-value: *P*<0.001 cert, *P*<0.01 high, *P*<0.05 medium, *P*<0.1 low, *P*>0.1 poor

3 讨论

本实验通过利用 NCBI 和 JGI 数据库搜索得到人、斑马鱼、文昌鱼、海鞘和线虫等物种的 IL-17 蛋白质序列,并对 IL-17 的氨基酸序列及结构的进化进行对比分析,结果显示尽管 IL-17 的氨基酸序列及结构随着物种的进化而不同,但是序列中都包含 4 个保守的半胱氨酸残基两两形成“半胱氨酸结”。通过对 IL-17 蛋白质的三维建模我们发现由于“半胱氨酸结”的分布模式不同,脊椎动物和非脊椎动物 IL-17 蛋白质的三级结构存在较大差异。此外,我们发现文昌鱼体内不仅存在一种与脊椎动物类似的分布模式,自身也拥有其特有的“半胱氨酸结”分布模式,这种模式与脊椎动物和低等的线虫模式都不相似,可能是文昌鱼作为脊椎与非脊椎动物的过渡类型所特有的模式,在文昌鱼 IL-17F 特有的功能方面也可能有重要的影响。然而,系统发生树显示,文昌鱼这种脊椎动物的“半胱氨酸结”分布模式与脊椎动物的并非同源,这一结论在 IL-17 蛋白质三维模型中得到了证实。

哺乳动物 IL-17A、E 和 F 蛋白质是由 T 淋巴细胞分泌形成的,是先天免疫与获得性免疫之间的重要媒介。七鳃鳗的可变淋巴细胞受体 A(VLRA)淋巴细胞与有颌类脊椎动物的 T 淋巴细胞形态上很相似,并且也能分泌 IL-17^[24]。从我们的进化分析中看出,七鳃鳗 IL-17 与人 IL-17D 是直系同源,与 Tsutsui 等^[11]于 2007 年的报道的是同一个基因。目前尚无实验证明七鳃鳗的 IL-17A/F 也是由 VLRA 淋巴细胞分泌形成,但我们推测,在低等的脊椎动物中,IL-17 家族的其他成员可能也是由 T 淋巴细胞分泌。新近研究显示,更加古老的类淋巴细胞可以追溯到文昌鱼并在其鳃中表达^[24]。因此,探究文昌鱼的类 IL-17 基因是否由文昌鱼的类淋巴细胞所分泌将是一项十分有意义的工作。研究将确认类 IL-17 基因是否与类淋巴细胞同进化。

IL-17 可促进各类先天免疫细胞的招募与扩增,并其他免疫效应物一起促进脊椎动物体内的 β-抵御素、抗菌多肽和基质金属蛋白酶的分泌^[25-26]。最近报道指出,文昌鱼 IL-17 在保护宿主免受感染过程中起到了重要作用^[27]。抵御素、抗菌多肽和 IL-17 在脊椎动物甚至包括文昌鱼和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)中广泛分布的情况说明 IL-17 诱导产生抗菌肽的机制是可能是古老的。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Aggarwal S, Gurney A L. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family[J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 71:1-8.
- [2] Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines[J]. *J Exp Med*, 1996, 183:2593-603.
- [3] Kolls J K, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation[J]. *Immunity*, 2004, 21:467-476.
- [4] Onishi R M, Gaffen S L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease [J]. *Immunology*, 2010, 129:311-321.
- [5] Yang X O, Chang S H, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F[J]. *J Exp Med*, 2008, 205:1063-1075.
- [6] Ferretti S, Bonneau O, Dubois G R, Jones C E, Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia; IL-15 as a possible trigger[J]. *J Immunol*, 2003, 170:2106-2112.
- [7] Jones C E, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells[J]. *Am J Respir Cell Mol*

- Biol,2002,26:748-753.
- [8] Moseley T A, Haudenschild D R, Rose L, Reddi A H. Interleukin-17 family and IL-17 receptors[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2003,14:155-174.
- [9] Ruddy M J, Wong G C, Liu X K, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood K L, et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members [J]. J Biol Chem,2004,279:2559-2567.
- [10] Gunimaladevi I, Savan R, Sakai M. Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish[J]. Fish Shellfish Immunol,2006,21:393-403.
- [11] Tsutsui S, Nakamura O, Watanabe T. Lamprey (*Lethenteron japonicum*) IL-17 upregulated by LPS-stimulation in the skin cells [J]. Immunogenetics, 2007, 59: 873-882.
- [12] Dong C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines [J]. Immunol Rev, 2008,226:80-86.
- [13] Hurst S D, Muchamuel T, Gorman D M, Gilbert J M, Clifford T, Kwan S, et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung; *in vivo* function of the novel cytokine IL-25 [J]. J Immunol, 2002,169:443-453.
- [14] Kim M R, Manoukian R, Yeh R, Silbiger S M, Danilenko D M, Scully S, et al. Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production [J]. Blood, 2002,100:2330-2340.
- [15] Huang S, Yuan S, Guo L, Yu Y, Li J, Wu T, et al. Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity [J]. Genome Res,2008,18:1112-1126.
- [16] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res,1994,22:4673-4680.
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol,2007,24:1596-1599.
- [18] Ely L K, Fischer S, Garcia K C. Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines [J]. Nat Immunol,2009,10:1245-1251.
- [19] Fiser A, Do R K, Sali A. Modeling of loops in protein structures [J]. Protein Sci,2000,9:1753-1773.
- [20] Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D S, Thornton J M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures [J]. J Appl Crystallogr, 1993,26:283-291.
- [21] McGuffin L J. The ModFOLD server for the quality assessment of protein structural models [J]. Bioinformatics,2008,24:586-587.
- [22] Hymowitz S G, Filvaroff E H, Yin J P, Lee J, Cai L, Risser P, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold, structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding [J]. EMBO J, 2001, 20: 5332-5341.
- [23] Guo P, Hirano M, Herrin B R, Li J, Yu C, Sadlonova A, et al. Dual nature of the adaptive immune system in lampreys [J]. Nature,2009,459:796-801.
- [24] Huang G, Xie X, Han Y, Fan L, Chen J, Mou C, et al. The identification of lymphocyte-like cells and lymphoid-related genes in amphioxus indicates the twilight for the emergency of adaptive immune system [J]. PloS One,2007,2:e206.
- [25] Kao C Y, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, et al. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways [J]. J Immunol, 2004, 173: 3482-3491.
- [26] Knorr E, Schmidtberg H, Vilcinskas A, Altincicek B. MMPs regulate both development and immunity in the tribolium model insect [J]. PloS One,2009,4:e4751.
- [27] Roberts S, Gueguen Y, de Lorgeril J, Goetz F. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure [J]. Dev Comp Immunol,2008,32:1099-1104.