

斑点叉尾鲷 TLR5 和 TLR5S 基因在不同病原诱导下的表达特征

李 敏^{1,2} 李 琪¹ 王启龙² 路 颀² 陈松林² 沙珍霞^{2*}

(¹中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

(²农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 分别用迟钝爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、链球菌 *Streptococcus iniae* 和斑点叉尾鲷呼肠孤病毒(channel catfish hemorrhage reovirus, CCRV) 对斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus* 进行感染实验, 取感染后 0h、12h、24h、48h、72h 和 7d 的头肾、肠、肝脏和脾脏, 采用实时定量 PCR 方法检测了 TLR5 和 TLR5S 基因在这 4 种免疫相关组织中的时空表达特征, 探讨它们与斑点叉尾鲷先天免疫反应的关系。结果表明, 链球菌和迟钝爱德华氏菌能够引起 TLR5 和 TLR5S 强烈的上调表达, 其中以感染链球菌 12h 后 TLR5S 在头肾中的表达上调量最为显著, 与对照组相比提高了 132 倍 ($P < 0.01$)。在感染嗜水气单胞菌后的 24h 内 TLR5 和 TLR5S 基因的表达量上升, 但随后却显示出了明显的下调趋势, 而斑点叉尾鲷呼肠孤病毒在 TLR5 和 TLR5S 基因表达中起到了明显的抑制作用, 于大部分组织中表达下调。在感染 12h 的脾脏中, TLR5 基因的表达量仅为对照组的 0.017 倍 ($P < 0.01$), 而 TLR5S 基因表达量达到最低, 仅为对照组的 0.01 倍 ($P < 0.01$)。从不同的组织来看, TLR5 在肠中的表达上调幅度最大, 而 TLR5S 在头肾中的表达增幅最明显, 如感染链球菌和迟钝爱德华氏菌 12h 后, TLR5 在肠中的表达量分别增加了 50.4 倍 ($P < 0.01$) 和 14.8 倍 ($P < 0.01$), TLR5S 在头肾中的表达量分别上升了 52.8 倍 ($P < 0.01$) 和 132 倍 ($P < 0.01$)。以上结果进一步证明了 TLR5 和 TLR5S 基因在斑点叉尾鲷先天免疫反应过程中发挥着非常重要的作用, 同时在抗病原侵袭过程中表现出了一定的组织特异性和病原特异性。

关键词 斑点叉尾鲷 先天免疫 TLR5 TLR5S 基因表达 病原

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)05-0030-09

Gene expression of TLR5 and TLR5S in channel catfish *Ictalurus punctatus* induced by different pathogens

LI Min^{1,2} LI Qi¹ WANG Qi-long² LU Yang²

CHEN Song-lin² SHA Zhen-xia^{2*}

(¹Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(²Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT Expression of channel catfish TLR5 and TLR5S genes in the head kidney, intestine, liver and spleen were analyzed by quantitative real-time PCR method at 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 d after infection with *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Strep-*

国家自然科学基金项目(30871941)和人事部留学归国人员项目共同资助

* 通讯作者。E-mail: shazx@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85844606

收稿日期: 2012-04-10; 接受日期: 2012-04-25

作者简介: 李 敏(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类免疫相关基因研究。E-mail: limin1104@yahoo.com.cn, Tel: 15806571726

tococcus iniae and channel catfish hemorrhage reovirus (CCRV), respectively. The results showed that TLR5 and TLR5S mRNAs were largely up-regulated by *E. tarda* and *S. iniae* and the most significant increase of TLR5S gene expression occurred in head kidney 12h after being challenged with *S. iniae*, which was 132-fold higher than the PBS control. After infection with *A. hydrophila*, TLR5 and TLR5S showed up-regulation at 12h and 24h and obvious down-regulation at 48h to 7d post-infection. TLR5 and TLR5S genes expression were suppressed by infection with CCRV in most tissues. In spleen, the expression of TLR5 was 0.017-fold while TLR5S was only 0.01-fold compared with PBS control. Among the four immune-related different tissues, the expression of TLR5 and TLR5S showed significant up-regulation in intestine and head kidney. For example, after being challenged with *E. tarda* and *S. iniae*, at time point of 12h, the expression of TLR5 increased 50.4-fold and 14.8-fold respectively in intestine, and the expression of TLR5S increased 52.8-fold and 132-fold respectively in head kidney. All data suggested that TLR5 and TLR5S were involved in the immune response of channel catfish against the intracellular bacterial and virus pathogen in a tissue-specific and pathogen-specific manner, and further confirmed that both of them played significant roles in the channel catfish innate immunity.

KEY WORDS *Ictalurus punctatus* Innate immune TLR5 TLR5S
Gene expression Pathogens

Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)是一类非常重要的病原模式识别受体(Pathogen recognition receptors, PRRs),在生物机体的先天免疫及获得性免疫中发挥着重要的作用。TLRs因其胞外区与一种果蝇Toll蛋白同源而得名(Medzhitov *et al.* 1997;徐凯等 2010)。自从在人类中发现第一个与果蝇Toll蛋白相似的TLR-TLR4以来,不同物种的多种TLRs相继被发现(Doyle *et al.* 2006; Akira *et al.* 2006)。迄今为止,在动物中已经发现了共21种不同的TLR受体(Roach *et al.* 2005; Temperley *et al.* 2008)。TLR作为一种I型跨膜蛋白,其结构可分为胞外区、跨膜区和胞内区3部分。其中胞外区为富含亮氨酸重复序列(Leucine-rich repeats, LRRs)的N端,其作用是识别病原体微生物表面的PAMPs(Pathogen-associated molecular patterns);跨膜区富含半胱氨酸,胞内区包含有与哺乳类白介素-1受体(IL-1R)同源的TIR(Toll/interleukin-1 receptor)功能域,能够介导信号的传导(Means *et al.* 2000; Rehli 2002; Seitz 2003)。TLRs分布广泛,表达于各种不同的组织和细胞中,其中大部分表达于上皮组织中,还有的表达于B淋巴细胞、髓样细胞及树突状细胞(Dendritic cells, DC)中(赵文华等 2007),而某些TLRs在T淋巴细胞中也能表达(Kabelitz 2007)。

TLR5作为TLR家族中的一员,在哺乳动物和其他脊椎动物中得到了广泛的研究。哺乳动物和鱼类TLR5能够识别蛋白类的PAMP,如细菌的鞭毛蛋白,通过MyD88依赖型信号转导通路经过一系列的级联反应最终导致核因子NF- κ B的活化,从而启动靶基因的表达、介导机体炎症应答(Hayashi *et al.* 2001; Tsujita *et al.* 2004)。哺乳动物TLR5还可以促进血浆中的T细胞和B细胞分化成免疫球蛋白A,在获得性免疫中发挥重要作用(Uematsu *et al.* 2008)。TLR在进化中是相当保守的,绝大部分的哺乳动物TLRs都能在鱼类中找到相应的同源TLRs,但是也有许多差异存在于哺乳动物与鱼类TLRs中。在鱼类中,除了与哺乳动物TLR5同源的鱼类TLR5外,还存在着另一种胞浆内TLR5,即TLR5S(一种TLR5的可溶形式)(Tsujita *et al.* 2004)。TLR5S基因是鱼类所特有的,它首先发现于河豚*Takifugu rubripes*中,TLR5S只有LRR功能域,与鱼类TLR5相比缺少了跨膜和胞内TIR结构域(Oshiumi *et al.* 2003)。到目前为止,已经在虹鳟*Onchorhynchus mikiss*(Tsujita *et al.* 2004)、大西洋鲑*Salmo salar*(Tsoi *et al.* 2006)、斑点叉尾鲷*Ictalurus punctatus*(Baoprasertkul *et al.* 2007)和牙鲆*Paralichthys olivaceus*(Hwang *et al.* 2010)中发现了

TLR5S。对虹鳟 TLR5S 的研究发现,它与 TLR5 协调作用,共同参与鱼类免疫反应(Tsujita *et al.* 2004)。

头肾、脾脏、肠和肝脏这 4 种组织与鱼类的免疫系统密切相关。其中头肾相当于二级淋巴器官,在免疫应答中发挥着重要的作用,它可以不依赖于抗原的刺激而产生红细胞和 B 淋巴细胞,是免疫细胞的发源地;脾脏是鱼类免疫系统中最后发生的免疫器官,脾脏内的淋巴小泡中有大量的巨噬细胞、淋巴细胞和噬黑色素细胞等,是中性血细胞、粒性白细胞以及红细胞生产、贮存和成熟的主要场所(杨先乐 1989);肠粘膜中富含能够生成淋巴细胞的粘膜相关淋巴组织(Mucosal-associated lymphoid tissues, MALT),在体液免疫和细胞免疫中起着重要的作用(张永安 2000);肝脏是基因表达的主要效应器官,在包括 TLR 在内的多种免疫相关基因响应病原刺激后的表达的研究中,已有文献报道了在肝脏内的基因表达变化(Li *et al.* 2012; Hwang *et al.* 2010; 王启龙等 2012)。

斑点叉尾鲷是我国南方的主要经济养殖鱼类,近年来由于集约化养殖的发展和养殖密度的增加,疾病问题已经越来越成为制约斑点叉尾鲷经济产量的首要问题,主要的疾病包括病毒性疾病、细菌性疾病、寄生虫病和真菌病(Sommerset *et al.* 2005; 曾令兵等 2009)。其中由革兰氏阴性菌如迟钝爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda* 和嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 引起的肠败血症(Enteric septicemia of catfish, ESC)、出血性腐败症等疾病对鱼类危害很大(Mohanty *et al.* 2007; Pressley *et al.* 2005);链球菌 *Streptococcus iniae* 是一种主要的水产动物病原菌,对全世界范围内水产养殖业都造成了很大的损失(Agnew *et al.* 2007);除此之外,在我国,斑点叉尾鲷呼肠孤病毒(channel catfish hemorrhage reovirus, CCRV)也是一种主要的病原菌,给斑点叉尾鲷养殖业带来了不小的冲击(曾令兵等 2009)。本研究用以上 4 种病原分别对斑点叉尾鲷进行感染实验,采用实时定量 PCR 方法来检测免疫相关基因 TLR5 和 TLR5S 在不同组织中的表达变化情况,为理解和研究斑点叉尾鲷细菌性疾病和病毒性疾病发生过程中宿主与病原相互间的关系以及免疫诱导产生的过程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验鱼

斑点叉尾鲷购自江苏省泰兴市斑点叉尾鲷良种繁育场,鱼龄为 75 d,平均体重 10.2g,平均体长 12.1cm。在 25~27℃淡水中暂养 15d 后用于感染实验。

1.1.2 病原

本研究所用的病原有:链球菌(革兰氏阳性菌)、迟钝爱德华菌(革兰氏阴性菌)、嗜水气单胞菌(革兰氏阴性菌)及斑点叉尾鲷呼肠孤病毒。其中迟钝爱德华菌由中国水产科学研究院黄海水产研究所黄捷研究员惠赠,嗜水气单胞菌和链球菌由华中农业大学水产学院陈昌福教授惠赠,斑点叉尾鲷呼肠孤病毒由中国水产科学研究院长江水产研究所曾令兵研究员惠赠。

1.1.3 培养基

TWA 培养基:葡萄糖 1.0 g,酵母膏 2.5 g,牛肉膏 2.5 g,NaCl 5.0 g, MgSO₄ 0.05 g, K₂HPO₄ 0.2 g, 水 1L, pH 7.2~7.4。

THB 培养基:胰蛋白胨 20.0 g,酵母浸出物 3.0 g,葡萄糖 2.0 g,牛肉膏 5.0 g,NaCl 2.0 g,Na₂CO₃ 2.5 g, Na₂HPO₄ 0.4 g,水 1 L, pH 7.4。

LB 液体培养基:蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,NaCl 10 g,加蒸馏水 900 ml,用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0,补足蒸馏水至 1 L,120℃灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 序列获得和引物设计

根据 NCBI GenBank 数据库公布的斑点叉尾鲷 TLR5 和 TLR5S 基因的 cDNA 全长序列,分别设计了特异性引物用于实时定量 PCR 的扩增,内参基因为 18S rRNA。引物序列见表 1。

1.2.2 病原感染实验

在TWA培养基中培养嗜水气单胞菌15h,培养条件是27℃、220 r/min。链球菌在THB培养基中27℃、210 r/min培养17h。迟钝爱德华菌在LB培养基中37℃、230 r/min培养17h。菌液2 000 r/min离心10 min,用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬后2 000 r/min离心8 min,然后再用1×PBS溶液(NaCl 8.0 g, Na₂HPO₄ 1.44g, KH₂PO₄ 0.24

g, KCl 0.2 g, 水1L, pH 7.4)重悬。用PBS溶液作为对照,用分光光度计测定600 nm波长下的OD值,用于感染实验。斑点叉尾鲷呼肠孤病毒的培养参照曾令兵等(2009)的方法。将120条实验用鱼随机分成5组,每组24条鱼,再将每组中的24条鱼分别放入6个玻璃缸内暂养,玻璃缸的规格为30 cm×10 cm×10 cm,用气泵充氧,温度控制在27℃,每缸放入4条鱼。向5组鱼中分别注射PBS、迟钝爱德华菌、嗜水气单胞菌、链球菌、斑点叉尾鲷呼肠孤病毒。4种病原均用PBS(pH为7.4)稀释,每条鱼注射0.1ml,最终浓度分别为迟钝爱德华菌 2.06×10^5 CFU/ml、嗜水气单胞菌 5.13×10^3 CFU/ml、链球菌 2.84×10^4 CFU/ml、斑点叉尾鲷呼肠孤病毒 1.5×10^7 CFU/ml,注射后的0h、12h、24h、48h、72h、7d分别取玻璃缸内的4条鱼,解剖后取头肾、肠、肝脏和脾脏,每缸中鱼的同一类型的组织等量混合在一起,放入-80℃保存。

1.2.3 RNA提取

首先在液氮中将取出的组织研磨成粉末状,然后按照Invitrogen公司提供的Trizol试剂说明书进行RNA提取。步骤如下:将50 mg研磨后的组织加入1 ml Trizol试剂中,充分混匀后静置5min,加入200 μl三氯甲烷颠倒混匀5min,4℃、12 000 r/min离心15min。取上清液,然后加入等体积异丙醇颠倒混匀5min,静置10min,10 000 r/min、4℃离心10min,去掉上清液,加入800 μl 75%酒精洗涤,5℃、8 000 r/min离心10min,弃上清液后自然干燥5 min,加入50 μl无RNA的水溶解。1%的琼脂糖电泳检测,并用分光光度计检测所提RNA的浓度和质量(A_{260}/A_{280})。

1.2.4 cDNA第一链的合成

用M-MLV反转录酶(TaKaRa公司)来进行cDNA第一链的合成,反应体系:RNA 500ng, Oligo(dT)18引物(50 μmol/L)1 μl,无RNA酶ddH₂O补至6 μl,按说明书的步骤进行如下操作:70℃保温10min后迅速在冰上急冷2min以上,加入2 μl 5×M-MLV Buffer, 10mmol/L), 0.5 μl dNTP Mixture, 0.25 μl RNase抑制剂(40U/μl), 0.5 μl反转录酶M-MLV(200 U/μl),用RNA酶ddH₂O补至10 μl,42℃保温60min,70℃保温15min后迅速放到冰上冷却,合成的cDNA第一链可直接作为实时定量PCR反应模板。

1.2.5 TLR5和TLR5S基因表达的实时定量分析

用ABI 7500荧光定量PCR仪进行实时定量表达分析实验,PCR反应条件按照SYBR Primescript RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司)推荐的方法:反应体系为20 μl,包含10 μl SYBR Green Real-time PCR master mixtures, 0.4 μl ROX II、上下游引物各0.4 μl(10 μmol/L)、稀释后的cDNA模板1 μl(总量为100 ng)、7.8 μl ddH₂O, 18S rRNA作为内参基因。每个样品设定3组重复,PCR反应条件为94℃ 30 s, 94℃ 5 s, 58℃ 34 s, 38个循环,自动加入熔解曲线。PCR反应结束后,使用ABI 7500荧光定量PCR仪自带软件包进行扩增和熔解曲线分析,相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法,用SDS 4.1软件分析。每组病原感染后TLR5和TLR5S的表达量与注射PBS后相应时间点的表达量的比值,即为最终的相对表达量值。用Origin 8软件作图,SPSS 11.5软件进行显著性分析。

2 实验结果

2.1 TLR5基因在不同病原诱导下的表达情况

对斑点叉尾鲷人工感染迟钝爱德华氏菌后,在头肾、肠、肝脏和脾脏4种免疫组织中,斑点叉尾鲷TLR5基

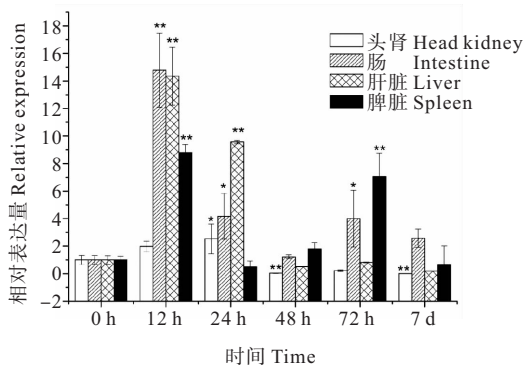
表1 用于实时定量PCR的引物及其序列

Table 1 Primers used for qRT-PCR confirmation

引物 Primer	引物序列 Nucleotide sequence (5'—3')	用途 Utilization
TLR5-F	ATGTTTGACCACCTTCACCAGC	实时定量PCR
TLR5-R	CATCGTTAGGTATGTAGGTTAGGGA	
TLR5S-F	GCAAAACATGATACATTCTCTCC	
TLR5S-R	CCAAACAACCTCTAATGTGGTCAGC	
18S rRNA -F	GGAAAGGATTGACAGATTGATAGC	内参引物
18S rRNA -R	GCCCTCTAAGAAGTTGGACGC	

因的表达总体上呈现出先升高后降低的趋势,在感染 12h 后出现最大值,之后随着感染时间的推进,TLR5 的表达水平逐渐降低。其中在肠中,感染 12h 后 TLR5 的表达量增加为对照组的 14.8 倍($P < 0.01$),然后迅速在 24h 后降低至 4.2 倍($P < 0.05$),感染 48h~7d 内维持在 1.2~3.9 倍的水平;在肝脏中,感染 12h 后表达量升高为对照组的 14.3 倍($P < 0.01$),24h 后略有下降,48h~7d 内,TLR5 的表达水平明显下调,仅为对照组的 1/2~1/5;在脾脏中的表达呈现出波动状态,感染 12h 后表达量增至 8.8 倍($P < 0.01$),随后的 24h 迅速下调至 0.5 倍,感染 72h 后又升到 7.1 倍($P < 0.01$),至 7d 后又降为原来的 2/3;在头肾中,感染 24h 后出现了最大值,为对照组的 2.5 倍($P < 0.05$),然后迅速下调,最低值仅为对照组的 1/11($P < 0.01$)。表达结果如图 1 所示。

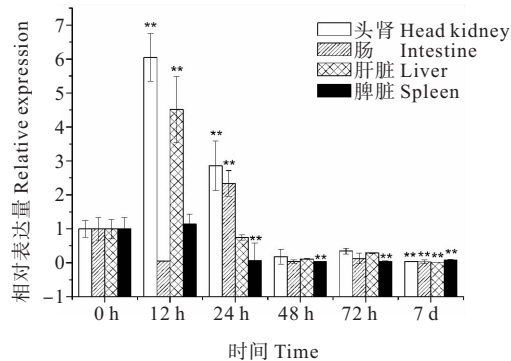
对斑点叉尾鲷人工感染嗜水气单孢菌后,TLR5 基因的表达同样呈现出先升高后降低的趋势,在头肾和肝脏中,感染 12h 后表达量都达到最大值,分别提高至对照组的 6.04 倍($P < 0.01$)和 4.5 倍($P < 0.01$),随后表达量逐渐降低至负调节水平,7d 后仅为对照组的 1/25($P < 0.01$)和 1/8($P < 0.01$);在肠和脾脏中,TLR5 基因的表达变化情况相似,先是略有升高(分别增加为 24h 后的 2.4 倍、12h 后的 1.14 倍),然后随着感染时间的增加,TLR5 的表达量逐步降低,感染 7d 后表达量仅为原来的 1/24 和 1/11($P < 0.01$)。表达结果如图 2 所示。



差异显著($P < 0.05$)和差异极显著($P < 0.01$)分别用“*”和“**”表示

Statistically significant up-regulation or down-regulation in expression of genes ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) are denoted with ‘*’ and ‘**’, respectively.

图1 斑点叉尾鲷 TLR5 基因在迟钝爱德华氏菌感染后的头肾、肠、肝脏和脾脏中相对于 PBS 对照组的表达量
Fig.1 The relative expression of channel catfish TLR5 transcript in head kidney, intestine, liver and spleen after infection with *E. tarda* relative to the PBS injected control



差异显著($P < 0.05$)和差异极显著($P < 0.01$)分别用“*”和“**”表示

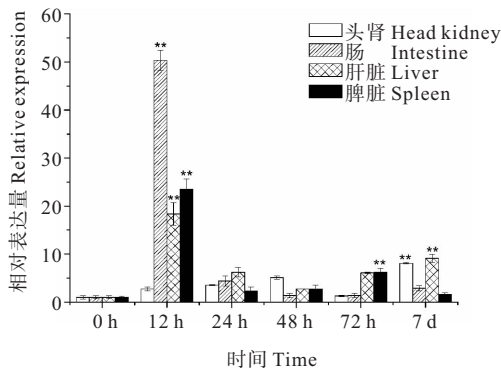
Statistically significant up-regulation or down-regulation in expression of genes ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) are denoted with ‘*’ and ‘**’, respectively

图2 斑点叉尾鲷 TLR5 基因在嗜水气单孢菌感染后的头肾、肠、肝脏和脾脏中相对于 PBS 对照组的表达量
Fig.2 The relative expression of channel catfish TLR5 transcript in head kidney, intestine, liver and spleen after infection with *A. hydrophila* relative to the PBS injected control

由实时定量 PCR 分析结果可知,链球菌对 TLR5 基因的诱导作用较大。在链球菌感染后的实验鱼组织内检测到 TLR5 基因出现了非常显著的上调表达。其中在肠中的表达变化量最为显著,与对照组相比,感染 12h 后表达量增加了 50.3 倍($P < 0.01$),然后迅速降低为 1.36~4.4 倍;在脾脏中,感染 12、72h 后的表达量较高,分别为对照组的 23.4 倍($P < 0.01$)、6.2 倍($P < 0.01$),其他时间点的表达量基本维持在 1.6~2.7 倍左右;在肝脏中,感染 12h 后的表达量达到了对照组的 18.4 倍($P < 0.01$),然后基本维持在 3~9 倍的增长水平;在头肾中 TLR5 基因的表达变化量与其他 3 种组织相比变化不大,最高值出现在感染 7d 后,为对照组的 8 倍($P < 0.01$)。表达结果如图 3 所示。

感染斑点叉尾鲷呼肠孤病毒后,TLR5 基因在肠和脾脏中表现出了持续的显著下调趋势。其中,在肠中的表达量最低值出现在感染后的 12h 和 7d,均仅为对照组的 0.03 倍($P < 0.01$);相似的是,在脾脏中,感染 12 和 24h 后的表达量均为对照组的 0.02 倍($P < 0.01$)。在头肾中,TLR5 基因的表达先是略有上升(12h,2.4 倍)然后迅速下调到对照组的 0.1 倍($P < 0.01$),从 48h~7d 内,该基因的表达量基本维持在对照组的 0.09~0.49 倍;在肝脏中,从 12~48h 内,TLR5 基因的表达量无明显变化,为对照组的 1~2.4 倍,随后的 72h~7d 内,表

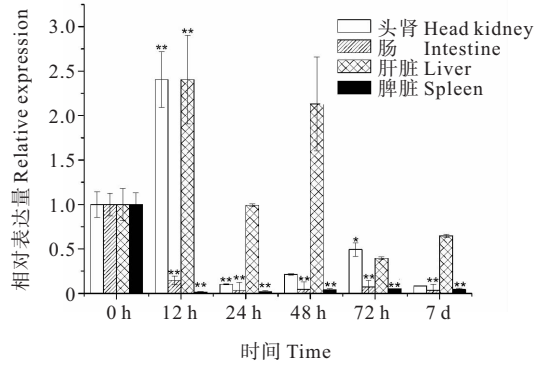
达量下调至对照组的 0.4 和 0.64 倍。表达结果如图 4 所示。



差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$) 分别用 “*” 和 “**” 表示

Statistically significant up-regulation or down-regulation in expression of genes ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) are denoted with ‘*’ and ‘**’, respectively

图 3 斑点叉尾鲷 TLR5 基因在链球菌感染后的头肾、肠、肝脏和脾脏中相对于 PBS 对照组的表达量
Fig. 3 The relative expression of channel catfish TLR5 transcript in head kidney, intestine, liver and spleen after infection with *S. iniae* relative to the PBS injected control



差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$) 分别用 “*” 和 “**” 表示

Statistically significant up-regulation or down-regulation in expression of genes ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) are denoted with ‘*’ and ‘**’, respectively

图 4 斑点叉尾鲷 TLR5 基因在斑点叉尾鲷呼肠孤病毒感染后的头肾、肠、肝脏和脾脏中相对于 PBS 对照组的表达量

Fig. 4 The relative expression of channel catfish TLR5 transcript in head kidney, intestine, liver and spleen after infection with channel catfish hemorrhage reovirus (CCHV) relative to the PBS injected control

2.2 TLR5S 基因在不同病原诱导下的表达情况

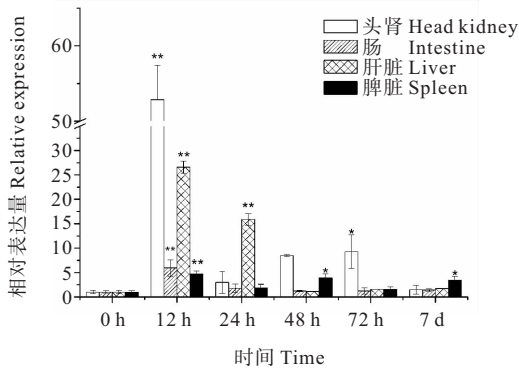
感染迟钝爱德华氏菌后,斑点叉尾鲷 TLR5S 基因的表达量在感染 12h~7d 内,在肠、脾脏、肝脏、头肾中都有不同程度的增加。其中,TLR5S 在头肾中的表达量变化最显著,感染 12h 后,与对照组相比,提高了 52.8 倍 ($P < 0.01$),随后的 24h 后表达量迅速降低至 3 倍,然后又有小幅度的升高,到 7d 时,表达水平稳定在 1.5 倍;TLR5S 基因在肝脏中的表达变化也较为明显,感染 12h 后达到对照组的 26.6 倍 ($P < 0.01$),随后略有下降,48h~7d 内,表达量稳定在 1.12~1.75 倍左右;在肠和脾脏中,TLR5S 基因的表达变化情况相似,感染 12h 后分别为对照组的 5.9 倍 ($P < 0.01$) 和 4.7 倍 ($P < 0.01$),随后表达量略有下降,各自基本维持在 1.2~3.4 倍左右 ($P < 0.05$)。表达结果如图 5 所示。

对斑点叉尾鲷人工感染嗜水气单孢菌后,TLR5S 基因在不同组织中的表达变化情况也不同。在脾脏中,该基因一直呈现明显的下调趋势,感染后 12~72h 之间,表达量与对照组相比,由 0.94 倍逐渐下调至 0.02 倍 ($P < 0.01$),到 7d 后,趋于正常表达水平,小幅度升至 0.65 倍;在其他 3 种组织中,TLR5S 基因在感染后的 12h 都达到了最大值,分别为对照组的 11.7 倍(头肾)、4.0 倍(肠)和 7.1 倍(肝脏) ($P < 0.01$)。随后表达量逐渐下降,至 7d 时,在头肾中的表达量仅为对照组的 0.07 倍,在肠中为 0.04 倍,在肝脏中为 0.08 倍 ($P < 0.05$)。表达结果如图 6 所示。

斑点叉尾鲷 TLR5S 基因在感染链球菌后在各个组织中都呈现出了显著的上调表达,其中上调幅度最大的是在头肾中。感染 12h 后,TLR5S 基因的表达量高达对照组的 132 倍 ($P < 0.01$),24h 后迅速降为 3.5 倍,48h 后又有小幅度的上扬,为对照组的 33.7 倍,7d 后的表达量基本与对照组持平;在肝脏中,感染 12h 后同样达到最大值,为对照组的 36.2 倍 ($P < 0.01$),随后 TLR5S 的表达量稳定在 1.6~5.1 倍之间;TLR5S 基因在肠和脾脏中的表达情况相似,最大值都出现在感染 12h 后,分别为对照组的 10.1 倍和 11.3 倍 ($P < 0.01$)。表达结果如图 7 所示。

用斑点叉尾鲷呼肠孤病毒感染后,经过实时定量 PCR 检测发现,在实验鱼的肠、肝脏和脾脏 3 种组织中 TLR5S 基因的表达一直处于下调水平,最低值分别为对照组的 0.03 倍(肠,48h)、0.1 倍(肝脏,72h)、0.01 倍(脾脏,48h) ($P < 0.01$)。在头肾中,感染 12h 后,TLR5S 基因的表达量增加为对照组的 3.9 倍 ($P < 0.01$),之

后的24h迅速下调为0.17倍,至48h又上升为2.1倍,72h后表达量与对照组持平,至7d时又降为对照组的0.15倍。表达结果如图8所示。

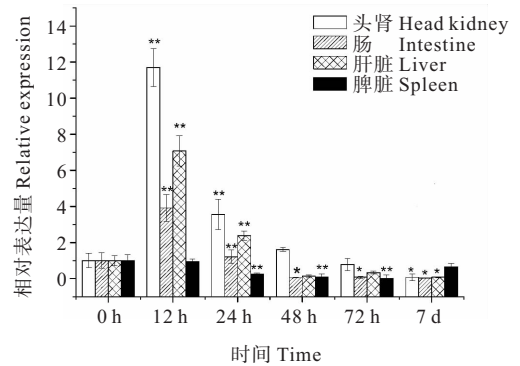


差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$) 分别用 “*” 和 “**” 表示

Statistically significant up-regulation or down-regulation in expression of genes ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) are denoted with ‘*’ and ‘**’, respectively

图5 斑点叉尾鲷 TLR5 基因在迟钝爱德华氏菌感染后的头肾、肠、肝脏和脾脏中相对于 PBS 对照组的表达量

Fig. 5 The relative expression of channel catfish TLR5 transcript in head kidney, intestine, liver and spleen after infection with *E. tarda* relative to the PBS injected control

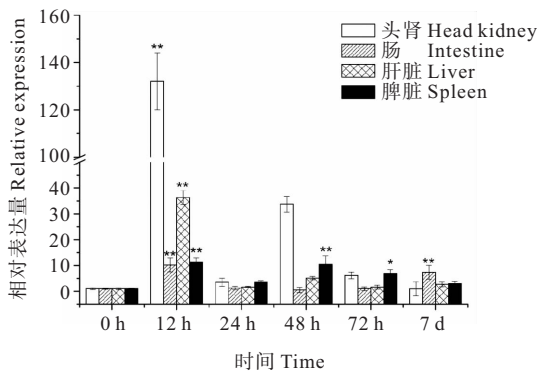


差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$) 分别用 “*” 和 “**” 表示

Statistically significant up-regulation or down-regulation in expression of genes ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) are denoted with ‘*’ and ‘**’, respectively

图6 斑点叉尾鲷 TLR5 基因在嗜水气单孢菌感染后的头肾、肠、肝脏和脾脏中相对于 PBS 对照组的表达量

Fig. 6 The relative expression of channel catfish TLR5 transcript in head kidney, intestine, liver and spleen after infection with *A. hydrophila* relative to the PBS injected control

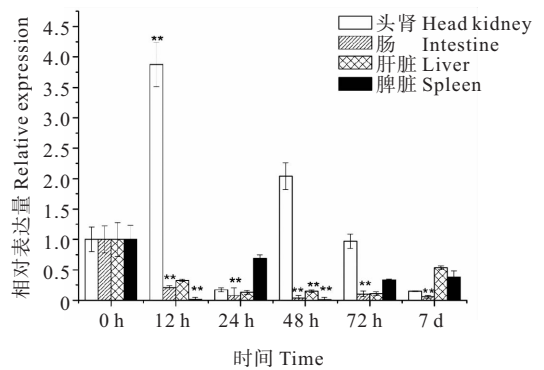


差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$) 分别用 “*” 和 “**” 表示

Statistically significant up-regulation or down-regulation in expression of genes ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) are denoted with ‘*’ and ‘**’, respectively

图7 斑点叉尾鲷 TLR5 基因在链球菌感染后的头肾、肠、肝脏和脾脏中相对于 PBS 对照组的表达量

Fig. 7 The relative expression of channel catfish TLR5 transcript in head kidney, intestine, liver and spleen after infection with *Streptococcus iniae* relative to the PBS injected control



差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$) 分别用 “*” 和 “**” 表示

Statistically significant up-regulation or down-regulation in expression of genes ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) are denoted with ‘*’ and ‘**’, respectively

图8 斑点叉尾鲷 TLR5 基因在斑点叉尾鱼呼肠孤病毒感染后的头肾、肠、肝脏和脾脏中相对于 PBS 对照组的表达量

Fig. 8 The relative expression of channel catfish TLR5 transcript in head kidney, intestine, liver and spleen after infection with channel catfish hemorrhage reovirus (CCHV) relative to the PBS injected control

3 讨论

斑点叉尾鲷作为低等脊椎动物先天免疫研究的模式生物,目前已经克隆和鉴定出了很多与其免疫相关的基因,同时探索了在病原刺激下这些基因的表达变化模式,了解了它们在先天免疫中的作用。TLR5和TLR5S作为重要的免疫相关基因,它们在包括斑点叉尾鲷在内的硬骨鱼类中是否响应病原的刺激及表达变化情况目前还不是很清楚。本研究选取了最具代表性的几种细菌和病毒分别对斑点叉尾鲷进行感染实验,通过实时定量PCR方法检测了TLR5和TLR5S在不同的组织中的时空表达特征,旨在发现相应病原刺激后两个基因的表达变化模式。

不同鱼类TLR5S在健康组织中的表达不同,先前的研究表明斑点叉尾鲷TLR5S在头肾、脾脏,皮肤,肝脏等组织中的表达量较高(Puttharat *et al.* 2007),河豚TLR5S在肠、胃等与消化相关的组织中表达量较为显著(Oshiumi *et al.* 2003),而虹鳟TLR5S只在肝脏中表达(Tsujita *et al.* 2004)。

由实时定量分析结果可知,当感染迟钝爱德华氏菌后,斑点叉尾鲷TLR5基因在肠和肝脏中的表达量明显上升,这与牙鲆TLR5基因感染迟钝爱德华氏菌后在肠中表现出极高的表达结果相一致(Hwang *et al.* 2010)。另外,据报道,结核分歧杆菌 *Mycobacterium marinum* 也能诱导斑马鱼TLR5基因在肠中的上调表达(Meijer *et al.* 2004)。Hwang等(2010)用原位杂交的方法对受到迟钝爱德华氏菌感染的牙鲆TLR5基因进行了定位,结果在肠固有层中发现了大量的TLR-表达细胞,因此可以推断硬骨鱼TLR5基因在识别肠道内细菌方面起着重要的作用。另外,有学者对斑点叉尾鲷TLR5基因在爱德华氏菌诱导下在肝脏、头肾和脾脏中的表达进行了RT-PCR分析,结果显示TLR5基因肝脏中的表达量显著上升,其次是头肾中,在脾脏中无明显变化(Lelania *et al.* 2005)。感染爱德华氏菌后,多种斑点叉尾鲷免疫相关基因在肝脏中的表达都非常显著,这可能是由于肝脏是直接参与肠败血症(ESC)发病机理的组织之一,另外肝脏坏死和大量充血是斑点叉尾鲷感染迟钝爱德华氏菌后的主要特征(Wang *et al.* 1989),所有这些都说明肝脏是病原刺激后基因表达的主要的效应器官。

目前,对病原感染后TLR5S基因的表达变化模式的研究非常少,仅见于牙鲆TLR5S在感染迟钝爱德华氏菌的组织中的表达,TLR5S在感染了迟钝爱德华氏菌后的头肾、脾脏、肝脏中表达量均比感染前有所增加,其中在肝脏中的表达量到了最大,分别为109倍(3d)和48倍(5d)(Hwang *et al.* 2010)。这与本研究的实验结果在部分上是一致的,两者的差别在于斑点叉尾鲷TLR5S在迟钝爱德华氏菌诱导下在头肾中的表达量得到了最大幅度的增加,这种差异可能是由于物种不同以及使用的方法不同所造成的。

在本研究中,TLR5和TLR5S在细菌的刺激下,二者都表现出不同程度的上调表达,而在CCR5的刺激下除了在感染后12h的头肾和肝脏中TLR5和TLR5S的表达量有轻微的上调外,在其他情况下两种基因均表现为明显的下调表达,其中的机制还不是很清楚,但很可能与TLR5能识别细菌的鞭毛蛋白而不能识别病毒PAMPs有关。另外,革兰氏阳性菌链球菌可引起TLR5和TLR5S的强烈的上调表达,这与之之前所报道的TICAM基因在斑点叉尾鲷病原感染后的表达情况相一致(王启龙等 2012)。将TLR5和TLR5S的表达情况比较来看,在感染不同的病原后,TLR5S的表达上调幅度较大,其中的机制现在还不是很清楚,需要进一步的研究。

参 考 文 献

- 王启龙,李 敏,路 颺,黄爱平,曾令兵,王文琪,陈松林,沙珍霞. 2012. 斑点叉尾鲷TICAM在细菌和病毒感染后的基因表达特征. 渔业科学进展,33(1): 47~53
- 杨先乐. 1989. 鱼类免疫学研究的进展. 水产学报,13(3): 272~284
- 张永安,孙宝剑,聂 品. 2000. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况. 水生生物学报,24(6): 648~652
- 赵文华,夏雪山. 2007. Toll样受体研究进展. 动物医学进展,28(10):85~87
- 徐 凯,魏永鸽. 2010. Toll样受体与感染性疾病. 内江科技,10: 48~49
- 曾令兵,李艳秋,王 瑶,肖 艺,范玉顶,周 勇. 2009. 斑点叉尾鲷出血病病原呼肠孤病毒的分离鉴定. 病毒学报,25(6):460~465
- Agnew, W., and Barnes, A. C. 2007. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. Vet Microbiol. 122: 1~15
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. J. Cell, 124: 783~801

- Baoprasertkul, P., Xu, P., Peatman, E., Kucuktas, H., and Liu, Z. 2007. Divergent Toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5S, TLR20, TLR21. *Fish Shellfish Immunol.* 23(2): 18~30
- Bilodeau, L. A., and Geoffrey C. W. 2005. Activation of TLR3 and TLR5 in channel catfish exposed to virulent *Edwardsiella ictaluri*. *Developmental and Comparative Immunology*, 29(18): 713~721
- Doyle, S. L., and O'Neil, A. J. 2006. Toll-like receptors: From the discovery of NF κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunology. *Biochemical Pharmacology*, 72: 1102~1113
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832): 1099~1103
- Hwang, S. D., Asahi, T., Kondo, H., Hirono, I., and Aoki, T. 2010. Molecular cloning and expression study on Toll-like receptor 5 paralogs in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 29: 630~638
- Kabelitz, D. 2007. Expression and function of Toll-like receptors in tlymphocytes. *J. Current Opinion Immunology*, 19 (1): 39~45
- Li, M., Liu, Y., Wang, Q. L., Chen, S. L., and Sha, Z. X. 2012. BIRC7 gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*): identification and expression analysis in response to *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* and channel catfish Hemorrhage Revirus. *Fish and Shellfish Immunology*. Published online
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388: 394~397
- Meijer, A. H., Gabby, K. S., Medina, R. I., He, S., Bitter, W., and Ewa, B. 2004. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Mol. Immunol.* 40(7): 73~83
- Means, T. K., Golenbock, D. T., and Fenton, M. J. 2000. Structure and function of Toll-like receptor proteins. *J. Life Science*, 68(3): 241~258
- Mohanty, B. R., and Sahoo, P. K. 2007. Edwardsiellosis in fish: a brief review. *J. Biosci.* 32(3): 1331~1344
- Oshiumi, H., Tsujita, T., Shida, K., Matsumoto, M., Ikey, K., and Seya, T. 2003. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics*, 54(11): 791~800
- Pressley, M. E., Phelan, P. E., Witten, P. E., Mellon, M. T., and Kim, C. H. 2005. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. *Dev Comp Immunol.* 29(6): 501~513
- Rehli, M. 2002. Of mice and men: Species variations of Toll-like receptor expression. *Trends in Immunology*, 23(8): 375~378
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E., and Aderem, A. 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (27): 9577~9582
- Seitz, M. 2003. Toll-like receptors: sensors of the innate immunessystem. *J. Allergy*, 58(12): 1247~1249
- Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E., and Frost, P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev. Vaccines*. 4: 89~101
- Temperley, N., Berlin, S., Paton, I., Griffin, D., and Burt, D. 2008. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. *BMC Genomics*. 9 (1): 62~74
- Tsoi, S., Park, K. C., Kay, H. H., O'Brien, T. J., Podor, E., Sun, G., Douglas, S. E., Brown, L. L., and Johnson, S. C. 2006. Identification of a transcript encoding a soluble form of toll-like receptor 5 (TLR5) in Atlantic salmon during *Aeromonas salmonicida* infection. *Vet Immunol. Immunopathology*, 109(1-2): 183~187
- Tsujita, T., Ishii, A., Tsukada, H., Matsumoto, M., Che, F. S., and Seya, T. 2006. Fish soluble Toll-like receptor (TLR)5 amplifies human TLR5 response via physical binding to flagellin. *Vaccine*, 24(12): 2193~2199
- Tsujita, T., Tsukada, H., Nakao, M., Oshiumi, I. H., Matsumoto, M., and Seya, T. 2004. Sensing bacterial flagellin by membrane and soluble orthologs of Toll-like receptor 5 in rainbow trout (*Onchorhynchus mikiss*). *J. Biol. Chem.* 279(47): 48588~48597
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B. G., Jung, Y. J., Nishiyama, M. Y., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K. J., and Akira, S. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat. Immunol.* 9(7): 769~776
- Wang, S. K., Newton, J. C., Wang, R., Taub, H., Dennison, J. R., and Shechter, H. 1989. Multilayer structure of nitrogen adsorbed on graphite. *Phys. Rev. B*, 39(4): 10331~10341