

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)浸泡免疫鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)灭活疫苗后 11 种免疫相关基因的表达变化*

邢 婧 王 洋 宋晓青 唐小千 绳秀珍 战文斌^①

(中国海洋大学水产动物病害与免疫学研究室 青岛 266003)

摘要 制备鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)全菌灭活疫苗浸泡免疫牙鲆(*Paralichthys olivaceus*), 分别于免疫后 0h、4h、8h、12h、24h、48h、72h、96h、7d、14d 取脾、头肾、鳃组织, 提取 mRNA, 应用实时荧光定量 PCR 法检测 3 种组织中 Toll-like 受体(TLR)2、TLR5M、髓样分化因子 MyD88、核转录因子(NF)- κ B、白介素(IL)-6、干扰素(IFN) γ 、趋化因子 CXC、补体 C3、热休克蛋白(HSP)70、T 细胞表面分子 CD4、自然杀伤细胞增强因子(NKEF)十一种免疫相关基因的表达变化。结果显示, 免疫后除 TLR5M、NKEF 以外其它九种基因表达均显著上调, 表达高峰出现在 24—72h, 基因表达量最高值是对照组的 2—12 倍; TLR5M 的表达量与对照组无显著差异; NKEF 基因的表达量出现显著下调趋势, 下调峰值出现在 24h, 为对照组的 0.49 倍。在脾脏和肾脏中, NF- κ B 和 CD4 基因的表达峰值高于鳃; 在脾脏和鳃中, IL-6、HSP70 和 NKEF 基因的表达峰值均高于头肾; IFN γ 、CXC、C3 和 MyD88 在三个组织中的表达峰值差异不大。在三个组织中每个基因表达峰值出现的时间基本一致。结果表明, 浸泡免疫后, IL-6 和 HSP70 基因在三个组织中的表达变化迅速、且丰度高, 可以作为疫苗浸泡免疫后的效果评价指标; 除肾和脾主要的免疫器官外, 鳃也是浸泡免疫后重要的检测组织。研究结果为浸泡免疫疫苗效果的评价积累了数据。

关键词 牙鲆; 鳃弧菌疫苗; 浸泡免疫; 免疫相关基因

中图分类号 S942.5 doi: 10.11693/hyh20150200043

随着海水养殖业的不断发展, 构建健康、无公害的养殖体系已经成为一种趋势, 接种疫苗是防治鱼类细菌、病毒性疾病的有效方法(Ellis, 1988)。浸泡免疫方式接种疫苗具有省时省力、节约成本且对鱼体刺激小等优点, 是疫苗接种最便捷的途径。为研究免疫后鱼体免疫系统的变化以及疫苗的接种效果, 常检测一些非特异性指标及特异性指标, 如鱼类血清及黏液抗体水平变化(刘雨果等, 2011)、免疫相关酶活性(Dan *et al.*, 2013)、淋巴细胞数量(Tang *et al.*, 2010)、呼吸爆发(Dan *et al.*, 2013)、补体活性(Dan *et al.*, 2013)

等。近年来, 从基因水平对疫苗免疫效果进行研究的报道越来越多, 有研究发现, 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)浸泡免疫斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)后, MHC II 类分子在鳃、皮肤、头肾、脾脏和后肠中表达量均有不同程度的上调(王庆等, 2010); 浸泡免疫鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)灭活疫苗后, 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因在皮肤、鳃、脾脏中有较高水平的上调表达(丁冰洁等, 2013)。虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)浸泡免疫鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)后血清淀粉样蛋白

* 国家重点基础研究发展计划(973)项目, 2012CB114406 号; 国家科技支撑计划项目, 2012BAD17B02 号; 国家自然科学基金项目, 31172429 号, 31302216 号。邢婧, 博士, E-mail: xingjing@ouc.edu.cn

通讯作者: 战文斌, 教授, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-02-02, 收修改稿日期: 2015-04-13

A(SSA)、白介素(IL)8、肿瘤坏死因子(INF) α 、Toll-like受体(TLR)5、T细胞表面标志(TCR) β 、IgT基因在脾脏中的表达量出现不同程度的上调,其中SSA基因的上调最为显著(Evenhuis *et al.*, 2012);浸泡免疫杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)后,虹鳟鱼鳃和肾中IL-1 β 、IL-8、CD4、IgM和IgD基因的表达量均呈现上调的趋势,IL-1 β 基因在肾脏中的表达量最高可达对照组的10倍(Cobo Labarca *et al.*, 2015)。这些研究结果均表明疫苗免疫能引起鱼类诸多免疫相关基因的快速变化。但浸泡免疫后多组织多基因表达变化的研究还较少,本文通过制备鳃弧菌全菌灭活疫苗,将牙鲈经浸泡免疫,利用荧光定量PCR法研究免疫后牙鲈脾、头肾、鳃3种组织中TLR2、TLR5M、髓样分化因子MyD88、核转录因子(NF)- κ B、IL-6、IFN γ 、趋化因子CXC、补体C3、HSP70、CD4、自然杀伤细胞增强因子(NKEF)十一种免疫相关基因表达的动态变化,从基因水平探究浸泡免疫对牙鲈免疫应答的影响,筛选浸泡免疫效果的评价指标。

1 材料与方法

1.1 实验动物

牙鲈购自山东日照某牙鲈养殖场,体长为10—13cm,实验前将健康牙鲈在水槽中暂养1周,水温为20—22 $^{\circ}$ C, pH为7.4—7.8,期间连续充气,每天换水一次,投喂标准饲料一次。

1.2 鳃弧菌全菌灭活疫苗的制备

鳃弧菌由本实验室保存,将菌种接种于2216 E固体培养基中,28 $^{\circ}$ C培养24h,挑取单菌落至2216 E液体培养基中震荡培养24h,之后6000g 4 $^{\circ}$ C离心15min,去上清液,无菌磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)清洗沉淀3次,最后以含0.5%甲醛(V/V)的PBS重悬,4 $^{\circ}$ C放置48h,平板培养检测无活菌存在,再以PBS离心洗涤3次,4 $^{\circ}$ C保存备用。

1.3 牙鲈的免疫及取样

将暂养后的牙鲈随机分为2组,每组60尾。第一组浸泡于浓度为 1×10^8 CFU/mL灭活疫苗菌液中,连续充气浸泡30min;第二组海水充气浸泡30min作为对照。处理后于0h、4h、8h、12h、24h、48h、72h、96h、7d、14d分别在各组随机取3尾牙鲈,分别取脾、头肾、鳃3种组织,同一时间点来源于3尾牙鲈同一组织的样品混匀后用于检测比较11种免疫相关基因表达的变化及差异。

1.4 RNA的提取及cDNA的合成

取各组织样品约20mg,应用Trizol法提取总

RNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,以微量核酸测定仪(NanoDrop 8000, Thermo, 美国)测定RNA的浓度和纯度。提取的RNA利用反转录试剂盒(Applied Biosystems)经RT-PCR合成cDNA。所得cDNA样品-20 $^{\circ}$ C保存,备用。

1.5 荧光定量PCR所用引物的设计与验证

根据已知的牙鲈核糖体RNA(18S RNA)、TLR2、TLR5M、MyD88、NF- κ B、IL-6、IFN γ 、CXC、C3、HSP70、CD4、NKEF基因序列,采用Primer Premier 5.0软件设计各基因特异性引物,随机选取对照组的脾、头肾、鳃的cDNA样品,进行PCR扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测,选择产物为单一条带的引物,利用SYBR[®] Premix Ex Taq试剂盒(Takara, 美国)在荧光定量PCR仪(Light Cycler[®] 480 II PCR, Roche, 德国)上进行扩增,最终以扩增反应产生的溶解曲线是单一波峰的引物作为荧光定量PCR的特异性引物。

1.6 荧光定量PCR检测

采用微量核酸测定仪测定所有取样组织cDNA样品的浓度,用DEPC水(焦碳酸二乙酯灭菌水)调整所有组织cDNA浓度统一为0.05 μ g/ μ L,以18S RNA为内参,利用SYBR[®] Premix Ex Taq试剂盒在Light Cycler[®] 480 II PCR仪上进行扩增,扩增体系为20 μ L,即:模板cDNA 2 μ L,正反向引物各0.4 μ L(引物浓度为10 μ mol/L),反应混合液10 μ L,无菌水7.2 μ L。为减小系统误差每个样品设置3个重复实验,扩增的条件为:95 $^{\circ}$ C 30s, 1个循环;95 $^{\circ}$ C 10s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 45个循环;95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 95 $^{\circ}$ C 5s, 1个循环;40 $^{\circ}$ C冷却。再次确认每个样品扩增反应产生的溶解曲线是单一波峰,并获取C_t值(循环阈值),用于数据处理及分析。

1.7 数据处理及分析

荧光定量PCR所得数据按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法(纪冬等, 2009)进行处理,所有数值均用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。利用Origin 8.0软件作图,SPSS19.0软件进行数据统计分析,采用T-检验分析不同时间点基因表达量的差异,以 $P < 0.05$ 作为差异显著的标准。

2 结果与分析

2.1 荧光定量PCR所用引物的获得

经过常规PCR-琼脂糖凝胶电泳及荧光定量PCR溶解曲线验证,最终获得11种基因以及18S RNA内参的特异性引物,各基因引物名及引物序列、退火温度等信息见表1。应用特异性引物进行荧光定量PCR,所有检测样品的扩增结果均为单一产物。

表 1 荧光定量 PCR 所用引物
Tab.1 Primers used in quantitative real-time PCR

引物名	引物序列	退火温度(°C)	NCBI 登录号
18S RNA-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	60	EF126037
18S RNA-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTAC		
TLR2 -F	CTGCGGTGTAGCGTTAGTGG	58	AB109393
TLR2-R	CGAAGGCATCATAGGAAAGC		
TLR5M -F	TCCAGCATCATTACCAA	58	AB562152
TLR5M -R	TCATACCCAAGTTAGCG		
MyD88-F	AACGCTGAGATGAGATTGAA	58	AB241074
MyD88-R	ATGGTGAGGGAGGAAGTGAC		
NF-κB -F	GCTTCTCTGGGTAGCACACC	58	HM771267
NF-κB -R	GGGTTCAGAAGGTCCACAAA		
CD4-F	CCAGTGGTCCCCACCTAAAA	60	AB643634
CD4-R	CACTTCTGGGACGGTGAGATG		
IFN-γ-F	TGTCAGGTCAGAGGATCACACAT	58	AB435093
IFN-γ-R	GCAGGAGTTCTGGATGGTTT		
CXC-F	ATTCGATTACTGCACTCTTGG	58	AB809049.1
CXC-R	GCGACTCGTCTACCGCTCTCTAC		
IL-6-F	CTCCGCAATGGGAAGGTG	58	DQ267937
IL-6-R	GATGGATGGGTGAATAA		
C3 -F	CCTTTGCCTCTATCGCCTCA	58	AB021653
C3 -R	CCTTGGTCGGATGGTTCA		
HSP70-F	TCCTCATGGGTGACACTTCG	58	AF053059
HSP70-R	TTGTCCTTGGTCATGGCTCT		
NKEF-F	ATGGCTGCAGGCAAAGCACA	60	JQ307466
NKEF-R	TTAATGCTTGGCGAAGAAGT		

2.2 TLR2 在脾脏、头肾和鳃中的表达

脾脏中, TLR2 基因的表达量自 12h 起显著高于对照组, 48h 达到最高值, 是对照组的 12.15 倍, 而后逐渐下降, 至 14d 时降至与对照组无显著差异(图 1a); 头肾中, TLR2 基因的表达量自 4h 起显著高于对照组, 48h 达到最高值, 是对照组的 5.40 倍, 而后逐渐下降, 至 14d 与对照组无显著差异(图 1b); 鳃中, TLR2 自 4h

起显著高于对照组, 之后快速上升, 24h 达到最高值, 是对照组的 3.66 倍, 之后逐渐下降, 至 14d 时与对照组无显著差异(图 1c)。

2.3 TLR5M 在脾脏、头肾和鳃中的表达

在脾脏中, TLR5M 基因的表达量虽然略有变化, 但相对于对照组变化不显著(图 2a); 头肾中, TLR5M 基因的表达相对于对照组也无显著变化(图 2b); 鳃中,

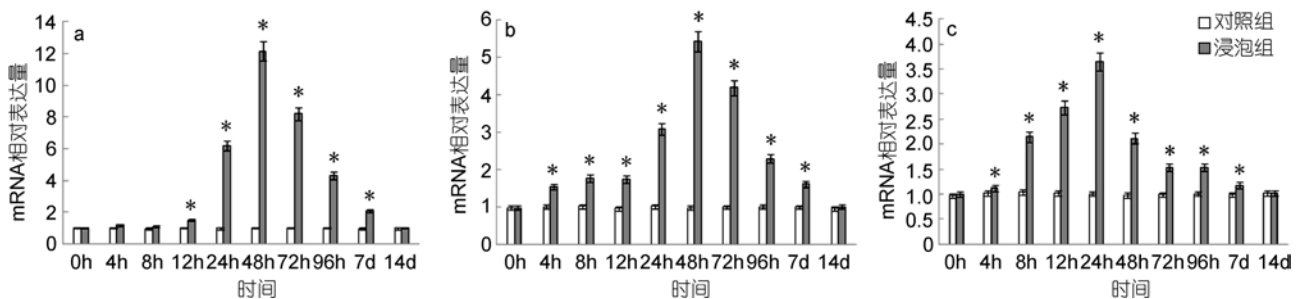


图 1 鳃弧菌灭活疫苗免疫后牙鲆脾(a)、头肾(b)、鳃(c)中 TLR2 相对表达量

Fig.1 Expression of TLR2 in spleen (a), head kidney (b) and gills (c) post immunization with formalin inactivated *V. anguillarum* “*”表示该浸泡组与对照组之间有显著差异($P < 0.05$)

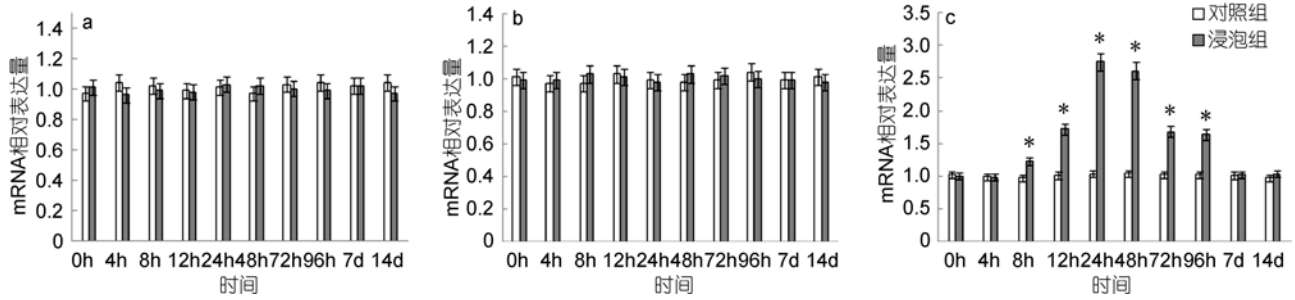


图2 鳃弧菌灭活疫苗免疫后牙鲆脾(a)、头肾(b)、鳃(c)中 TLR5M 相对表达量

Fig.2 Expression of TLR5M in spleen (a), head kidney (b) and gills (c) post immunization with formalin inactivated *V. anguillarum* “*”表示该浸泡组与对照组之间有显著差异($P<0.05$)

TLR5M 基因的表达呈现显著上调, 表达量自 8h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 2.75 倍, 而后逐渐下降, 至 7d 时降至与对照组无显著差异(图 2c)。

2.4 MyD88 在脾脏、头肾和鳃中的表达

脾脏中, MyD88 基因的表达量自 12h 起显著高于对照组, 48h 达到最高值, 是对照组的 4.82 倍, 而后逐渐下降, 至 7d 时降至与对照组无显著差异(图 3a); 头肾中, MyD88 基因的表达量自 24h 起显著高于对照组, 48h 达到最高值, 是对照组的 3.04 倍, 之后维持在较高水平, 96h 后逐渐下降, 至 14d 时降至与对照组

无显著差异(图 3b); 鳃中, MyD88 基因的表达量自 4h 起显著高于对照组, 略有下降后再次上升, 48h 达到最高值, 是对照组的 2.58 倍, 之后逐渐下降, 至 14d 时与对照组无显著差异(图 3c)。

2.5 NF-κB 在脾脏、头肾和鳃中的表达

脾脏中, NF-κB 基因的表达量自 4h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 10.43 倍, 而后逐渐下降, 至 14d 时降至与对照组无显著差异(图 4a); 头肾中, NF-κB 基因的表达量自 4h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 8.33 倍, 而后逐渐下降, 至 7d 时降至与对照组无显著差异(图 4b); 鳃中,

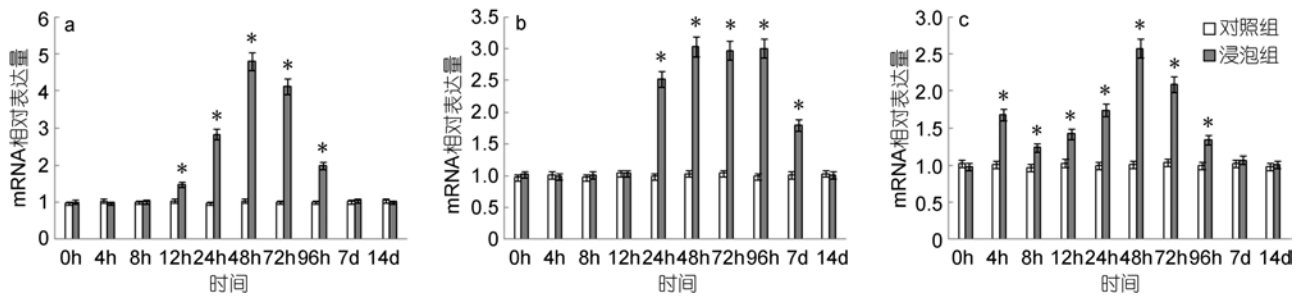


图3 鳃弧菌灭活疫苗免疫后牙鲆脾(a)、头肾(b)、鳃(c)中 MyD88 相对表达量

Fig.3 Expression of MyD88 in spleen (a), head kidney (b) and gills (c) post immunization with formalin inactivated *V. anguillarum* “*”表示该浸泡组与对照组之间有显著差异($P<0.05$)

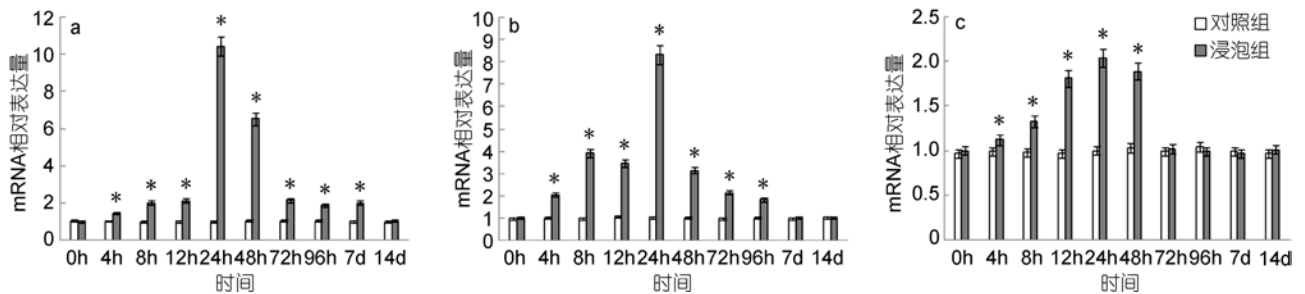


图4 鳃弧菌灭活疫苗免疫后牙鲆脾(a)、头肾(b)、鳃(c)中 NF-κB 相对表达量

Fig.4 Expression of NF-κB in spleen (a), head kidney (b) and gills (c) post immunization with formalin inactivated *V. anguillarum* “*”表示该浸泡组与对照组之间有显著差异($P<0.05$)

NF- κ B 基因的表达量自 4h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 2.04 倍, 之后逐渐下降, 至 72h 时与对照组无显著差异(图 4c)。

2.6 CD4 在脾脏、头肾和鳃中的表达

脾脏中, CD4 表达量自免疫后 12h 开始出现显著高于对照组, 至 96h 达到峰值, 为对照组的 6.62 倍, 之后呈现逐渐下降的趋势(图 5a); 头肾中, CD4 基因的表达量自 8h 起显著高于对照组, 72h 达到最高值, 是对照组的 6.25 倍, 而后逐渐下降(图 5b); 鳃中, CD4 基因的表达量自 8h 起显著高于对照组, 72h 达到最高值, 是对照组的 2.15 倍, 之后逐渐下降, 至 14d

时降至与对照组无显著差异(图 5c)。

2.7 IL-6 在脾脏、头肾和鳃中的表达

脾脏中, IL-6 基因的表达量自 4h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 10.65 倍, 而后逐渐下降, 至 7d 时降至与对照组无显著差异(图 6a); 头肾中, IL-6 基因的表达量自 8h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 7.93 倍, 而后逐渐下降, 至 7d 时降至与对照组无显著差异(图 6b); 鳃中, IL-6 基因的表达量自 4h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 10.42 倍, 之后逐渐下降, 至 7d 时与对照组无显著差异(图 6c)。

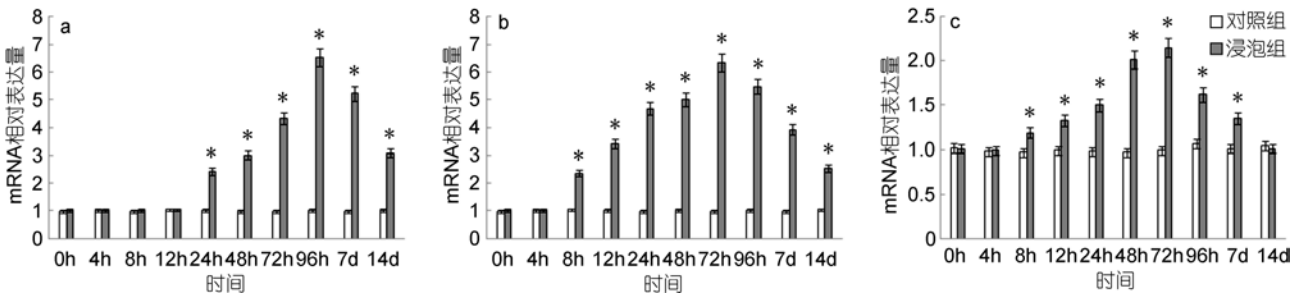


图 5 鳃弧菌灭活疫苗免疫后牙鲆脾(a)、头肾(b)、鳃(c)中 CD4 相对表达量

Fig.5 Expression of CD4 in spleen (a), head kidney (b) and gills (c) post immunization with formalin inactivated *V. anguillarum* “*”表示该浸泡组与对照组之间有显著差异($P < 0.05$)

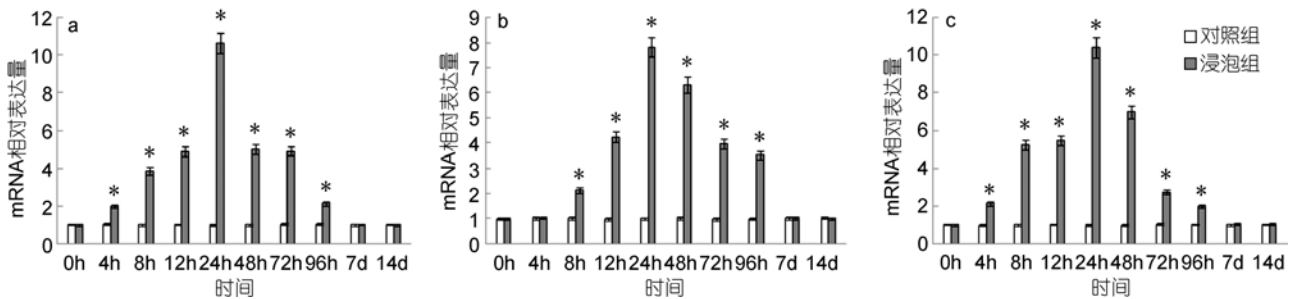


图 6 鳃弧菌灭活疫苗免疫后牙鲆脾(a)、头肾(b)、鳃(c)中 IL-6 相对表达量

Fig. 6 Expression of IL-6 in spleen (a), head kidney (b) and gills (c) post immunization with formalin inactivated *V. anguillarum* “*”表示该浸泡组与对照组之间有显著差异($P < 0.05$)

2.8 IFN γ 在脾脏、头肾和鳃中的表达

IFN γ 基因在脾脏和头肾 2 种组织中的表达均呈现先上升后下降的趋势。脾脏中, IFN γ 基因的表达量自 8h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 2.76 倍, 而后逐渐下降, 48h 出现小幅度上调, 至 7d 时降至与对照组无显著差异(图 7a); 头肾中, IFN γ 基因的表达量自 4h 起显著高于对照组, 48h 达到最高值, 是对照组的 3.77 倍, 而后逐渐下降, 96h 时与对照组无显著差异, 而后出现短暂的上升, 至 14d 时降至与对照组无显著差异(图 7b); 鳃中, IFN γ 基因的表

达量自 8h 起显著高于对照组, 之后快速上升, 24h 达到最高值, 是对照组的 2.30 倍, 之后逐渐下降, 至 14d 时与对照组无显著差异(图 7c)。

2.9 CXC 在脾脏、头肾和鳃中的表达

脾脏中, CXC 基因的表达量自 8h 起显著高于对照组, 48h 达到最高值, 是对照组的 3.28 倍, 而后逐渐下降, 至 7d 时降至与对照组无显著差异(图 8a); 头肾中, CXC 基因的表达量自 48h 起显著高于对照组, 72h 达到最高值, 是对照组的 3.33 倍, 而后逐渐下降, 至 14d 时降至与对照组无显著差异(图 8b); 鳃中,

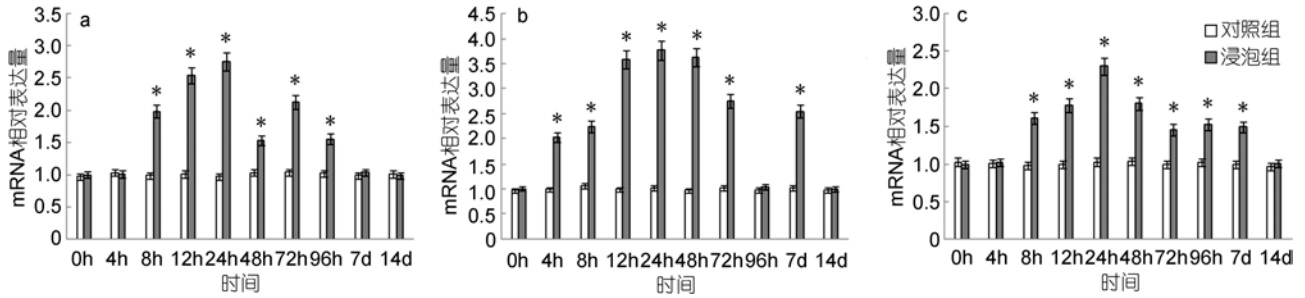


图7 鳃弧菌灭活疫苗免疫后牙鲈脾(a)、头肾(b)、鳃(c)中 IFN γ 相对表达量

Fig.7 Expression of IFN γ in spleen (a), head kidney (b) and gills (c) post immunization with formalin inactivated *V. anguillarum* “*”表示该浸泡组与对照组之间有显著差异($P < 0.05$)

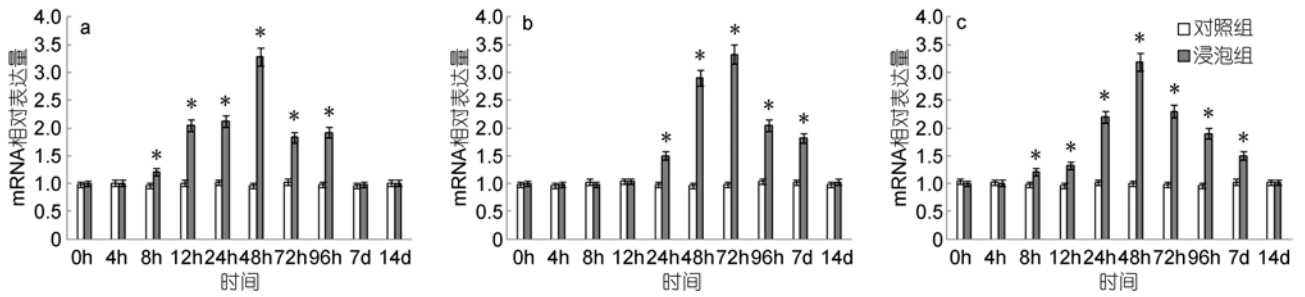


图8 鳃弧菌灭活疫苗免疫后牙鲈脾(a)、头肾(b)、鳃(c)中 CXC 相对表达量

Fig.8 Expression of CXC in spleen (a), head kidney (b) and gills (c) post immunization with formalin inactivated *V. anguillarum* “*”表示该浸泡组与对照组之间有显著差异($P < 0.05$)

CXC 基因的表达量自 8h 起显著高于对照组, 48h 达到最高值, 是对照组的 3.19 倍, 之后逐渐下降, 至 14d 时与对照组无显著差异(图 8c)。

2.10 C3 在脾脏、头肾和鳃中的表达

免疫后 C3 在脾脏、头肾和鳃组织中的表达量均有上调, 但上调幅度都较低, 峰值是对照组的 3 倍左右。脾脏中, 自 8h 起显著高于对照组, 48h 达到最高

值, 为对照组的 2.52 倍, 而后有所下降, 7—14d 时又出现小幅度上调表达(图 9a); 头肾中, C3 的表达量自 4h 起显著高于对照组, 48h 达到最高值, 为对照组的 3.71 倍, 而后逐渐下降, 至 14d 与对照组无显著差异(图 9b); 鳃中, C3 的表达量自 8h 起显著高于对照组, 48h 达到最高值, 为对照组的 2.73 倍, 之后逐渐下降, 至 7d 与对照组无显著差异(图 9c)。

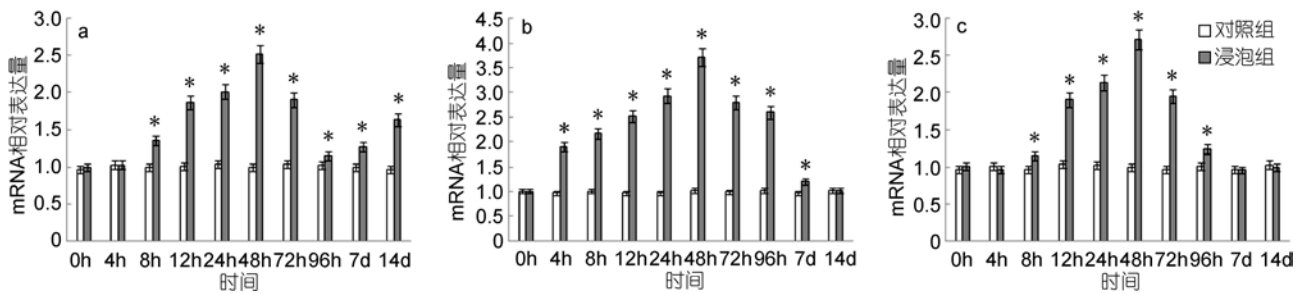


图9 鳃弧菌灭活疫苗免疫后牙鲈脾(a)、头肾(b)、鳃(c)中 C3 相对表达量

Fig.9 Expression of C3 in spleen (a), head kidney (b) and gills (c) post immunization with formalin inactivated *V. anguillarum* “*”表示该浸泡组与对照组之间有显著差异($P < 0.05$)

2.11 HSP70 在脾脏、头肾和鳃中的表达

脾脏中, HSP70 基因的表达量自 4h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 7.69 倍, 而后逐渐下降, 至 7d 时降至与对照组无显著差异(图 10a);

头肾中, HSP70 基因的表达量自 8h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 4.67 倍, 而后逐渐下降, 至 14d 时降至与对照组无显著差异(图 10b); 鳃中, HSP70 基因的表达量自 4h 起显著高于对照组,

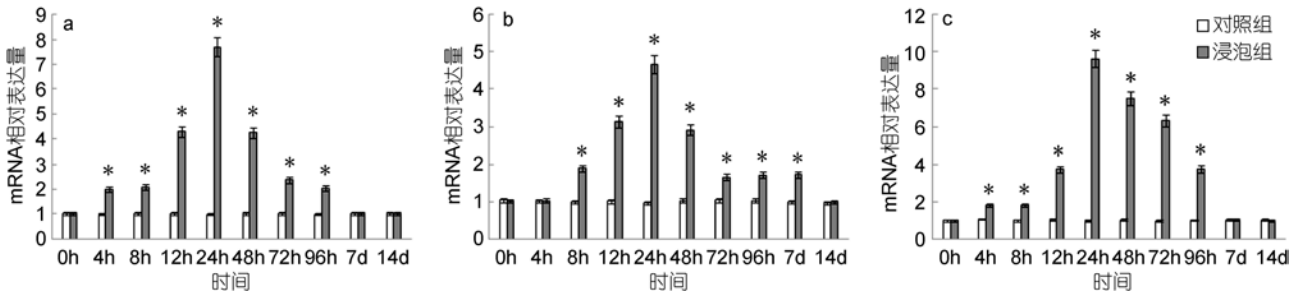


图 10 鳃弧菌灭活疫苗免疫后牙鲆脾(a)、头肾(b)、鳃(c)中 HSP70 相对表达量

Fig.10 Expression of HSP70 in spleen (a), head kidney (b) and gills (c) post immunization with formalin inactivated *V. anguillarum* “*”表示该浸泡组与对照组之间有显著差异($P < 0.05$)

24h 达到最高值, 是对照组的 9.65 倍, 之后逐渐下降, 至 7d 时降至与对照组无显著差异(图 10c)。

2.12 NKEF 在脾脏、头肾和鳃中的表达

脾脏中, NKEF 基因的表达量自 8h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 3.11 倍, 而后逐渐下降, 至 7d 时恢复对照组水平(图 11a); 头肾

中, NKEF 基因的表达量自 4h 起显著低于对照组, 48h 达到最低值, 是对照组的 0.49 倍, 而后逐渐上调(图 11b); 鳃中, NKEF 基因的表达量自 4h 起显著高于对照组, 24h 达到最高值, 是对照组的 4.39 倍, 之后逐渐下降, 至 14d 时与对照组无显著差异(图 11c)。

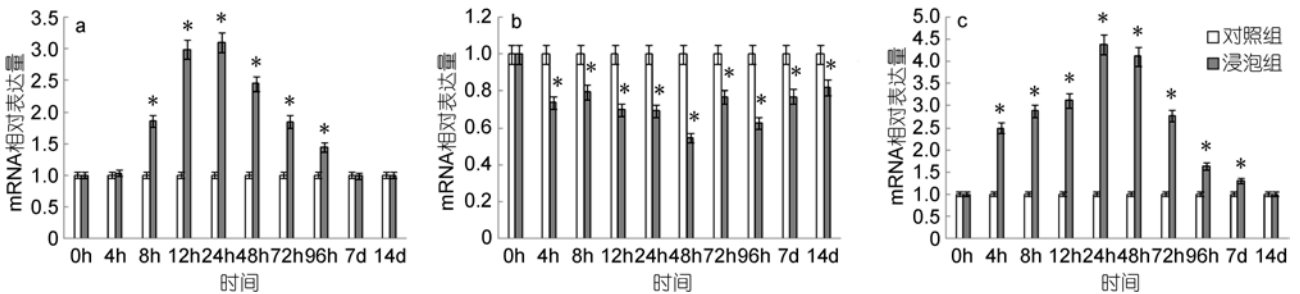


图 11 鳃弧菌灭活疫苗免疫后牙鲆脾(a)、头肾(b)、鳃(c)中 NKEF 相对表达量

Fig.11 Expression of NKEF in spleen (a), head kidney (b) and gills (c) post immunization with formalin inactivated *V. anguillarum* “*”表示该浸泡组与对照组之间有显著差异($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 11 种基因表达量变化的总体趋势

本实验结果显示, 浸泡免疫方式能引起牙鲆 11 种免疫相关基因在三种组织中的显著上调或下调表达。TLR2、TLR5M、NF- κ B 和 MyD88 是 TLR 信号通路的关键分子, TLR2 可识别合成的三酰脂肽 Pam3CSK4 和革兰氏阳性细菌的脂肽(Wei *et al.*, 2011); 在哺乳动物中, 膜结合的 TLR5 可以识别细菌的鞭毛蛋白成分, TLR5M 基因依赖 MyD88 途径激活鞭毛介导的 NF- κ B, 之后诱导前炎性细胞因子(白细胞介素和肿瘤坏死因子等)和 I 型干扰素的产生(Hwang *et al.*, 2010), 由 I 型干扰素介导直接的防御反应, 而 MyD88 是除 TLR3 以外所有 TLRs 的信号转导因子(Tang *et al.*, 2012)。CD4 是 T 细胞重要的表面分子, CD4⁺T 细胞具有辅助性 T 细胞的功能, 是 MHC II 类分子的受体,

在机体特异性免疫识别外源性抗原中具有重要意义(Kato *et al.*, 2013)。IL-6 是由辅助性 T 细胞分泌的一种多效的细胞因子, 有效促进 B 细胞的增殖分化和 T 细胞的成熟, 在非特异性及特异性免疫应答中都能发挥重要的调节作用, 在炎症反应的早期即可大量表达(Naka *et al.*, 2002)。IFN γ 属于 I 型干扰素, 除具有抗病毒、抗增殖活性外, 其主要生物学活性为免疫调节作用(Yang *et al.*, 2013)。HSP70 可作为分子伴侣, 参与蛋白质代谢, 协助蛋白质折叠、组装及转运, 并能降解错误装配的蛋白质等, 它的表达受外界环境及机体自身变化的调控, 能够在外源病原体刺激机体时发挥应激作用(Cui *et al.*, 2011)。CXC 能够募集免疫细胞迁移, 在炎症反应及病原感染中发挥重要作用。C3 是存在于血清中的具有非特异性抵抗作用的体液分子, 是补体活化途径的重要因子, 发挥直接的

抗微生物作用和调理作用,在鱼类免疫防御机制中发挥着重要作用(陈勇等,2008)。NKEF 最初在人类红细胞中克隆得到,是一种可溶性因子,属于一个保守的 Prx 基因家族,从原核生物到高等哺乳动物中均有发现,它可以增强自然杀伤细胞的细胞毒性活动,从而促进机体非特异性免疫的发生(孙晶等,2014)。本研究发现,所研究的 11 种基因中,TLR2、MyD88、NF- κ B、IL-6、IFN γ 、CXC、C3、HSP-70 和 CD4 九种基因呈现了上调表达趋势,表达量峰值出现在免疫后 24—96h,为对照组的 2—12 倍。说明这些基因通过快速大量的表达参与牙鲆的免疫应答。

3.2 C3、TLR5M、NKEF 三种基因的表达变化

有研究发现,南亚野鲮(*Labeo rohita*)经迟纯爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)免疫后,C3 基因在肾组织中的表达量呈显著上调的趋势(Mohanty *et al*, 2010),本实验上调表达的基因中,C3 的表达存在其独特性,C3 在 3 种组织中的表达上调呈现出双波峰现象,第一次峰值出现在免疫后 48h,在 14d 时出现第二次峰值,但低于 48h 时。结合补体的活化机制推断,第一个峰值的出现可能与浸泡免疫后疫苗直接刺激机体使 C3 基因大量表达以发挥其直接的抗微生物作用有关;基因的第二次上调表达可能与补体系统的激活有关,机体受到抗原刺激后启动特异性免疫应答,浆细胞分泌 IgM 到血液、黏液中,形成抗原抗体复合物,进而激活补体活化途径。

本研究中,免疫后 TLR5M 基因表达量在脾脏和头肾中与对照组无显著差异,在鳃中呈现上调趋势,为对照组的 2.75 倍。结合之前的相关报道,鳃弧菌及其鞭毛刺激虹鳟细胞系后 TLR5M 表达变化不显著,而 TLR5S 显著上调(Tsujita *et al*, 2004)。推断 TLR5M 在消化道的细菌识别中发挥重要作用而在其他器官作用不显著,且 TLR5M 与 TLR5S 识别鞭毛的成分有可能不同,导致其表达出现差异。鳃中 TLR5M 基因的上调表达可能与浸泡免疫时病原直接接触到鳃组织,短时间内引起了 TLR5M 的应激表达有关。

研究发现,鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)注射感染鲤春病毒(Spring Viraemia of Carp Virus)后,脾脏和鳃组织中的 NKEF-B 基因的表达量相对于对照组显著上调,而头肾中 NKEF-B 基因的表达量显著下调(Huang *et al*, 2009)。实验结果显示,牙鲆浸泡免疫鳃弧菌灭活疫苗后,NKEF 基因的表达量在脾脏和鳃组织中显著上调,而在头肾中显著下调,表达量最小值

为对照组的 0.49 倍,与之前的研究结果一致,推测 NKEF 基因在机体非特异性免疫防御中可能起重要作用,头肾作为鱼类主要的造血和淋巴器官,它在受到外来抗原的刺激时会将产生的血细胞和淋巴细胞转运到血液及其它组织中,这也许是造成 NKEF 基因在头肾中下调表达的原因,但详细的作用机制还有待进一步研究。

3.3 11 种基因表达变化的组织差异性

实验结果显示,在脾脏和头肾中,TLR2、NF- κ B、和 CD4 基因的表达峰值高于鳃;在脾脏和鳃中,IL-6、HSP70 和 NKEF 基因的表达峰值均高于脾脏;TLR5M、MyD88、IFN γ 、CXC 和 C3 基因在三个组织中的表达峰值差异不大;在三个组织中每个基因表达峰值出现的时间基本一致。结合之前的研究结果,注射免疫后脾脏和头肾中免疫相关基因的表达量均显著高于鳃,且表达量峰值出现的时间早于鳃(宋晓青等,2014),推测浸泡免疫可以迅速启动鱼类的黏膜免疫,使鳃组织中免疫相关基因表达量上调。因此,在评价疫苗浸泡免疫效果时,除检测脾脏和头肾等主要的免疫器官外,鳃也是需要检测的组织。

本文通过比较免疫后 11 种基因在三种组织中的表达量变化趋势,发现 IL-6 和 HSP70 基因在三种组织中的表达量上调峰值较高,为对照组的 5—11 倍,且变化较为迅速,4h 即出现显著上调,在 24h 达到峰值。有研究也发现,鳃弧菌感染金头鲷(*Sparus aurata*)后,IL-6 基因在 4h 内即呈现上调表达(Castellana *et al*, 2008);海豚链球菌(GIFT *Streptococcus iniae*)免疫吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)后,HSP70 基因表达量在 48h 之内上调至对照组的 5 倍多(王瑞等,2010)。由此可见,IL-6 和 HSP70 基因在浸泡免疫灭活疫苗后是较为敏感的因子,可以作为疫苗浸泡免疫后的效果评价指标。

4 结论

浸泡免疫后,鳃弧菌灭活疫苗有效引起了牙鲆的特异性和非特异性免疫应答反应,各免疫相关基因在脾脏、头肾和鳃三种组织中出现了不同程度的上调或下调表达,其中 IL-6 和 HSP70 基因在三个组织中均表达变化迅速,表达丰度较高,可以作为浸泡免疫后免疫效果的评价指标。在监测浸泡免疫效果时,除脾脏和头肾外,鳃也是重要的检测组织。

参 考 文 献

- 丁冰洁, 绳秀珍, 唐小千等, 2013. 大菱鲆多聚免疫球蛋白受体基因的克隆及表达分析. 中国水产科学, 20(4): 792—801
- 王 庆, 吴光辉, 巩 华等, 2010. 斜带石斑鱼浸泡免疫哈维氏弧菌灭活疫苗后 MHC-II 类分子的表达变化. 广东农业科学, 37(12): 136—139
- 王 瑞, 黄艳华, 陈 明等, 2010. 罗非鱼感染链球菌后 hsp70 基因表达研究. 广西农业科学, 41(4): 371—377
- 刘雨果, 潘厚军, 石存斌等, 2011. 3 种免疫途径对嗜水气单胞菌灭活疫苗保护作用的影响. 广东海洋大学学报, 31(4): 81—85
- 孙 晶, 薛 壮, 王歆睿等, 2014. 自然杀伤细胞增强因子研究进展. 生命的化学, 34(2): 235—240
- 纪 冬, 辛绍杰, 2009. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析. 生物技术通讯, 20(4): 598—600
- 宋晓青, 邢 婧, 战文斌, 2014. 牙鲆经注射和浸泡免疫鳗弧菌灭活疫苗后 7 种免疫相关基因表达的变化. 中国水产科学, 21(4): 747—758
- 陈 勇, 郭 丽, 陈舒泛, 2008. 感染后暗纹东方鲀补体组分 C₃、C₄ 表达分析. 江苏农业科学, (2): 175—179
- Castellana B, Iliev D B, Sepulcre M P *et al*, 2008. Molecular characterization of interleukin-6 in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). Molecular Immunology, 45(12): 3363—3370
- Cobo Labarca C, Makhutu M, Lunsdon A E *et al*, 2015. The adjuvant effect of low frequency ultrasound when applied with an inactivated *Aeromonas salmonicida* vaccine to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vaccine, 33(11): 1369—1374
- Cui M, Zhang Q Z, Yao Z J *et al*, 2011. Molecular cloning and expression analysis of heat-shock protein 70 in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* following heat shock and *Vibrio alginolyticus* challenge. Journal of Fish Biology, 79(2): 486—501
- Dan X M, Zhang T W, Li Y W *et al*, 2013. Immune responses and immune-related gene expression profile in orange-spotted grouper after immunization with *Cryptocaryon irritans* vaccine. Fish & Shellfish Immunology, 34(3): 885—891
- Ellis A E, 1988. Current aspects of fish vaccination. Diseases of Aquatic Organisms, 4: 159—164
- Evenhuis J P, Cleveland B M, 2012. Modulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal immune gene expression following bacterial challenge. Veterinary Immunology and Immunopathology, 146(1): 8—17
- Huang R, Gao L Y, Wang Y P *et al*, 2009. Structure, organization and expression of common carp (*Cyprinus carpio* L.) NKEF-B gene. Fish & Shellfish Immunology, 26(2): 220—229
- Hwang S D, Asahi T, Kondo H *et al*, 2010. Molecular cloning and expression study on Toll-like receptor 5 paralogs in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish & Shellfish Immunology, 29(4): 630—638
- Kato G, Goto K, Aoka I *et al*, 2013. CD4 and CD8 homologues in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*: Differences in the expressions and localizations of CD4-1, CD4-2, CD8 α and CD8 β . Developmental and Comparative Immunology, 39(3): 293—301
- Mohanty B R, Sahoo P K, 2010. Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection. Fish & Shellfish Immunology, 28(4): 613—621
- Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T, 2002. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. Arthritis Research, 4(S3): S233—S242
- Tang D, Gao Y H, Wang R X *et al*, 2012. Characterization, genomic organization, and expression profiles of MyD88, a key adaptor molecule in the TLR signaling pathways in miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). Fish Physiology and Biochemistry, 38(6): 1667—1677
- Tang X Q, Zhan W B, Sheng X Z *et al*, 2010. Immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to outer membrane protein of *Edwardsiella tarda*. Fish & Shellfish Immunology, 28(2): 333—343
- Tsujita T, Tsukada H, Nakao M *et al*, 2004. Sensing bacterial flagellin by membrane and soluble orthologs of Toll-like receptor 5 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The Journal of Biology Chemistry, 279(47): 48588—48597
- Wei Y C, Pan T S, Chang M X *et al*, 2011. Cloning and expression of Toll-like receptors 1 and 2 from a teleost fish, the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 141(3—4): 173—182
- Yang D H, Liu Q, Ni C S *et al*, 2013. Gene expression profiling in live attenuated *Edwardsiella tarda* vaccine immunized and challenged zebrafish: Insights into the basic mechanisms of protection seen in immunized fish. Developmental and Comparative Immunology, 40(2): 132—141

VARIATIONS IN EXPRESSION OF ELEVEN IMMUNE RELATED GENES IN FLOUNDER (*PARALICHTHYS OLIVACEUS*) INJECTED WITH INACTIVATED *VIBRIO ANGUILLARUM*

XING Jing, WANG Yang, SONG Xiao-Qing, TANG Xiao-Qian, SHENG Xiu-Zhen, ZHAN Wen-Bin
(Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract We prepared inactivated whole-cell vaccine of *Vibrio anguillarum*, and then vaccinated *Paralichthys olivaceus* in whole-cell vaccine immunization. Samples of spleen, head kidney and gill of *P. olivaceus* were collected at 0h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 7d, and 14d after immunization. Total RNA was extracted from spleen, head kidney and gill, and then the gene expression levels of TLR2 (Toll-like receptor 2), TLR5M, Myeloid differentiation factor 88(MyD88), NF- κ B (nuclear transcription factors), IL-6 (interleukin-6), IFN γ (interferon γ), CXC (chemotactic factor), C3 (complement factor), Hsp70 (heat shock protein 70), cluster determinant 4(CD4) and nature killer enhancing factor (NKEF) were tested in qRT-PCR (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction). The results show that the expression quantities of immuno-related genes increased significantly after immunization except for TLR5M and NKEF. The maximum expression of immune-related genes occurred in 24~72h after immunization, and was 2~12 times higher than those of control group. However, TLR5M showed no significant difference; and the expression of NKEF showed down-regulation and reached peak at 24h after immunization. The minimum expression was 0.49 times of control group. In spleen and head kidney, the maximum expression of NF- κ B and CD4 was higher than that in gill. In spleen and gill, the maximum expression of IL-6, HSP70, and NKEF was higher than that in head kidney. The maximum expression of IFN γ , CXC, C3, and MyD88 occurred in similar time and showed no significant difference in the three tissues. The fast change and high expression of IL-6 and HSP70 in all the three tissues may be applied for evaluation on fish soaking vaccine immunity. In addition to the main immune organs including spleen and head kidney, gill can be an important tissue for the detection. This method may be applied for future evaluation on the efficacy of vaccination and its molecular mechanism.

Key words *Paralichthys olivaceus*; inactivated *Vibrio anguillarum*; immersion immunization; immune related genes