

大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*) piscidin 1 的分子特征及功能分析*

管 峰^{1,2} 李长红¹ 聂 力¹ 苗 亮¹ 陈 炯¹

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 浙江万里学院生物与环境学院 宁波 315100)

摘要 Piscidin 类抗菌肽具有广谱的抗菌活性, 在鱼类先天性免疫中扮演重要角色。本文对大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)单核/巨噬细胞(monocytes/macrophages, MO/MΦ)转录组测序获得 piscidin 1 基因(Bppis1) cDNA 全序列。Bppis1 基因 cDNA 序列由 327 个核苷酸组成, 开放阅读框为 207bp, 编码 68 个氨基酸, 预测相对分子量为 7.7kDa, 等电点为 5.51。氨基酸序列多重比对分析表明, Bppis1 具有 piscidin 家族的特征结构, 信号肽序列最为保守, 终止于 GEG 序列后, 与黄条鲮(*Seriola lalandi*) piscidin 同源性最高, 为 40.8%; 系统进化树分析表明, Bppis1 属于 piscidin 1 类, 与黄条鲮 piscidin 进化相关性最高。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR)结果显示, Bppis1 mRNA 在健康鱼鳃中表达量最高; 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)感染后, 大弹涂鱼肝、脾、肾、鳃和皮肤中 Bppis1 mRNA 表达量显著上调。体外抑菌实验结果表明, 人工合成的 Bppis1 成熟肽抑菌活性较广泛, 但对迟缓爱德华氏菌和 3 株革兰氏阳性菌无抑菌活性。大弹涂鱼 MO/MΦ 经 1.0μg/mL Bppis1 成熟肽处理后, 对 FITC 标记的创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)的吞噬活性显著增加。综上, Bppis1 在大弹涂鱼先天免疫中发挥重要作用, 可能作为抵抗病原体入侵的潜在治疗药物。

关键词 大弹涂鱼; Piscidin; 迟缓爱德华氏菌; 抗菌活性; 吞噬活性

中图分类号 Q786; S917 doi: 10.11693/hyhz20171100297

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是动物先天免疫系统的重要组成部分之一, 在机体抵抗病原入侵时发挥重要作用。AMPs 多是小分子量的短肽, 抗菌谱广, 主要通过形成离子通道直接破坏细胞膜以杀灭病原菌, 病原菌很难对其产生抗性(Brogden, 2005; Lai *et al*, 2009)。研究表明, AMPs 除对细菌、真菌、病毒、原生动物和癌细胞等有良好的直接抑制或杀伤作用外, 还参与免疫激活、免疫调节、抗炎和免疫抑制等免疫过程(Lai *et al*, 2009; Choi *et al*, 2012; Hilchie *et al*, 2013; Wan *et al*, 2014; Hancock *et al*, 2016)。近年来, 国内外学者已从水产动物中分离鉴定了豹鲷毒素(pardaxin) (Lazarovici *et al*, 1986)、毒鱼豆

素(piscidin) (Silphaduang *et al*, 2001)、cathelicidin (Lu *et al*, 2011)、肝脏表达抗菌肽-1 (liver express antimicrobial peptide 1, LEAP-1/hepcidin) (陈梅珍等, 2010; 王克坚, 2011)、肝脏表达抗菌肽-2 (liver express antimicrobial peptide 2, LEAP-2) (Li *et al*, 2014)、防御素(defensin) (Zhu *et al*, 2017)、epinecidin-1 (Pan *et al*, 2007)和 scygonadin (王克坚, 2011)等多种 AMPs。

Piscidin 是一类广泛存在于鱼类中的 AMP 之一, 最早从杂交斑纹鲈鱼(*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*)的肥大细胞中分离(Silphaduang *et al*, 2001)。此后, 在鳊鱼(*Siniperca chuatsi*) (Sun *et al*, 2007)、大西洋鳕(*Gadus morhua* L.) (Fernandes *et al*, 2010; Ruangsri *et*

* 国家自然科学基金项目, 31402333 号; 浙江省自然科学基金项目, LY14C030002 号; 宁波市科技创新团队项目, 2015C110018 号; 宁波市自然科学基金项目, 2017A610284 号, 2017A610285 号; 浙江省生物工程重中之重学科项目, ZS2017005 号。管 峰, 博士研究生, E-mail: guanfengxy@163.com

通讯作者: 陈 炯, 博士生导师, 研究员, E-mail: jchen1975@163.com

收稿日期: 2017-11-26, 收修改稿日期: 2017-12-30

al, 2012)、南极独角雪冰鱼(*Chionodraco hamatus*) (Buonocore et al, 2012)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (Peng et al, 2012)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (Niu et al, 2013; Zhou et al, 2014; Yang et al, 2016)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*) (Umasuthan et al, 2016)和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) (Zhuang et al, 2017)等数种鱼类中均发现它的存在。已有的研究发现, piscidin 通过破坏细菌、真菌和寄生虫的细胞膜发挥直接的抑制活性 (Campagna et al, 2007; Sung et al, 2008; Hayden et al, 2015; Li et al, 2016; Umasuthan et al, 2016; Pan et al, 2017)。除具有直接的抗病原活性外, piscidin 还能通过免疫调节功能参与机体内病原诱导的免疫应答 (Huang et al, 2015; Lin et al, 2016; Pan et al, 2017)。由于与 piscidin 具有相似的初级或二级多肽结构以及基因结构, 从其他鱼类中鉴定的拟鳕毒素(pleurocidin) (Cole et al, 1997)、moronecidin (Lauth et al, 2002; Bae et al, 2014)、chrysopsin (Iijima et al, 2003)、dicentracin (Salerno et al, 2007)、epinecidin (Yin et al, 2006; Pan et al, 2007)、myxinidin (Subramanian et al, 2009) 和 gaduscidin (Browne et al, 2011)等抗菌肽被建议归为 piscidin 家族。

大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)是弹涂鱼的一种, 主要分布在中国、韩国和日本等地, 在我国主要盛产于东南沿海和台湾。它是一种能够适应不同盐度的两栖鱼类, 喜栖息于港湾和河口潮间带淤泥滩涂上, 摄食有机碎屑、底藻和小型底栖动物等, 营掘洞穴生活, 具有较高的食用与药用价值。尽管大弹涂鱼生活的滩涂环境含有种类繁多、数量巨大的微生物群落, 但它们很少感染严重的细菌性疾病, 因此研究大弹涂鱼抗感染应答的免疫机制显得尤为重要。鉴于 piscidin 在动物抗感染免疫应答中的重要作用, 本研究初步研究大弹涂鱼(*B. pectinirostris*)的 piscidin 1(Bppis1), 测得 Bppis1 基因的 cDNA 序列, 确定该基因结构特点、分析其氨基酸系统进化关系并确定 mRNA 在正常组织中表达情况, 研究迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)感染后其组织中 Bppis1 mRNA 的表达变化; 人工合成 Bppis1 成熟肽, 分析其体外抑菌活性以及对大弹涂鱼单核/巨噬细胞(monocytes/macrophages, MO/M Φ)功能的影响, 为进一步深入探讨 piscidin 对鱼类抵抗细菌感染的免疫作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与实验试剂

30—40g 健康大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)

购自浙江省宁波市路林市场, 规格均一、无病症。大弹涂鱼充气运回实验室, 在充分曝气、盐度为 10‰、温度为 24—26°C 水环境中暂养以适应实验室环境。适应期间连续充气, 早晚换水各一次。

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)Et-CD 由浙江省海水养殖研究所惠赠, 其他细菌菌株由本实验保存。RNAiso 试剂、AMV 逆转录酶、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒等购自 TaKaRa 公司(中国)。Ficoll 购自 Invitrogen 公司(中国)。RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司(美国)。Bppis1 成熟肽由吉尔生化(上海)有限公司合成, 纯度>95%。引物合成和序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 大弹涂鱼肾源 MO/M Φ 的分离培养

大弹涂鱼肾源 MO/M Φ 的分离培养过程参考 Chen 等(2016)的方法, 具体步骤如下: 用 0.1% (V/V) 的间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)麻醉大弹涂鱼, 在无菌环境中抽血并迅速取出体肾, 放入无菌过滤筛网中, 再用 1mL RPMI 1640 培养基润湿体肾, 注射器活塞按压体肾碎片, 收集分离细胞。采用 Ficoll 密度梯度离心方法继续分离细胞, 获得含有 MO/M Φ 的白色细胞混悬液, 收集混悬细胞后用含 2%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基洗涤 2 次, 离心, 重复 2 次, 再用同样浓度胎牛血清的 RPMI 1640 培养基重新混悬细胞。使用血球计数板对分离细胞进行计数, 将 MO/M Φ 的浓度调至 2.0×10^7 cells/mL, 每个 35mm 细胞培养皿加入 2mL 细胞, 置于 5% CO₂、24°C 细胞培养箱中培养 24h, 然后用 RPMI 1640 培养基除去未贴壁细胞, 重复 2 次, 用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基继续培养贴壁细胞。用 Giemsa's 染液对贴壁细胞染色并镜检细胞的形态特征, 最终确认细胞培养皿中超过 95%贴壁细胞属于 MO/M Φ 。

1.3 Bppis1 cDNA 序列获得及分析

应用 Illumina 二代测序平台构建正常无病症大弹涂鱼的 MO/M Φ 转录组数据库, 筛选取得 Bppis1 cDNA 序列。根据说明书, 从大弹涂鱼 MO/M Φ 中提取总 RNA, 经 AMV 逆转录酶合成互补 cDNA 链, 通过特异性引物对 PCR 进行扩增并将扩增产物测序检验。使用 SignalP 4.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>)对开放阅读框编码多肽的信号肽序列进行预测; 采用 pI/Mw 程序 (http://web.expasy.org/compute_pi/)对基因编码多肽的分子量和等电点进行预测; 应用 ClustalW 程序 (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)多重比对 piscidin 氨基酸序列;

使用 MEGA 5.0 软件构建 piscidin 氨基酸的系统进化树(Tamura *et al*, 2011)。构建系统发育进化树及比多重序列所用 piscidin 的氨基酸序列详见表 1。

1.4 迟缓爱德华氏菌感染的大弹涂鱼组织样品制备
腹腔注射迟缓爱德华氏菌感染大弹涂鱼的实验方法及感染剂量参考 Chen 等(2016), 具体步骤如下: 收集对数生长期的迟缓爱德华氏菌, 用灭菌生理盐

水洗涤 3 次, 将细菌浓度调整为 1.0×10^5 CFU/mL。细菌感染组大弹涂鱼腹腔注射 1.0×10^4 CFU/尾的迟缓爱德华氏菌, 对照组大弹涂鱼腹腔注入同等剂量的生理盐水, 在注射感染后 4、8、12 和 24h (hours post infection, hpi)时分别收集两个组实验鱼的肝、脾、鳃、肾和皮肤等组织, 并立即放入液氮中冻存, 随后置 -70°C 超低温冰箱保存。

表 1 Piscidin 氨基酸序列多重比对及系统发育进化树构建采用序列
Tab.1 Protein sequences of piscidin for phylogenetic tree construction and multiple alignment

NCBI 登录号	基因名称	物种		
		拉丁名	英文名	中文名
MF459711	piscidin 1	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	Mudskipper	大弹涂鱼
AB703274	piscidin	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Rock bream	条石鲷
EU741827	piscidin 1	<i>Larimichthys crocea</i>	Large yellow croaker	大黄鱼
JX412481	piscidin 1	<i>Epinephelus malabaricus</i>	Malabar grouper	玛拉巴石斑鱼
JQ823163	piscidin 1	<i>Epinephelus coioides</i>	Orange-spotted grouper	斜带石斑鱼
EU741828	piscidin 1	<i>Epinephelus akaara</i>	Red spotted grouper	赤点石斑鱼
GU592793	piscidin 1	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	Brown marbled grouper	褐点石斑鱼
HQ437912	piscidin 1	<i>Epinephelus bleekeri</i>	Duskytail grouper	布氏石斑鱼
JN216987	piscidin 1	<i>Epinephelus bruneus</i>	Longtooth grouper	褐石斑鱼
FJ917596	piscidin 1	<i>Gadus morhua</i> L.	Atlantic cod	大西洋鳕
KY548530	piscidin	<i>Seriola lalandi</i>	Yellowtail amberjack	黄条鲷
HQ437913	piscidin 2	<i>Epinephelus coioides</i>	Orange-spotted grouper	斜带石斑鱼
JX412480	piscidin 2	<i>Epinephelus malabaricus</i>	Malabar grouper	玛拉巴石斑鱼
HQ184323	piscidin 2β	<i>Gadus morhua</i> L.	Atlantic cod	大西洋鳕
HQ184322	piscidin 2	<i>Gadus morhua</i> L.	Atlantic cod	大西洋鳕
KX231319	piscidin 3	<i>Morone chrysops</i>	White bass	白鲈
KX231323	piscidin 3	<i>Morone saxatilis</i>	Striped bass	条纹鲈
KX231324	piscidin 4	<i>Morone chrysops</i>	White bass	白鲈
KX231320	piscidin 4	<i>Morone saxatilis</i>	Striped bass	条纹鲈
HM596029	piscidin 4	<i>Morone chrysops</i> × <i>Morone saxatilis</i>	Hybrid striped bass	杂交斑纹鲈鱼
HM596030	piscidin 5	<i>Morone chrysops</i> × <i>Morone saxatilis</i>	Hybrid striped bass	杂交斑纹鲈鱼
KX870851	piscidin 5lt3	<i>Larimichthys crocea</i>	Large yellow croaker	大黄鱼
KJ879923	piscidin 5lt2	<i>Larimichthys crocea</i>	Large yellow croaker	大黄鱼
KJ879922	piscidin 5l	<i>Larimichthys crocea</i>	Large yellow croaker	大黄鱼
KX231326	piscidin 6	<i>Morone chrysops</i>	White bass	白鲈
KX231321	piscidin 6	<i>Morone saxatilis</i>	Striped bass	条纹鲈
KX231322	piscidin 7	<i>Morone chrysops</i>	White bass	白鲈

1.5 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)

参考 Chen 等(2016)的方法抽提组织中总 RNA、合成互补 cDNA 链并进行 RT-qPCR 检测目的基因 mRNA 的表达量。根据转录组测序结果获得的 Bppis1 序列设计检测引物, Bppis1-T(+): 5'-TGGTGGTGATG

ATGGCTGAG-3'和 Bppis1-T(-): 5'-CACTTGGAGGTA TTCG GGGC-3', 预期扩增片段大小为 172bp。根据大弹涂鱼 18S rRNA 基因设计检测引物, Bp18S rRNA-T(+): 5'-GGCCGTTCTTAGTTGGTGGA-3' 和 Bp18S rRNA-T(-): 5'-CCCGGACATCTAAGGGCAT C-3', 预期扩增片段大小为 112bp。确定的 RT-qPCR

检测体系共 25 μ L, 包含上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L、cDNA 模板 0.5 μ L、SYBR Premix Ex Taq(2 \times)缓冲液 12.5 μ L、灭菌水 10 μ L。在 ABI 荧光定量 PCR 仪 (Invitrogen, Foster City, CA, USA)上运行检测程序, 程序如下: 预变性段共 1 个循环反应, 95 $^{\circ}$ C 5min; 扩增段共 40 个循环, 95 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s; 熔解段共 1 个循环反应, 94 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 95 $^{\circ}$ C 30s。每个样品反复检测 4 次。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 Bppis1 mRNA 的相对表达量(Livak *et al*, 2001)。

1.6 体外抑菌实验

参考 Li 等(2014)的方法, 采用微量稀释法测定合成 Bppis1 肽对不同细菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 略作改进。具体方法如下: 采用二倍稀释法将合成 Bppis1 肽配制成 1.563、3.125、6.25、12.5、25、50 和 100 μ g/mL 共 7 个浓度; 将副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)、迟缓爱德华氏菌、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)等 11 种细菌培养至对数生长期, 用无菌生理盐水分别调整这些细菌的浓度为 1.0×10^5 CFU/mL; 在 96 孔微孔板中每孔加入 20 μ L 1.0×10^5 CFU/mL 实验细菌的菌悬液, 然后加入 80 μ L 不同浓度的合成 Bppis1 肽, 混匀后在适当的温度条件下培养 24h。采用 Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)测定 OD₆₀₀ 值。通过细菌沉降和 600nm 处吸光度值计算 MIC, 同时设置卡那霉素为阳性对照。

1.7 吞噬实验

参考 Chen 等(2016)的方法测定 Bppis1 对大弹涂鱼 MO/M Φ 吞噬能力的影响, 方法如下: 分别将对数生长期的大肠杆菌和创伤弧菌标记异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC), 分别命名为 FITC-*E. coli* 和 FITC-*V. vulnificus*。将 1.0 或 10.0 μ g/mL Bppis1 肽加入到 MO/M Φ 中, 预处理 8h, 然后以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10 : 1 的比例加入 FITC-*E. coli* 或 FITC-*V. vulnificus*, 孵育 30min, 灭菌 PBS 洗涤 3 次以除去未吞噬细菌, 台盼蓝淬灭细胞外荧光, 最后用 FACS 缓冲液(含 0.2% BSA 和 0.1% 叠氮化钠)重悬细胞。使用 Gallios Flow Cytometer

(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)对被吞噬细菌的荧光信号进行流式检测。大弹涂鱼 MO/M Φ 吞噬细菌的相对平均荧光强度(relative fluorescence intensity, MFI)用 FlowJo 软件分析。

2 结果

2.1 Bppis1 cDNA 序列分析

软件分析结果显示, Bppis1 cDNA 全长 327bp (GenBank 登录号为 MF459711), 包含一个完整的、长度为 207bp 的开放阅读框, 预测编码一个由 68 个氨基酸组成的、相对分子量大小为 7.7kDa 的多肽, 等电点为 5.51。该多肽 N-末端含一个由 22 个氨基酸组成的信号肽, 裂解位点为 G²⁰E²¹G²²-F²³F²⁴, C-末端含一个由 28 个氨基酸组成的末端功能前区, 其成熟肽由 18 个氨基酸组成(图 1)。

氨基酸序列多重比对结果显示, 鱼类 piscidin 在信号肽区间序列最为保守, 终止于 1 个 GEG 或 GEC 序列后, 成熟肽和末端功能前区序列变异较大(图 1)。其中, 大弹涂鱼 piscidin 与其他已知物种 piscidin 序列之间同源性较低, 为 5.8%—40.8%, 与黄条鲮 piscidin 同源性最高。根据鱼类 piscidin 氨基酸全长序列构建的系统进化树揭示, 大弹涂鱼 piscidin 属于 piscidin 1 类, 与黄条鲮 piscidin 进化相关性最高(图 2)。

2.2 迟缓爱德华氏菌感染前后 Bppis1 mRNA 表达的变化

取健康大弹涂鱼的肝、脾、肾、鳃和皮肤运行 RT-qPCR 检验程序, 结果显示 Bppis1 mRNA 在健康大弹涂鱼鳃组织中含最高, 其余依次为皮肤、肝、脾和肾(图 3A)。与对照组对比, 当迟缓爱德华氏菌感染 4h 时, 脾、肾、肝和皮肤中 Bppis1 mRNA 的表达量显著提高, 分别是对照组表达量的 2.17、3.17、3.32 和 20.76 倍($P < 0.05$); 在 8h 时, 所有检测组织中 Bppis1 mRNA 的表达量均显著增加, 在肝、肾、鳃和皮肤中达到峰值, 分别为对照组的 5.84、15.51、3.78 和 60.86 倍($P < 0.05$); 在 12h 时, 脾中 Bppis1 mRNA 的表达量继续增加, 达到峰值, 为对照组的 20.60 倍($P < 0.05$); 在 24h 时, 肾、肝和鳃中 Bppis1 mRNA 的表达量与对照组无明显差异(图 3B—图 3F)。

2.3 Bppis1 体外抑菌活性

利用酶标仪测定 Bppis1 肽对 11 种细菌的体外抑菌活性, 结果表明, Bppis1 具备较广泛的抗菌活性, 对溶藻弧菌、副溶血弧菌和鳗弧菌的 MIC 为 50 μ g/mL; 对哈维氏弧菌和嗜水气单胞菌的 MIC 为 25 μ g/mL;

对创伤弧菌和大肠杆菌的 MIC 分别为 12.5 和 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并且抑菌效果优于对照组卡那霉素, 但对迟缓爱德华氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌和海豚链球菌无明显的抑菌活性(表 2)。

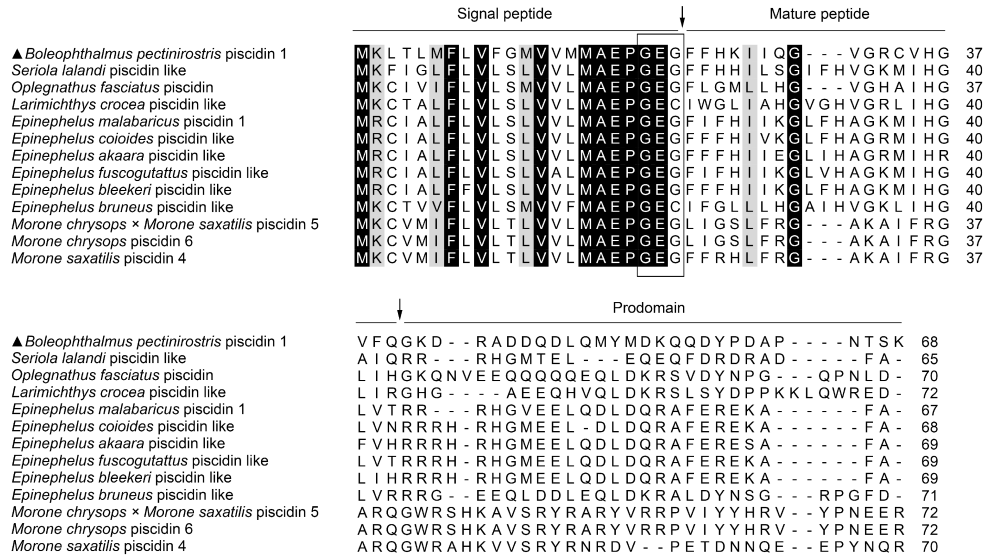


图 1 大弹涂鱼与其他种类鱼 piscidin 氨基酸序列比对结果

Fig.1 The multiple alignments of piscidin sequences of mudskipper and other fishes

注: 黑色阴影代表相同氨基酸, 灰色阴影代表相似氨基酸; 图中序列缺口用短横线(-)表示; 预测的信号肽及末端功能前区与成熟肽之间的裂解位点用箭头(\downarrow)标记; 信号肽的终止序列(GEC 或 GEG)用框包围。所用序列登录号见表 1

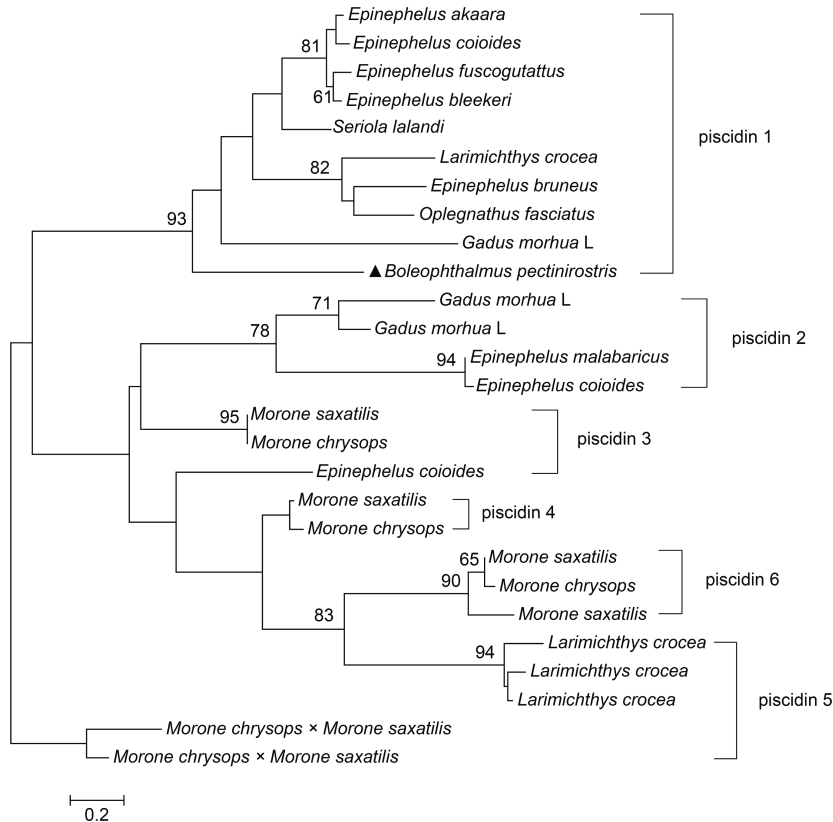


图 2 大弹涂鱼和其他动物 piscidin 全长氨基酸序列的系统进化树构建

Fig.2 The phylogenetic tree of the full-length piscidin sequences of mudskipper and other animals

注: 进化树中分叉处数字代表 1000 次重复抽样获得的置信度百分比, 分叉处只显示置信度大于 60% 的数字; 标尺长度数字表示每个位点发生 0.2 次置换。所有 piscidin 序列的 NCBI 登录号见表 1

表 2 Bppis1 的体外抑菌 MIC

Tab.2 MIC values of synthetic Bppis1 against bacteria *in vitro*

细菌名	分离株/菌株	培养基	培养温度(°C)	Bppis1 MIC (μg/mL)	卡那霉素 MIC (μg/mL)
创伤弧菌	ATCC279562	TSB	28	12.5	25
溶藻弧菌	ATCC17749	TSB	28	50	25
副溶血弧菌	ATCC33847	TSB	28	50	50
哈维氏弧菌	ATCC33866	TSB	28	25	1.563
鳗弧菌	ATCC19264	TSB	28	50	25
迟缓爱德华氏菌	Et-CD	LB	37	—	25
大肠杆菌	K12	LB	37	6.25	50
金黄色葡萄球菌	ATCC6538	LB	37	—	12.5
嗜水气单胞菌	ATCC7966	LB	37	25	6.25
单核细胞增生李斯特菌	ATCC19115	BHI	37	—	1.563
海豚链球菌	ATCC29178	BHI	28	—	6.25

注：“—”表示 Bppis1 在 100μg/mL 时无抑菌活性

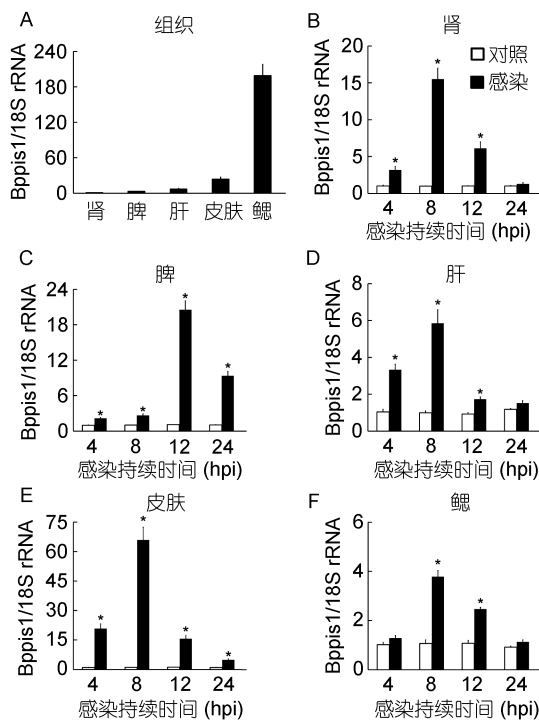


图 3 RT-qPCR 分析 Bppis1 mRNA 的表达

Fig.3 RT-qPCR analysis of Bppis1 mRNA

注：A. Bppis1 mRNA 在健康大弹涂鱼中的表达；B—F: Bppis1 mRNA 在迟缓爱德华氏菌感染大弹涂鱼组织中的表达。以 Bppis1 mRNA 与 18S rRNA 基因的比值作为 Bppis1 的相对表达量，*表示与对照组比较差异显著($P < 0.05$) ($n = 4$)

2.4 Bppis1 对 MO/MΦ 吞噬活性的影响

采用 Gallios Flow Cytometer 检测合成 Bppis1 肽对大弹涂鱼 MO/MΦ 吞噬能力的影响。结果显示，与对照组相比，经 1.0μg/mL 的合成 Bppis1 肽处理后，

MO/MΦ 对 FITC-*E. coli* 吞噬活性无明显变化，但对 FITC-*V. vulnificus* 吞噬活性显著增加，为对照组的 1.51 倍；经 10.0μg/mL 的合成 Bppis1 肽处理后，MO/MΦ 对 FITC-*E. coli* 和 FITC-*V. vulnificus* 的吞噬活性均无明显变化(图 4)。

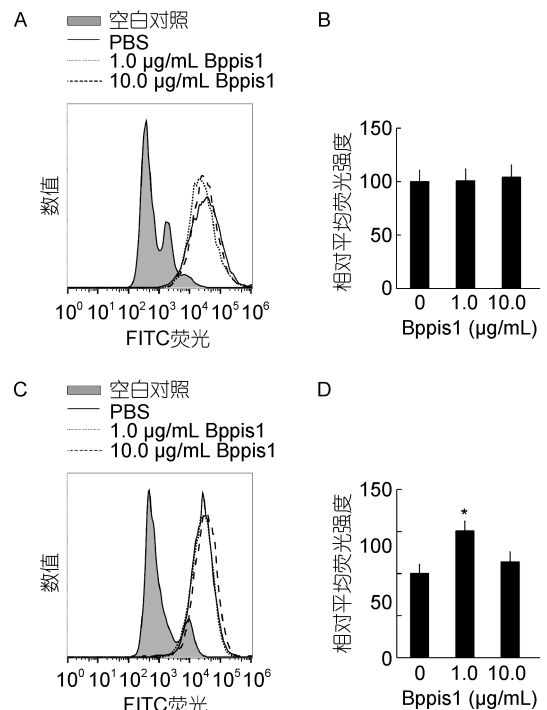


图 4 合成 Bppis1 肽对大弹涂鱼 MO/MΦ 吞噬活性的影响

Fig.4 Effect of synthetic Bppis1 on phagocytosis activity of mudskipper MO/MΦ

注：A 和 C: 吞噬流式图；B 和 D: 相对平均荧光强度。PBS 处理组的相对平均荧光强度数值设定为 100，实验组的相对平均荧光强度用 PBS 处理组数值的倍数表示，*表示与对照组比较差异显著($P < 0.05$) ($n = 3$)

3 讨论

Piscidin作为抗菌肽 piscidin 家族成员之一,是鱼类先天免疫的重要组成部分。本研究从大弹涂鱼 MO/MΦ 中鉴定了 Bppis1 基因 cDNA 序列。序列分析结果表明, Bppis1 具有与其他物种 piscidin 相似的结构特征,由信号肽、成熟肽和末端功能前区组成,其中信号肽序列最为保守,以 GEG 序列终止,成熟肽和末端功能前区序列变异较大。Bppis1 与其他已知物种 piscidin 序列之间同源性较低,与黄条鲮 piscidin 同源性最高,为 40.8%。系统进化树揭示, Bppis1 属于 piscidin 1 类,与黄条鲮 piscidin 进化相关性最高。

组织特征分析表明, Bppis1 mRNA 在健康大弹涂鱼各组织中广泛表达,且在鳃中表达量最高,与已报道的南极独角雪冰鱼(Buonocore *et al*, 2012)、条石鲷(Bae *et al*, 2016; Umasuthan *et al*, 2016)、罗非鱼(Peng *et al*, 2012)、大黄鱼(Niu *et al*, 2013)等鱼类研究结果较为一致。鳃是鱼类抵抗病原入侵的重要屏障之一, Bppis1 在鳃中表达量丰富,揭示其在大弹涂鱼天然免疫应答中扮演重要角色。多篇文献表明鱼类 piscidin 的高表达与感染病原体紧密相联,研究结果显示病原感染后 piscidin 的表达显著上调(Sun *et al*, 2007; Niu *et al*, 2013; Umasuthan *et al*, 2016; Zhuang *et al*, 2017)。例如,斜带石斑鱼感染副溶血弧菌后,脾中 ecPis-1 mRNA 表达在 3h 时显著上调($P<0.05$),体肾中 ecPis-2 和 ecPis-3 mRNA 表达均在 12h 显著上调,脾和头肾中 ecPis-2 和 ecPis-4 mRNA 在 12h 和 24h 时均显著上调(Zhuang *et al*, 2017);条石鲷感染条石鲷虹彩病毒(rock bream iridovirus, RBIV)、迟缓爱德华氏菌和海豚链球菌后,鳃和头肾中 Of-Pis1 mRNA 表达均在 3h 时显著上调,而且 RBIV 感染使得头肾中 Of-Pis1 mRNA 表达在 12h 达到峰值,约为对照组的 12 倍(Umasuthan *et al*, 2016)。本研究中,大弹涂鱼感染迟缓爱德华氏菌后,肾、脾、肝、皮肤和鳃中 Bppis1 mRNA 表达结果与上述论文中的结论相似,只是峰值数据和到达峰值的时间点略有差别,肾、肝、皮肤和鳃中 Bppis1 mRNA 表达均在 8h 时达到峰值,分别为对照组的 15.51、5.84、60.86 和 3.78 倍($P<0.05$),脾中 Bppis1 mRNA 表达在 12h 达到峰值,为对照组的 20.6 倍($P<0.05$),揭示 Bppis1 可能在大弹涂鱼抗迟缓爱德华氏菌感染过程中发挥重要作用。

研究发现, piscidin 对病毒、细菌、真菌和寄生虫均有抑制作用,主要通过破坏细菌、真菌和寄生虫的

细胞膜发挥直接的抑制活性(Chinchar *et al*, 2004; Campagna *et al*, 2007; Sung *et al*, 2008; Hayden *et al*, 2015; Li *et al*, 2016; Umasuthan *et al*, 2016; Pan *et al*, 2017)。体外抑菌实验结果表明,人工合成或重组表达的 piscidin 成熟肽具有广泛的抗菌活性,对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抑制作用(Bae *et al*, 2016; Umasuthan *et al*, 2016)。例如,在条石鲷中,重组表达的 piscidin (pOf-Pis)对 *Vibrio tapetis*、大肠杆菌和海豚链球菌均有较强抑菌活性, MIC 分别为 22.5、45 和 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对迟缓爱德华氏菌抑菌活性较弱, MIC 大于 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并且不能完全抑制迟缓爱德华氏菌的生长(Umasuthan *et al*, 2016);人工合成的 piscidin (RbPisc)对海豚链球菌、哈维氏弧菌和奥氏弧菌(*V. ordalii*)的抑菌活性非常强, MIC 均低于 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对大肠杆菌、溶藻弧菌、坎氏弧菌(*V. campbellii*)和创伤弧菌抗菌活性较强, MIC 分别为 1.9—3.9、0.9—1.9、1.9 和 3.9—7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对迟缓爱德华氏菌几乎没有抑制活性, MIC 为 250—500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Bae *et al*, 2016)。在罗非鱼中,人工合成的 piscidin 3 (TP3)和 piscidin 4 (TP4)对创伤弧菌、嗜水气单胞菌、溶藻弧菌、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、无乳链球菌(*Streptococcus galactiae*)和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)均有较强的抑菌活性,而 TP1、TP2 和 TP5 没有明显的抑菌活性(Peng *et al*, 2012)。在大黄鱼中,人工合成的 piscidin (Lcpis5lt3)对单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌和嗜水气单胞菌具有明显的抗菌效果,对迟缓爱德华氏菌、创伤弧菌、哈维氏弧菌和海豚链球菌无明显抑制作用(Yang *et al*, 2016)。本研究中,人工合成的 Bppis1 成熟肽对大肠杆菌和弧菌科 6 种细菌有明显的抗菌活性, MIC 为 6.25—50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,但对迟缓爱德华氏菌以及 3 株革兰氏阳性菌无抗菌活性,与上述研究结果有明显差异,说明不同鱼类的 piscidin 对相同细菌的抗菌活性不同, Bppis1 可能仅具有抗革兰氏阴性菌活性。

新近研究表明,罗非鱼 TP3 和 TP4 能通过影响免疫相关基因,如转移生长因子(transforming growth factor β , TGF- β)和细胞因子类白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-8 等 mRNA 的表达来发挥免疫调节功能(Lin *et al*, 2016; Pan *et al*, 2017)。此外, Huang 等(2015)研究发现, 2.5—10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TP4 不仅能刺激纤维原细胞系(Hs-68)和角化细胞系(HaCaT)的增殖,也能影响 TGF、血管上皮生长因子和表皮生长因子调节的

伤口闭合活性, 从而增加耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)感染大鼠的存活率。本研究发现, 大弹涂鱼 MO/MΦ 经 1.0μg/mL 的 Bppis1 处理后, 对创伤弧菌的吞噬作用显著增强, 揭示 Bppis1 也具有免疫调节功能, 可能通过促进免疫细胞的吞噬活性发挥作用, 但具体作用机制尚待进一步研究。

4 结论

本研究测定了大弹涂鱼 Bppis1 基因 cDNA 序列, 序列分析揭示其与黄条鲮 piscidin 序列最为相似。健康大弹涂鱼中, Bppis1 mRNA 在鳃中表达量最高; 感染迟缓爱德华氏菌后, Bppis1 mRNA 在大弹涂鱼肝、脾、肾、皮肤和鳃中表达量均显著上调。体外抑菌实验结果表明, 人工合成的 Bppis1 成熟肽对大肠杆菌和弧菌科 6 种细菌有明显的抗菌活性。大弹涂鱼 MO/MΦ 经 1.0μg/mL Bppis1 成熟肽处理后, 对创伤弧菌的吞噬作用显著增强。综上, Bppis1 对革兰氏阴性菌具直接的抗菌活性, 且与细菌诱导的免疫反应密切相关, 可能通过促进 MO/MΦ 的吞噬活性发挥作用。研究结果为进一步研究鱼类 piscidin 的生物学功能及其在鱼类病原体感染防御反应中的作用机制提供基础资料。

参 考 文 献

- 王克坚, 2011. 海洋鱼类和青蟹抗菌肽 hepcidin 和 scygonadin 的研究. 厦门大学学报(自然科学版), 50(2): 418—424
- 陈梅珍, 陈 炯, 陆新江等, 2010. 香鱼 hepcidin 基因的克隆、序列分析及组织表达特征. 动物学研究, 31(6): 595—600
- Bae J S, Jung J M, An C M *et al*, 2016. Piscidin: Antimicrobial peptide of rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 51: 136—142
- Bae J S, Shim H S, Hwang S D *et al*, 2014. Expression analysis and biological activity of moronecidin from rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(2): 345—353
- Brogden K A, 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3): 238—250
- Browne M J, Feng C Y, Booth V *et al*, 2011. Characterization and expression studies of Gaduscidin-1 and Gaduscidin-2; paralogous antimicrobial peptide-like transcripts from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Developmental & Comparative Immunology*, 35(3): 399—408
- Buonocore F, Randelli E, Casani D *et al*, 2012. A piscidin-like antimicrobial peptide from the icefish *Chionodraco hamatus* (Perciformes: Channichthyidae): molecular characterization, localization and bactericidal activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(5): 1183—1191
- Campagna S, Saint N, Molle G *et al*, 2007. Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. *Biochemistry*, 46(7): 1771—1778
- Chen J, Chen Q, Lu X J *et al*, 2016. The protection effect of LEAP-2 on the mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*) against *Edwardsiella tarda* infection is associated with its immunomodulatory activity on monocytes/macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 59: 66—76
- Chinchar V G, Bryan L, Silphadaung U *et al*, 2004. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology*, 323(2): 268—275
- Choi K Y, Chow L N, Mookherjee N, 2012. Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. *Journal of Innate Immunity*, 4(4): 361—370
- Cole A M, Weis P, Diamond G, 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18): 12008—12013
- Fernandes J M, Ruangsri J, Kiron V, 2010. Atlantic cod piscidin and its diversification through positive selection. *PLoS One*, 5(3): e9501
- Hancock R E, Haney E F, Gill E E, 2016. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nature Reviews Immunology*, 16(5): 321—334
- Hayden R M, Goldberg G K, Ferguson B M *et al*, 2015. Complementary effects of host defense peptides piscidin 1 and piscidin 3 on DNA and lipid membranes: biophysical insights into contrasting biological activities. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(49): 15235—15246
- Hilchie A L, Wuerth K, Hancock R E, 2013. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature Chemical Biology*, 9(12): 761—768
- Huang H N, Chan Y L, Wu C J *et al*, 2015. Tilapia piscidin 4 (TP4) stimulates cell proliferation and wound closure in MRSA-infected wounds in mice. *Marine Drugs*, 13(5): 2813—2833
- Iijima N, Tanimoto N, Emoto Y *et al*, 2003. Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *European Journal of Biochemistry*, 270(4): 675—686
- Lai Y, Gallo R L, 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, 30(3): 131—141
- Lauth X, Shike H, Burns J C *et al*, 2002. Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7): 5030—5039
- Lazarovici P, Primor N, Loew L M, 1986. Purification and pore-forming activity of two hydrophobic polypeptides from the secretion of the Red Sea Moses sole (*Pardachirus marmoratus*). *Journal of Biological Chemistry*, 261(35): 16704—16713
- Li H X, Lu X J, Li C H *et al*, 2014. Molecular characterization

- and functional analysis of two distinct liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish & Shellfish Immunology*, 38(2): 330—339
- Li Z P, Chen D W, Pan Y Q *et al*, 2016. Two isoforms of piscidin from Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*: Expression and functional characterization. *Fish & Shellfish Immunology*, 57: 222—235
- Lin W C, Chang H Y, Chen J Y, 2016. Electrotransfer of the tilapia piscidin 3 and tilapia piscidin 4 genes into skeletal muscle enhances the antibacterial and immunomodulatory functions of *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 50: 200—209
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Lu X J, Chen J, Huang Z A *et al*, 2011. Identification and characterization of a novel cathelicidin from ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(1): 52—57
- Niu S F, Jin Y, Xu X *et al*, 2013. Characterization of a novel piscidin-like antimicrobial peptide from *Pseudosciaena crocea* and its immune response to *Cryptocaryon irritans*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(2): 513—524
- Pan C Y, Chen J Y, Cheng Y S *et al*, 2007. Gene expression and localization of the epinecidin-1 antimicrobial peptide in the grouper (*Epinephelus coioides*), and its role in protecting fish against pathogenic infection. *DNA and Cell Biology*, 26(6): 403—413
- Pan C Y, Tsai T Y, Su B C *et al*, 2017. Study of the antimicrobial activity of tilapia piscidin 3 (TP3) and TP4 and their effects on immune functions in hybrid tilapia (*Oreochromis* spp.). *PLoS One*, 12(1): e0169678
- Peng K C, Lee S H, Hour A L *et al*, 2012. Five different piscidins from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: analysis of their expressions and biological functions. *PLoS One*, 7(11): e50263
- Ruangsri J, Salger S A, Caipang C M *et al*, 2012. Differential expression and biological activity of two piscidin paralogues and a novel splice variant in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 32(3): 396—406
- Salerno G, Parrinello N, Roch P *et al*, 2007. cDNA sequence and tissue expression of an antimicrobial peptide, dicentracin; a new component of the moronecidin family isolated from head kidney leukocytes of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146(4): 521—529
- Silphaduang U, Noga E J, 2001. Antimicrobials: Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature*, 414(6861): 268—269
- Subramanian S, Ross N W, MacKinnon S L, 2009. Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa* L. *Marine Biotechnology*, 11(6): 748—757
- Sun B J, Xie H X, Song Y *et al*, 2007. Gene structure of an antimicrobial peptide from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), suggests that moronecidins and pleurocidins belong in one family: the piscidins. *Journal of Fish Diseases*, 30(6): 335—343
- Sung W S, Lee J, Lee D G, 2008. Fungicidal effect and the mode of action of piscidin 2 derived from hybrid striped bass. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(3): 551—555
- Tamura K, Peterson D, Peterson N *et al*, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731—2739
- Umasathan N, Mothishri M S, Thulasitha W S *et al*, 2016. Molecular, genomic, and expressional delineation of a piscidin from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) with evidence for the potent antimicrobial activities of Of-Pis1 peptide. *Fish & Shellfish Immunology*, 48: 154—168
- Wan M, van der Does A M, Tang X *et al*, 2014. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 95(6): 971—981
- Yang J, Lu X J, Chai F C *et al*, 2016. Molecular characterization and functional analysis of a piscidin gene in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Zoological Research*, 37(6): 347—355
- Yin Z X, He W, Chen W J *et al*, 2006. Cloning, expression and antimicrobial activity of an antimicrobial peptide, epinecidin-1, from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 253(1): 204—211
- Zhou Q J, Su Y Q, Niu S F *et al*, 2014. Discovery and molecular cloning of piscidin-5-like gene from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2): 417—420
- Zhu J, Wang H, Wang J *et al*, 2017. Identification and characterization of a β -defensin gene involved in the immune defense response of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Molecular Immunology*, 85: 256—264
- Zhuang Z R, Yang X D, Huang X Z *et al*, 2017. Three new piscidins from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): Phylogeny, expression and functional characterization. *Fish & Shellfish Immunology*, 66: 240—253

PISCIDIN 1 OF MUDSKIPPER *BOLEOPHTHALMUS PECTINIROSTRIS*: MOLECULAR CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS

GUAN Feng^{1,2}, LI Chang-Hong¹, NIE Li¹, MIAO Liang¹, CHEN Jiong¹

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract Piscidin-like antimicrobial peptides, which have broad-spectrum activities, exert an important role in fish's innate immunity. In this study, we obtained the complete cDNA sequence of piscidin 1 (Bppis1) from mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*, with de novo transcriptome sequencing of mudskipper monocytes/macrophages (MO/M Φ). The full-length of cDNA sequence of Bppis1 was 327 nucleotides, containing a 207 nucleotides open reading frame (ORF) encoding 68 amino acids. The deduced molecular weight and isoelectric point of the deduced protein was 7.7kDa and 5.51 respectively. The multiple sequence alignment of complete amino acid sequences revealed that Bppis1 possessed the piscidin family signature motifs, and a conserved sequence in signal peptide terminating at the motif GEG. Bppis1 shared the highest amino acid sequence identity (40.8%) with that of yellowtail amberjack (*Seriola lalandi*). In addition, the phylogenetic tree confirmed that Bppis1 belonged to fish piscidin 1 cluster and was most closely related to yellowtail amberjack piscidin. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analysis showed that Bppis1 mRNA had the highest expression level in gill of healthy mudskipper. Upon infection with *Edwardsiella tarda*, Bppis1 mRNA expression increased significantly in the liver, spleen, kidney, gill and skin. The result of antimicrobial test showed that the synthetic mature peptide of Bppis1 exhibited relatively broad antimicrobial activity in vitro, but no antimicrobial activity against *Edwardsiella tarda* and three gram-positive bacteria. After treatment with 1.0 μ g/mL Bppis1 mature peptide, the phagocytosis of FITC-*Vibrio vulnificus* by MO/M Φ was enhanced significantly. Therefore, Bppis1 plays a critical role in the innate immune system of mudskipper, and may be a potential therapeutic agent against pathogen invasion.

Key words *Boleophthalmus pectinirostris*; piscidin; *Edwardsiella tarda*; antimicrobial activity; phagocytic activity