

斑点叉尾鲷 TLR20 和 TLR21 基因在不同 细菌和病毒感染后的表达特征

路 颢^{1,2} 王启龙¹ 李 敏¹ 陈松林¹ 沙珍霞^{1*}

(¹ 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)

(² 上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘 要 应用实时荧光定量 PCR 技术, 检测了 TLR20 和 TLR21 基因在斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus* 感染迟钝爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda*、链球菌 *Streptococcus iniae*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 和斑点叉尾鲷呼肠孤病毒(Channel Catfish Hemorrhage Reovirus, CCRV) 后, 在 0、12、24、48、72 h、7 d, 肝脏、头肾、脾脏、肠中的时空表达特征。结果显示, 4 种病原均能引起斑点叉尾鲷 TLR20、TLR21 基因在所测免疫相关组织中表达量的变化, 但呈现出不同的表达模式: 感染嗜水气单胞菌后这两种基因的表达差异巨大, 而 TLR21 基因的表达变化不大, 在肝脏和头肾中表达量仅在 3 倍以内变化。感染爱德华氏菌后, TLR20、TLR21 两种基因的表达模式类似, 在肝脏中表达量显著上调。链球菌引起肝脏 TLR20 表达量发生 4 360 倍的变化, 远远高于 TLR21 基因在同组织中的表达量(257.8 倍)。斑点叉尾鲷呼肠孤病毒感染引起 TLR20、TLR21 两种基因在肝脏、头肾的上调表达, 肠、脾脏的下调表达。以上结果表明了 TLR20、TLR21 在斑点叉尾鲷天然免疫应答中起重要作用, 为研究鱼类疾病防御机制提供了理论参考。

关键词 TLR20、TLR21 基因 斑点叉尾鲷 病原 实时定量表达

中图分类号 S941.41, S941.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)06-0044-08

Expression analysis of TLR20 and TLR21 genes in channel catfish *Ictalurus punctatus* challenged by different bacteria and virus

LU Yang^{1,2} WANG Qi-long¹ LI Min¹ CHEN Song-lin¹ SHA Zhen-xia^{1*}

(¹ Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT Toll-like receptor (TLR) is a kind of pattern recognition receptor with the function of immune defense, while TLR20 and TLR21 belong to a specific branch- non-mammalian TLRs. Expression of channel catfish *Ictalurus punctatus* TLR20 and TLR21 genes in the head kidney, intestine, liver and spleen was tested by quantitative real-time PCR at 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 d after infection by *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* and channel catfish

国家自然科学基金项目(30871941)资助

* 通讯作者. E-mail: shazx@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85831605

收稿日期: 2013-01-31; 接受日期: 2013-05-17

作者简介: 路 颢(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类免疫相关基因的研究. E-mail: luyang_0401@126.com, Tel: 15006483323

hemorrhage reovirus (CCRV), respectively. The results showed that all the four pathogens induced the two genes to change their relative expression levels in catfish main immune tissues, and the expression changes were specific. Expression of the two genes was highly different after infection by *A. hydrophila*. The trends of expression of the two genes were similar after infection by *E. tarda*, and the expressions were up-regulated in liver. *S. iniae* induced 4,360-fold change in expression level of TLR20 in liver, much higher than TLR21 (257.8-fold). The expression of the two genes was up-regulated in liver and head kidney, while down-regulated in intestine and spleen after infection by CCRV. All the results demonstrated the core function of TLR20 and TLR21 genes in channel catfish. This finding will offer theoretical reference for the study of fish disease defense mechanism and provide a new approach for developing more effective vaccines and immune therapies.

KEY WORDS TLR20, TLR21 Channel catfish Pathogens Real-time quantitative

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs) 是一类重要的模式识别受体家族,能够在病原体入侵机体时,识别并诱发一系列反应(张 煜等 2009)。TLR 能识别不同的病原相关分子模式(Pathogen associated molecular pattern, PAMP),包括脂类、蛋白质类和核酸类 PAMP,但是识别机制各不相同(赵文华等 2007)。TLR 信号转导开始于 TLR 的 TIR(Toll/interleukin-I receptor, toll/ 白细胞介素-I 受体)结构域与接头分子的 TIR 结构域同型感应。哺乳动物中有 MyD88、MAL、TRIF、TRAM 和 SARM 5 种 TIR 结构域接头,斑马鱼中证实了 MyD88 和 SARM 的存在,并且 TIR 结构域在进化中是高度保守的(Jault *et al.* 2004)。TLR 在机体先天免疫中发挥重要作用,并且是连接先天免疫和适应性免疫的桥梁(赵文华等 2007)。

TLR20 和 TLR21 属于 TLR 家族中一个特殊的进化分支,这个进化分支包括一类非哺乳类(Non-mammalian TLR)的 TLR19-21 序列以及鼠科的 TLR11-13 (Palti 2011)。TLR21 常见于鸟类(最早发现于鸡, Temperley *et al.* 2008)、两栖类非洲爪蟾(Ishii *et al.* 2007)和鱼类(河鲀 *Fugu rubripes*, Jault *et al.* 2004; 斑马鱼 *Danio rerio*, Meijer *et al.* 2004; 斑点叉尾鲷, Baoprasertkul *et al.* 2007; 鲤鱼 *Cyprinus carpio*, Kongchum *et al.* 2011、七鳃鳗 *Lethenteron japonicum*, Kasamatsu *et al.* 2010)等,但只在斑马鱼和斑点叉尾鲷中发现了 TLR20 (Baoprasertkul *et al.* 2007)。系统发育分析显示,斑点叉尾鲷 TLR20 与斑马鱼 TLR20 高度同源,斑点叉尾鲷 TLR21 与斑马鱼、河豚、鸡的 TLR21 亲缘关系较近(Roach *et al.* 2005)。斑马鱼的 TLR21.1、TLR21.2、TLR21.3、TLR21.4 构成了 TLR21 受体家族,是鱼类特有的 TLRs 成员。其中,TLR21.3 和 TLR21.4 的别名分别为 TLR20f 和 TLR20a,并且二者极有可能是功能互补的(欧阳蒲月等 2010),可见鱼类 TLR20 和 TLR21 亲缘关系密切。河鲀 TLR21 与成年雄性斑马鱼的 EST 克隆 fv45e11.x1 相类似,其氨基酸序列有 72% 的一致性(Oshiumi *et al.* 2003)。鸡 TLR21 是识别病毒的受体,具有哺乳动物 TLR9 的功能,并且鸡 TLR21 与鱼类和两栖类 TLR21 具有蛋白的直系同源性(周作勇等 2011)。TLR20 和 TLR21 基因作为鱼类特殊的一支 TLR 成员,在鱼类免疫中的作用还有待研究。

斑点叉尾鲷在我国已具有一定的养殖规模,但是近年来养殖过程中出现了严重的病害问题,制约了养殖业的发展。已有研究表明,引起人工养殖斑点叉尾鲷疾病的主要病原,包括迟钝爱德华菌 *Edwardsiella tarda*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、链球菌 *Streptococcus iniae*(李爱华 2007)、斑点叉尾鲷呼肠孤病毒(Channel catfish hemorrhage reovirus, CCRV)(曾令兵等 2009)。

有学者分离并测序了斑点叉尾鲷 TLR20、TLR21 基因的全长 cDNA 序列,鉴定了其基因结构,研究了这两种基因在正常组织中的表达(Baoprasertkul *et al.* 2007)。同河鲀 TLR21(Oshiumi *et al.* 2003)、斜带石斑鱼 TLR21(Li *et al.* 2012)一样,斑点叉尾鲷 TLR20、TLR21 在除了肌肉外的正常鱼组织广泛表达。目前,已有研究检测了斜带石斑鱼 TLR21 基因在感染了寄生虫病原后的表达(Li *et al.* 2012),但是对于斑点叉尾鲷 TLR20、21 基因对不同病原的表达特征研究尚未见报道。本文研究了细菌、斑点叉尾鲷呼肠孤病毒感染斑点叉尾鲷后 TLR20、TLR21 基因在免疫组织肝脏、脾脏、头肾和肠中 mRNA 水平的定量表达特征,旨在明确

TLR20、TLR21 基因在鱼类先天免疫中的重要作用,力求从分子水平寻求抗病新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

健康斑点叉尾鲷,体重范围为 8.2 ~ 12.9 g,体长为 9.6 ~ 16.2 cm,2010 年 7 月取自江苏泰兴斑点叉尾鲷国家原良种场。在 25 ~ 27 °C 淡水中暂养 14 d 以消除环境胁迫对斑点叉尾鲷的影响。

1.1.2 病原

本研究所选取的病原有嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌、链球菌和斑点叉尾鲷呼肠孤病毒。其中,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,迟钝爱德华氏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,斑点叉尾鲷呼肠孤病毒增殖和培养由中国水产科学院长江水产研究所水产病害防治实验室曾令兵研究员惠赠。

1.2 方法

1.2.1 序列获得和引物设计

根据 NCBI 上斑点叉尾鲷 TLR20(GenBank Accession number: DQ529275.1)、TLR21(GenBank Accession number: DQ529277.1) 的序列设计并合成实时定量表达引物,进行实时定量表达分析。以斑点叉尾鲷 18S rRNA 作为内参基因。各引物序列详见表 1。

1.2.2 病原感染实验

1.2.2.1 病原处理

嗜水气单胞菌在 TWA 培养基(MgSO₄ 0.05 g, 牛肉膏 2.5 g, NaCl 5.0 g, K₂HPO₄ 0.2 g, 葡萄糖 1.0 g, 酵母膏 2.5 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.2 ~ 7.4) 中 28 °C、200 r/min 培养 16 h。链球菌在 THB 培养基(酵母浸出物 3.0 g, 胰蛋白胨 20.0 g, 葡萄糖 2.0 g, NaCl 2.0 g, Na₂CO₃ 2.5 g, Na₂HPO₄ 0.4 g, 牛肉膏 5.0 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.4) 中 28 °C、220 r/min 培养 18 h。迟钝爱德华氏菌在 LB 培养基(胰蛋白胨 10.0 g, 酵母浸出物 5.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1 L) 中 37 °C、220 r/min 培养 18 h。得到菌液 4 000 r/min 离心 8 min, PBS 重悬后 4 000 r/min 离心 4 min, 然后再用 1 × PBS 溶液(NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.4) 重悬。用 PBS 溶液作为对照, 600 nm 波长下测定 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。

1.2.2.2 分组感染

将 120 尾健康鱼分成 5 组, 分别注射嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌、链球菌、斑点叉尾鲷呼肠孤病毒和 PBS 对照。4 种病原的注射剂量分别为 100 μl, 其中嗜水气单胞菌为 5.13 × 10³ CFU/ml, 迟钝爱德华氏菌为 2.06 × 10⁵ CFU/ml, 链球菌为 2.84 × 10⁴ CFU/ml, 斑点叉尾鲷呼肠孤病毒为 1.5 × 10⁷ CFU/ml (李 敏等 2012)。相应的, PBS 注射 100 μl。在感染后 0、12、24、48、72 h、7 d, 随机取各组鱼 4 尾解剖, 取头肾、肠、肝脏、脾脏 4 个组织, 同一组织取样量尽量相同, 将每组相同组织混合, 置于冻存管中, 立即投入液氮中快速冷冻, 之后转至 -80 °C 冰箱中。

1.2.3 RNA 提取与第一链 cDNA 的合成

取无 RNA 酶研钵、杵, 在液氮中将上述组织研磨成粉末状。采用 Trizol 法提取 RNA, 步骤参照说明书介绍(Invitrogen 公司)。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_{260nm}/A_{280nm})。使用

表 1 实时定量表达引物及序列

Table 1 Primers and their sequences used for qRT-PCR

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'-3')
TLR20_F	TGTGTCTACTGCGGGAAAGAT
TLR20_R	CTTCTGTAGAGGCTGTCCGTGAT
TLR21_F	TGATCAGCCGAAACTTCTCTCTG
TLR21_R	ACTTTCTCATACGGTGATAGGCAG
18S rRNA_F	GGAAAGGATTGACAGATTGATAGC
18S rRNA_R	GCCCTTAAGAAGTTGGACGC

M-MLV 反转录酶进行 cDNA 第一链的合成 (TaKaRa 公司), 合成的第一链 cDNA 可直接作为实时定量 PCR 反应模板。

1.2.4 TLR20、TLR21 基因表达实时定量分析

实时定量表达分析通过 ABI7500 荧光定量 PCR 仪完成, 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 μ l, 包含 SYBR Green Real-time PCR master mixtures 10 μ l, 0.4 μ l ROX II, 上下游引物各 0.4 μ l (10 μ mol/L), 7.8 μ l ddH₂O, 稀释后的 cDNA 模板 1 μ l (总量为 100 ng), 18 S rRNA 作为内参基因。每个样品设定 3 组重复, PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 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。

2 结果

2.1 不同病原感染斑点叉尾鲷后 TLR20 基因表达特征

2.1.1 感染嗜水气单胞菌后, TLR20 基因的实时定量表达分析

感染嗜水气单胞菌后, TLR20 基因在肝脏、头肾中的表达量升高, 在肠、脾脏中表达量降低。在感染后 24 h, TLR20 在肝脏中表达量达到最高, 是对照组的 16 倍 ($P < 0.05$), 随后, TLR20 的表达量持续下降至两倍左右 (72 h ~ 7 d); 感染后 24 h, TLR20 在头肾中有显著的升高且达到峰值, 是对照组的 8.7 倍 ($P < 0.05$), 随后, 表达量稳定在两倍以内。在感染初期, TLR20 基因在肠中的表达量变化不大, 在 24 h 开始有显著差异 ($P < 0.05$), 48 h 后与对照组差异显著, 72 h 达最低, 是对照组的 0.03 倍 ($P < 0.05$)。TLR20 在脾脏中表达量持续降低, 与对照组形成显著差异 ($P < 0.05$), 72 h 达最低, 是对照组的 0.03 倍 ($P < 0.05$)。感染嗜水气单胞菌后 TLR20 表达结果见图 1-A。

2.1.2 感染爱德华氏菌后, TLR20 基因的实时定量表达分析

感染爱德华氏菌后, TLR20 在肝脏、头肾、肠、脾脏中表达模式均为上调表达, 呈现先升高、后降低、再回升的过程。在感染后 12 h, TLR20 基因在肝脏中的表达量迅速升高到对照组的 860 倍 ($P < 0.05$), 随后表达量下降, 并于 72 h 再次升高, 达到对照组的 1 403 倍 ($P < 0.05$), 感染后 7 d, 表达量是对照组的 313 倍 ($P < 0.05$)。TLR20 基因在感染后 12 h 在头肾中出现表达量的峰值 (是对照组的 9.2 倍, $P < 0.05$), 然后表达量降低, 在感染后 7 d 重新回升到对照组的 6.3 倍 ($P < 0.05$)。感染后 12 h, TLR20 基因在肠中表达量升高到对照组的 2.2 倍, 随后降低, 在 7 d 重新升高到最大值, 是对照组的 13.8 倍 ($P < 0.05$)。感染后 12 h, TLR20 基因在脾脏中表达量升高, 达到对照组的 13 倍 ($P < 0.05$), 随后降低, 于 7 d 升高, 达到对照组的 57 倍 ($P < 0.05$)。结果如图 1-C 所示。

2.1.3 感染链球菌后, TLR20 基因的实时定量表达分析

链球菌可强烈诱导 TLR20 在肝脏中的表达变化。感染后 24 h, TLR20 在肝脏中表达量升高到对照组的 4 360 倍 ($P < 0.05$), 在 48 h 短暂回落后于 72 h 再次上升, 达对照组的 2 530 倍 ($P < 0.05$)。链球菌亦可引起 TLR20 在脾脏中的表达变化, 感染后 12 h, TLR20 在脾脏中有表达水平的明显提高, 为对照组的 84.5 倍 ($P < 0.05$), 24 h 降到最低, 是对照组的 31 倍 ($P < 0.05$), 随后表达量增加, 72 h 达最大值, 是对照组的 104 倍 ($P < 0.05$)。感染后 12 h, TLR20 在头肾中出现表达量的峰值, 是对照组的 78 倍 ($P < 0.05$)。链球菌对肠中 TLR20 影响不明显, 只在感染后 7 d 表现了显著性差异 ($P < 0.05$), 是对照组的 4.2 倍。结果见图 1-E。

2.1.4 感染斑点叉尾鲷呼肠孤病毒后, TLR20 基因的实时定量表达分析

斑点叉尾鲷呼肠孤病毒引起斑点叉尾鲷 TLR20 在肝脏、头肾中上调表达, 在肠、脾脏中下调表达。感染后 12, TLR20 在肝脏中表达量升高到对照组的 7.6 倍 ($P < 0.05$), 随后表达量下降, 48 h 降到最低, 是对照组的 3 倍, 在 72 h 出现表达峰值, 是对照组的 13.5 倍 ($P < 0.05$)。感染后 24 h, TLR20 在头肾中表达量到最大, 是对照组的 2.6 倍 ($P < 0.05$), 之后表达水平基本不变。TLR20 在肠和脾脏中表达量降低, 感染后 72 h, 在肠中降到最低, 仅为对照组的 0.097 倍 ($P < 0.05$); 感染后 24 h, 在脾脏中降到最低, 为对照组的 0.03 倍 ($P < 0.05$)。结

果见图 1-G。

2.2 不同病原感染斑点叉尾鲷后 TLR21 基因表达特征

2.2.1 感染嗜水气单胞菌后, TLR21 基因的实时定量表达分析

感染嗜水气单胞菌后, TLR21 基因在斑点叉尾鲷头肾、肝脏中表达变化量不大。其中在头肾中表达量略有上升, 在感染后 24 h 表达量最大, 是对照组的 2.8 倍 ($P < 0.05$), 随后, 在感染后的 48 h 表达量降到对照组水平, 72 h ~ 7 d 都维持在两倍以内的表达水平。在肝脏中, 表达量先下降(12 h, 是对照组的 0.55 倍) 后升高, 感染后 7 d 出现表达量的最大值, 是对照组的 1.5 倍。嗜水气单胞菌使 TLR21 基因在肠中和脾脏中的表达量明显下降, 12 h 仅为对照组的 0.19 倍 ($P < 0.05$), 之后一直保持稳定, 持续处于对照组的 0.18 ~ 0.3 倍左右。而在脾脏中, TLR21 基因在感染后 24 h 比对照组下降了 20 倍, 之后表达量有回升, 但仍低于对照, 仅为其 0.2 倍。结果见图 1-B。

2.2.2 感染爱德华氏菌后, TLR21 基因的实时定量表达分析

爱德华氏菌感染可强烈诱导斑点叉尾鲷 TLR21 基因在肝脏中表达, 感染后 12 h 表达量骤升, 达到对照组的 93 倍 ($P < 0.05$), 感染后 72 h 表达量最大, 是对照组的 158 倍 ($P < 0.05$), 第 7 天表达量是对照组的 77.3 倍 ($P < 0.05$)。该基因在头肾、脾脏中呈现上调表达趋势, 表达量始终高于对照组。在头肾中, 从 7.7 倍(12 h) 上升到最高 10.7 倍(24 h), 缓慢降到 2.9 倍(72 h) 后, 重新升高到 8.9 倍(7 d)。脾脏中表达量成波浪形变化趋势, 感染后 12 h 升到对照组的 14.9 倍 ($P < 0.05$), 感染后 24 h 降到对照组的 2.9 倍 ($P < 0.05$), 感染后 48 h 升到对照组的 14.3 倍 ($P < 0.05$), 至感染后 7 d 升到最高, 为对照组的 20.9 倍 ($P < 0.05$)。感染爱德华氏菌对肠中 TLR21 的表达变化影响不明显, 该基因在肠中表达量在不同的感染时间点较对照组呈现最高 3 倍左右的上调或下调变化。结果见图 1-D。

2.2.3 感染链球菌后, TLR21 基因的实时定量表达分析

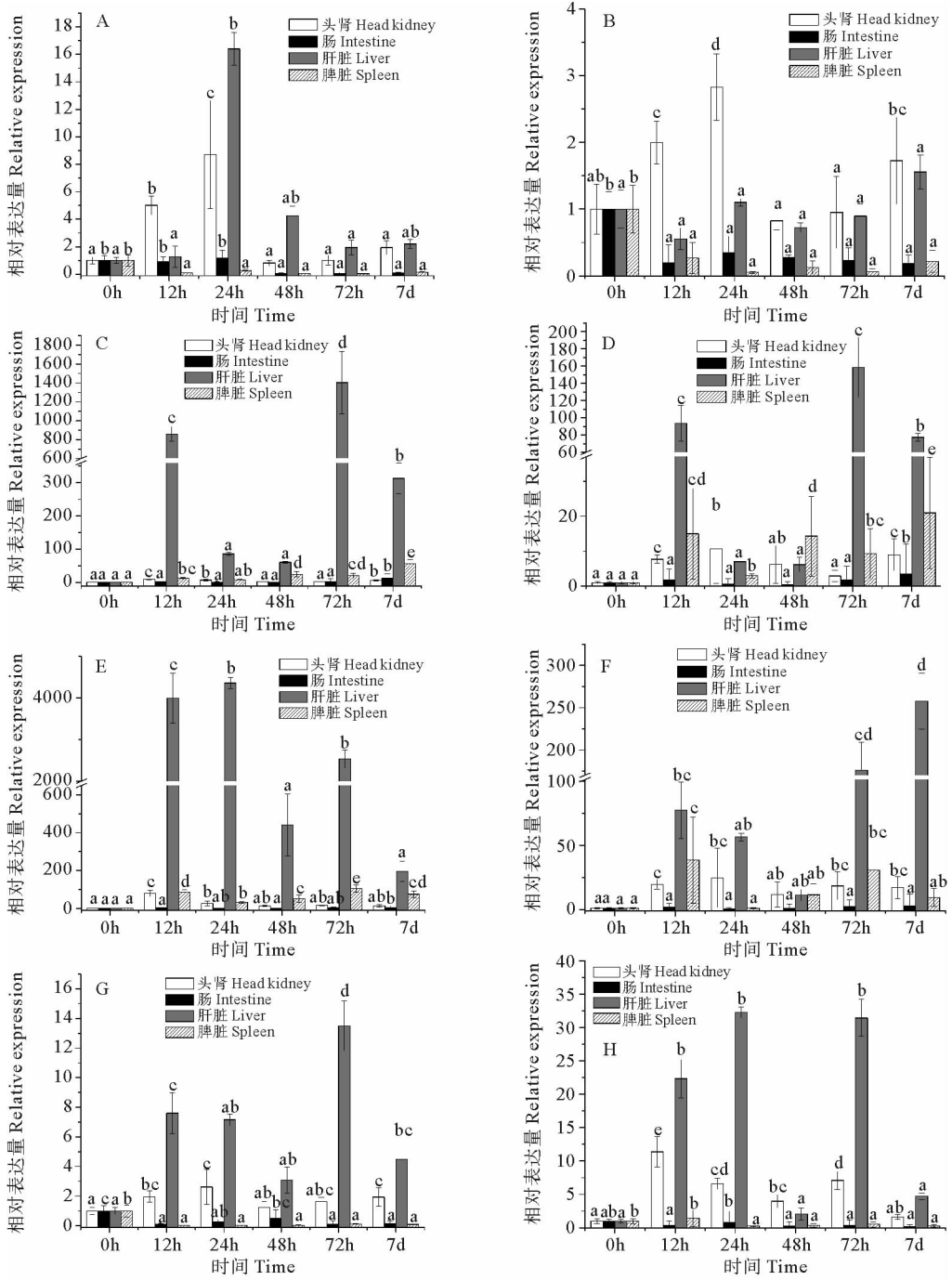
与 TLR20 基因类似, 链球菌感染亦可引起斑点叉尾鲷 TLR21 基因在肝脏中的表达量达到最大, 感染后 7 d 表达量为对照组的 257.8 倍 ($P < 0.05$), 感染后 12、72 h 分别是对照组的 77.3、175.8 倍 ($P < 0.05$)。TLR21 基因在头肾中的表达量在不同感染时间点均处于高于对照组 10 倍以上的水平, 感染后 24 h 出现最高表达量, 是对照组的 24.6 倍 ($P < 0.05$)。肠中 TLR21 的表达水平则在感染链球菌前后变化不大, 表达量在上调或下降两倍以上变化。感染后 12 h, TLR21 基因在脾脏中表达量明显升高, 达对照组的 38.3 倍 ($P < 0.05$), 感染后 24 h, 表达量与对照组持平。感染后 72 h, 表达量重新升高, 是对照组的 30.6 倍。结果见图 1-F。

2.2.4 感染斑点叉尾鲷呼肠孤病毒后, TLR21 基因的实时定量表达分析

斑点叉尾鲷呼肠孤病毒引起 TLR21 在肝脏、头肾中的上调表达, 在肠、脾脏中的下调表达。感染后 24 h, TLR21 在肝脏中的表达量迅速升高到最大, 为对照组的 32 倍 ($P < 0.05$), 随后在感染 48 h 后表达量降至对照组的两倍, 感染后 72 h 重新升高, 是对照组的 31.4 倍 ($P < 0.05$)。TLR21 在头肾中的表达变化趋势与在肝脏中的相似, 感染后 12 h, TLR21 在头肾中表达量最大, 是对照组的 11.4 倍 ($P < 0.05$), 之后降低, 在 72 h 升高到 7 倍 ($P < 0.05$)。该基因在肠中表达量减少, 感染后 7 d 表达量最低, 仅为对照组的 0.13 倍; TLR21 在脾脏中的表达量变化不大, 在感染后 12 h, 表达量为对照组的 1.4 倍, 感染后 48 h ~ 7 d 持续稳定在对照组的 0.2 ~ 0.5 倍的水平。结果见图 1-H。

3 讨论

目前, 有关硬骨鱼类 TLR20 和 TLR21 基因克隆和表达的报道有限, 只在斑点叉尾鲷和斑马鱼中报道了 TLR20 基因的序列, 并且二者相似性较高。TLR21 基因在鱼类中进化保守。斑点叉尾鲷 TLR20 基因在健康鱼头肾、脾脏、肠、胃、肝脏、后肾、脑和鳃中都有显著表达, TLR21 基因在肌肉中不表达 (Baoprasertkul *et al.* 2007), 与之类似, 河鲀 TLR21 基因在肌肉中表达水平较低 (Oshiumi *et al.* 2003)。斑马鱼 TLR20 和 TLR21 基因在健康组织的表达尚未见报道。



A、C、E、G 分别为嗜水气单胞菌、爱德华氏菌、链球菌、斑点叉尾鲟病毒感染后，TLR20 基因的表达结果；B、D、F、H 分别为嗜水气单胞菌、爱德华氏菌、链球菌、斑点叉尾鲟病毒感染后，TLR21 基因的表达结果。对各组织中不同时间点的表达量进行显著性分析，小写字母 a、b、c、d、e 代表 SPSS 中的 Duncan 分组

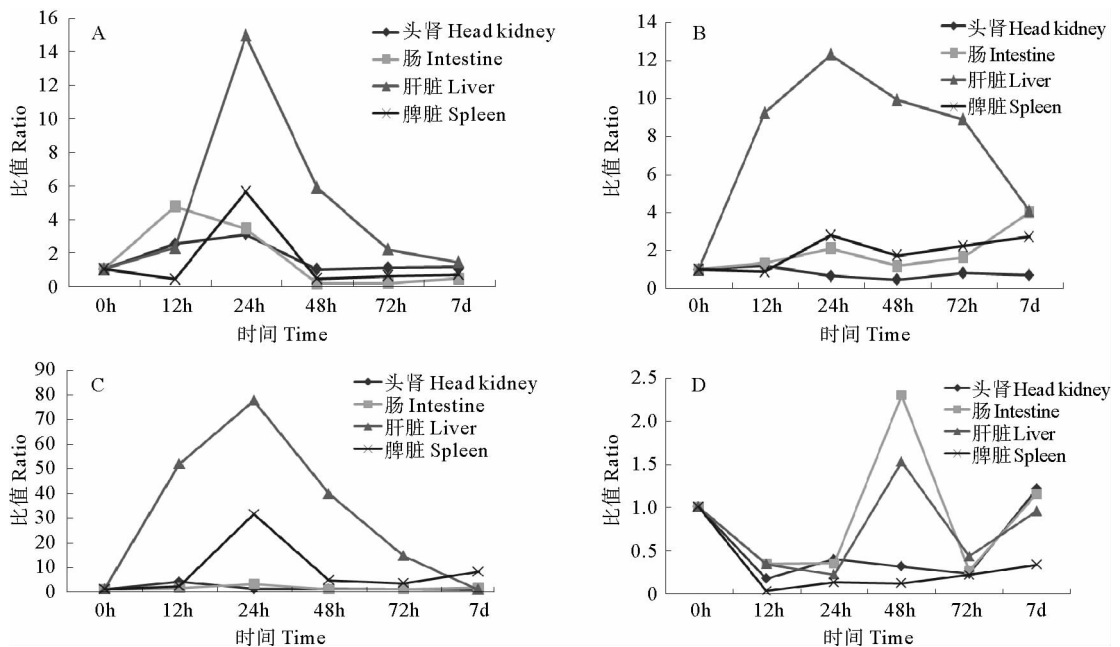
A, C, E and G are the expression results of TLR20 gene, and B, D, F and H are the expression results of TLR21 gene. Significance analysis was conducted among expression levels of different time points in each tissue, and "a, b, c, d, e" indicated the Duncan grouping in SPSS

图 1 各病原感染后，TLR20、TLR21 基因在头肾、肠、肝、脾的实时定量表达

Fig. 1 The relative expression of channel catfish TLR20 and TLR21 in head kidney, intestine, liver and spleen after infection with *A. hydrophila*, *E. tarda*, *Streptococcus iniae* and channel catfish hemorrhage reovirus

斑点叉尾鲟、斑马鱼、河鲀等鱼类的 TLR21 与鸡的 TLR21、蛙的 TLR21 以及鼠的 TLR13 亲缘关系较近 (Keestra *et al.* 2010), 另外, 鸡的 TLR21 与人的 TLR9 在识别 CpG 寡居脱氧核苷酸(ODNs) 上具有同源性 (Brownlie *et al.* 2009)。有学者向鸡肌肉注射 TLR21 配体 CpG 寡居脱氧核苷酸(ODNs), 之后在脾脏中检测到了 MHC-II、IFN- γ 和 IL-10 等细胞因子的上调表达, 但是鸡 TLR21 激活的分子机制还有待进一步的研究 (St *et al.* 2011)。

本研究中, 斑点叉尾鲟的 TLR20 和 TLR21 基因都能识别多种病原, 包括革兰氏阴性菌(嗜水气单胞菌和迟钝爱德华菌)、革兰氏阳性菌(链球菌) 和病毒。类似的, 有研究表明, 斑马鱼 TLR21.1 能识别大部分抗原, 而 TLR20f 和 TLR20a 仅对 Glucan 表现了上调反应(欧阳蒲月等 2010)。从图 2 可以看出, 3 种细菌感染后, 几乎在所有的时间点, 肝中的 TLR20 与 TLR21 表达差异明显高于其他组织。而病毒中, 两基因最显著的表达差异主要出现在肠中; 考虑肝脏是鱼类最主要的代谢和免疫组织之一, 某些基因在特定病原感染后可引发高强度的防御应答反应。另外, 鱼体不同组织中的免疫细胞不同(张永安等 2000), 也可能造成组织间表达差异。另外, 3 种细菌感染后 24 h, TLR20 与 TLR21 表达差异最大, 而病毒感染后 48 h, 才出现 TLR20 与 TLR21 差异表达的最大值。Toll 样受体识别病毒核酸是通过招募接头分子蛋白来激活信号级联反应, 产生各种抗病毒因子来抑制病毒的复制(张煜等 2009)。因此, 基因对病毒的作用时间较细菌可能滞后。



A、B、C、D 分别为嗜水气单胞菌、爱德华氏菌、链球菌、斑点叉尾鲟病毒

A, B, C, and D is *A. hydrophila*, *E. tarda*, *S. iniae* and channel catfish hemorrhage reovirus, respectively

图 2 各病原感染后, TLR20、TLR21 基因相应时间点表达量比值

Fig. 2 Ratios of expression levels of TLR20 and TLR21 in corresponding time points, after infection

两种革兰氏阴性菌(嗜水气单胞菌和迟钝爱德华菌)感染鱼体, 引起 TLR20 和 TLR21 基因在肝脏中的最高表达量的差异类似, 均在 12~14 倍; 而革兰氏阳性菌(链球菌)引起 TLR20 和 TLR21 基因在肝脏中表达量差异最大达到 77 倍。可能革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌用不同的组分作为病原体相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMP), 从而引起 TLR 基因对细菌产生不同的防御机制。链球菌最高引起 TLR20 在肝脏中表达量发生 4 360 倍的变化, 远远高于 TLR21 基因在同组织中的表达量(257.8 倍)。类似的高表达量变化也见于链球菌感染斑点叉尾鲟后另一免疫相关基因 BIRC7 在肝脏中的表达(感染后 12 h, 1 600 倍的表达差异)(Li *et al.* 2012), 可能是由于基因对这类细菌的防御机制比较特殊, 也可能与基因本身的结

构有关。斑点叉尾鲷 TLR20 基因结构特殊,它没有内含子,末端结构不典型,只有 3 个 LRR 重复,而哺乳类 TLR 家族有 19~25 个 LRR 重复。斑点叉尾鲷 TLR21 基因具有典型的 TLR 结构,有 23 个 LRR 重复,并且与河鲢、斑马鱼 TLR21 高度保守(Baoprasertkul *et al.*, 2007)。

不同的病原引起了斑点叉尾鲷 TLR20、TLR21 两种基因不同的表达模式,被感染鱼 4 种免疫组织中表达量变化趋势的多样性,暗示了 TLR20、TLR21 参与了斑点叉尾鲷天然免疫应答,为研究鱼类疾病的分子防御机制研究提供了理论参考。

参 考 文 献

- 李爱华. 2007. 斑点叉尾鲷几种疑难疾病的介绍. 中国水产, (3): 59-60
- 李 敏,李 琪,王启龙,路 颉,陈松林,沙珍霞. 2012. 斑点叉尾鲷 TLR5 和 TLR5s 基因在不同病原诱导下的表达特征. 渔业科学进展, 33(5): 30-38
- 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): 648-654
- 张 煜,钟 波,杨 艳,舒红兵. 2009. TLRs 与 RLRs 介导的细胞抗病毒反应信号转导及其调节机制. 细胞生物学杂志, 31(4): 453-468
- 欧阳蒲月,郭成栓. 2010. Tlr21 在斑马鱼免疫功能中的作用研究. 安徽农业科学, 38(3): 1258-1260
- 周作勇,聂 奎,胡世君,周荣琼. 2011. 雏鸡不同组织 TLR3、TLR7 和 TLR21 mRNA 转录水平研究. 中国兽医学报, 31(7): 1007-1012
- 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
- 曾令兵,徐 进,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弧病毒的分离与鉴定. 病毒学报, 25(6): 460-466
- Baoprasertkul P, Xu P, Peatman E and 2 others. 2007. Divergent toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5s, TLR20, TLR21. Fish Shellfish Immunol 23(6): 1218-1230
- Brownlie R, Zhu J, Allan B and 3 others. 2009. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of cpg oligodeoxynucleotides. Mol Immunol 46(15): 3163-3170
- Ishii A, Kawasaki M, Matsumoto M and 2 others. 2007. Phylogenetic and expression analysis of *Amphibian xenopus* toll-like receptors. Immunogenet 59(4): 281-293
- Jault C, Pichon L, Chluba J. 2004. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. Mol Immunol 40(11): 759-771
- Kasamatsu J, Oshiumi H, Matsumoto M and 2 others. 2010. Phylogenetic and expression analysis of lamprey toll-like receptors. Devel Comp Immunol 34(8): 855-865
- Keestra AM, de Zoete MR, Bouwman LI and 1 other. 2010. Chicken TLR21 is an innate cpg DNA receptor distinct from mammalian TLR9. J Immunol 185(1): 460-467
- Kongchum P, Sandel E, Lutzky S and 4 others. 2011. Association between IL-10a single nucleotide polymorphisms and resistance to cyprinid herpesvirus-3 infection in common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture 315(3-4): 417-421
- Li M, Liu Y, Wang QL and 2 others. 2012. Birc7 gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Identification and expression analysis in response to *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* and channel catfish Hemorrhage reovirus. Fish Shellfish Immunol 33(1): 146-153
- Li YW, Luo XC, Dan XM and 3 others. 2012. Molecular cloning of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) TLR21 and expression analysis post *Cryptocaryon irritans* infection. Fish Shellfish Immunol 32(3): 476-481
- Meijer AH, Gabby KS, Medina RI and 4 others. 2004. Expression analysis of the toll-like receptor and tir domain adaptor families of zebrafish. Mol Immunol 40(11): 773-783
- Oshiumi H, Tsujita T, Shida K and 3 others. 2003. Prediction of the prototype of the human toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. Immunogenet 54(11): 791-800
- Palti Y. 2011. Toll-like receptors in bony fish: From genomics to function. Devel Comp Immunol 35(12): 1263-1272
- Roach JC, Glusman G, Rowen L and 5 others. 2005. The evolution of vertebrate toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci USA 102(27): 9577-9582
- St PM, Mallick AI, Haq K and 3 others. 2011. In vivo administration of ligands for chicken toll-like receptors 4 and 21 induces the expression of immune system genes in the spleen. Vet Immunol Immunopathol 144(3-4): 228-237
- Temperley ND, Berlin S, Paton IR and 2 others. 2008. Evolution of the chicken toll-like receptor gene family: A story of gene gain and gene loss. BMC Genomics 9: 62