

斑点叉尾鮰 TICAM 在细菌和病毒感染后的基因表达特征

王启龙^{1,2} 李敏² 路颺² 黄爱平³ 曾令兵⁴ 王文琪¹ 陈松林² 沙珍霞^{2*}

(¹青岛农业大学动物科技学院, 266064)

(²农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(³江苏泰兴市渔业推广站, 225401)

(⁴中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430000)

摘要 采用实时定量 RT-PCR 方法研究斑点叉尾鮰在不同病原(链球菌、嗜水气单胞菌、迟钝爱德华菌、斑点叉尾鮰病毒)感染后 TICAM 基因在 mRNA 水平的组织和时空表达特征。感染嗜水气单胞菌可引起 TICAM 基因在肝脏和脾脏中的上调表达, 在注射后 24 h 和 12 h 后上调最大分别为 2.3 倍和 1.9 倍; 而在头肾和后肠中的表达则下调到感染后 48 h 的 0.15 倍和 24 h 的 0.53 倍; 感染链球菌后则导致在肝脏、脾脏、后肠和头肾中 TICAM 基因表达的强烈上调, 最大上调幅度为感染后 7 d 肝脏中表达提高了 23 倍, 其次, 在脾脏和头肾中基因表达最大可上调到感染前的 10 倍左右; 在感染迟钝爱德华菌后, TICAM 基因在肝脏、脾脏、后肠和头肾中表达上调。其中, 感染后 7 d 脾脏中的表达提高到感染前的 23.1 倍。而感染叉尾鮰病毒后, TICAM 基因在肝脏、头肾和后肠的表达上调但幅度不大, 基因表达在 4 种组织内表达变化量在 1.5~3.7 倍范围内波动, 而在脾脏中 TICAM 表达下调, 在感染 24 h 后达到最低为感染前的 0.13 倍。以上实验结果显示, 斑点叉尾鮰 TICAM 基因表达变化与病原感染密切相关, 暗示 TICAM 基因在斑点叉尾鮰天然免疫中起重要作用。

关键词 斑点叉尾鮰 TICAM 基因 基因表达 病原 天然免疫

中图分类号 S943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)01-0047-07

Gene expression profiling of TIR-domain-containing adaptor molecule (TICAM) in channel catfish *Ictalurus punctatus* challenged with different pathogens including bacteria and virus

WANG Qi-long^{1,2} LI Min² LU Yang² HUANG Ai-ping³ ZENG Ling-bing⁴
WANG Wen-qi¹ CHEN Song-lin² SHA Zhen-xia^{2*}

(¹ College of Animal Science and Technology, Qingdao Agriculture University, 266064)

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

(³ Taixing Fishery Technology Extension Station, 225401)

(⁴ Yangtze River Fisheries Research Institute, Wuhan 430000)

ABSTRACT In mammals, Toll-IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor molecule 1

国家自然科学基金项目(30871941)和人事部留学回国人员项目共同资助

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

收稿日期: 2011-04-28; 接受日期: 2011-06-07

作者简介: 王启龙(1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事海水鱼类免疫相关基因的研究。E-mail: wql_696@163.com, Tel: 15066853212

(TICAM-1) is a signaling adaptor for TLR3 and TLR4 that activates the transcription factors IRF-3, NF- κ B, and AP-1, leading to the induction of type I interferon and cytokines. TICAM is also identified in some fish species, however, the gene expression profiling of TICAM is largely unknown in teleosts. Because bacteria such as *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus* spp. and *Edwardsiella tarda* and viruses such as channel catfish virus cause a multisystemic disease responsible for severe losses in channel catfish aquaculture in China. In this study, gene expression profiling of TICAM in different immune tissues (liver, headkidney, spleen, and intestine) after infection with these pathogens assayed by quantitative RT-PCR was described. After infection with *A. hydrophila*, TICAM was up-regulated approximately 2.3-fold at 24 h in liver and 1.9-fold at 12 h in spleen, while expression of this gene was down-regulated in headkidney and intestine, with the lowest expression as 0.15-fold at 48 h in headkidney, 0.53-fold at 24 h in intestine, respectively. TICAM was up-regulated drastically in liver, spleen, headkidney and intestine after infection with *Streptococcus* spp. It reached the highest level with 23-fold in liver at 7 d post infection, and it increased about 10 times in headkidney and spleen after infection. The expression of TICAM increased in all tested tissues after infection with *E. tarda*, especially it was up-regulated to the highest (23.1-fold) at 7d in spleen. After infection with channel catfish virus, the gene TICAM expression was up-regulated in liver, headkidney and intestine moderately, with the highest expression of 3.7-fold in liver at 72 h, 2.8-fold in headkidney at 7 d, 1.5-fold at 24 h in intestine. However, it was down-regulated in spleen, and its lowest expression was 0.13-fold at 24 h. In conclusion, the results of this study suggest that the TICAM gene may play crucial roles in innate immunity in channel catfish.

KEY WORDS Channel catfish *Ictalurus punctatus* TIR-domain-containing adaptor molecule TICAM Gene expression Pathogens Innate immunity

Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 是重要的模式识别受体 (Pathogen recognized receptor, PRR), 在天然免疫中具有重要作用, 同时 TLR 还是联系特异性免疫的桥梁。TLR 可识别病原微生物中保守的 PAMPs (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 如细菌脂多糖、肽聚糖、酵母聚糖、鞭毛蛋白、双链 RNA (dsRNA)、单链 RNA (ssRNA) 和非甲基化 CpG DNA 等, 然后通过和细胞内的一些接头分子结合可启动快速的信号传导, 引起转录因子 NF- κ B 的活化或 I 型干扰素的产生 (Takeda *et al.* 2003; Trinchieri *et al.* 2007)。在哺乳动物中迄今发现了 MyD88 (Myeloid differentiation factor 88)、MAL (MyD88-adaptor-like) 或 TIRAP (TLR domain containing adapter protein)、TICAM (Toll-IL-1R-containing adaptor molecule TICAM) 或 TRIF (TIR containing adaptor molecule inducing IFN- β)、TRAM (TRIF-related adaptor molecule) 和 SARM [Sterile alpha motif (SAM) and Armadillo motif (ARM) domain containing protein] 5 种接头分子 (O'Neill *et al.* 2003)。根据接头蛋白的不同可将 TLR 信号传导通路分为 MyD88 依赖性和 MyD88 非依赖性途径, TICAM 在 MyD88 非依赖型信号传导途径中具有重要作用。TLR3 和 TLR-4 可由 TICAM 进行 MyD88 非依赖途径的信号转导 (Ishii *et al.* 2005)。

鱼类是最早同时具有先天免疫和特异性免疫的脊椎动物, 但特异性免疫机制还不完善。先天免疫在鱼类应对外界刺激及病原生物侵袭的防御反应中起决定性作用。现已证明, TLR 受体在鱼类天然免疫中具有重要作用, 其中重要的接头分子 MyD88 在鱼类中直接参与了病原刺激后的先天免疫应答, 病原菌可强烈上调该基因在免疫组织中的表达 (Takano *et al.* 2007; Yao *et al.* 2009; 沙珍霞等 2010)。而作为 MyD88 非依赖型信号传导途径中的接头分子, 有关鱼类 TICAM 基因的研究不多, 目前在河豚 *Takifugu rubripes*、斑马鱼 *Da-*

nio rerio、斑点叉尾鲟 *Ictalurus punctatus* 和蓝斑叉尾鲟 *Ictalurus fuscatus* 中克隆了 TICAM 序列(Hardy *et al.* 2004; Sullivan *et al.* 2007)。鱼类 TICAM 在基因类型上与哺乳动物明显不同,通过基因序列分析,现在已知的鱼类 TICAM 只存在一种基因类型,而非哺乳动物存在 TICAM1 和 TICAM2 两种基因类型(Baoprasertkul *et al.* 2006)。鱼类 TICAM 的基因表达与病原的关系,仅在斑点叉尾鲟和蓝斑叉尾鲟上证明革兰氏阴性菌爱德华菌 *Edwardsiella tarda* 可引起 TICAM 基因在头肾和脾脏中基因表达下调(Baoprasertkul *et al.* 2006),TICAM 基因的表达变化与其他类型的 PAMP 的关联性目前尚不清楚。

斑点叉尾鲟 1984 年从美国引进到我国后,目前已成为我国出口创汇的重要经济养殖鱼类。但是病害问题给我国斑点叉尾鲟养殖业造成了重大经济损失。根据国内外的研究结果,造成人工养殖斑点叉尾鲟死亡的疾病主要包括肠道败血症、出血性败血症、烂尾病等细菌性疾病、病毒性疾病和寄生虫(李爱华 2007)。其中细菌性疾病的主要病原是叉尾鲟爱德华菌 *E. tarda*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 和链球菌 *Streptococcus* spp. 等,斑点叉尾鲟病毒(Channel catfish virus)等为病毒病的主要病原(曾令兵等 2009)。本研究旨在通过用 4 种常见的斑点叉尾鲟病原迟钝爱德华菌、嗜水气单胞菌、链球菌、斑点叉尾鲟病毒等感染斑点叉尾鲟,查明病原感染前后 TICAM1 基因的实时定量表达变化模式,为从分子水平上筛选抗病相关基因提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

健康斑点叉尾鲟于 2010 年 6 月取自江苏泰兴斑点叉尾鲟国家原良种场,鱼龄为 90d,平均体重在 10.5 ± 1.2 g。暂养 14 d 后以消除环境胁迫对斑点叉尾鲟的影响。取 5 条健康斑点叉尾鲟,收集血、肝脏、头肾、后肾、脾脏、后肠、胃、心脏、鳃、脑、肌肉和皮肤共计 12 个组织,将同类组织等量收集在一起,迅速放入液氮中,然后转入 -80 °C 保存用于组织 RNA 提取。

1.1.2 病原

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。斑点叉尾鲟病毒增殖和培养由中国水产科学研究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 GenBank 数据库公布的斑点叉尾鲟 TICAM 基因的 cDNA 全长序列(DQ423777)

(Baoprasertkul *et al.*

2006)设计了一对引物用于 RT-PCR 扩增。内参基因选用 18S rRNA。引物序列见表 1。

1.2.2 病原感染实验

嗜水气单胞菌在 TWA 培养基中(MgSO₄ 0.05g,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,水 1 L,pH 7.2~7.4),28 °C、200 r/min 培养 16 h。链球菌在 THB 培养基中(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,水 1 L,pH 7.4),28 °C、220 r/min 培养 18 h。迟钝爱德华菌在 LB 培养基中(胰蛋白胨 10.0 g,酵母浸出物 5.0 g,NaCl 5.0 g,水 1 L),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

表 1 本研究所用的引物及其序列

Table 1 Primers and their sequences used in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5' to 3')	位置 Location	用途 Utilization
ccRT-PCR-F	GCCACCTGAAGGATCCTCTACT	853~875	实时定量 PCR 分析
ccRT-PCR-R	AGTCCTCAGAAAAAGTCGCTCC	1 030~1 052	
18S rRNA-F	GGAAAGGATTGACAGATTGATAGC	829~853	实时定量 PCR 的内参引物
18S rRNA-R	GCCCTCTAAGAAGTTGGACGC	976~997	

再用1×PBS溶液(NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g, 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。斑点叉尾鲷病毒的培养参照曾令兵等(2009)的方法。将96条健康鱼分成4组,分别注射迟钝爱德华菌、嗜水气单胞菌、链球菌、斑点叉尾鲷病毒,0 h 注射 0.1 ml 的 PBS 溶液作为对照。根据预实验结果(未发表资料),4种病原的注射剂量分别为0.1 ml,其中迟钝爱德华氏菌滴度为 2.06×10^5 CFU/ml,嗜水气单胞菌为 5.13×10^3 CFU/ml,链球菌为 2.84×10^4 CFU/ml。每个感染组在病原感染后 12 h、24 h、48 h、72 h、7 d 分别取4条鱼,解剖后取肝脏、脾脏、头肾和后肠4个组织,每条鱼同一类型的组织等量混合在一起,立即投入液氮中,然后转入-80℃保存,用于RNA的提取。

1.2.3 RNA 提取

在研钵中用液氮将上述组织研磨成粉末状。采用 Trizol 试剂进行 RNA 提取,提取步骤参照说明书上的介绍(Invitrogen 公司)。步骤如下:将研磨后的组织 50 mg 加入 1 ml Trizol 试剂中,充分混匀后静置 5 min,加入 200 μ l 三氯甲烷(氯仿)震荡混匀 5 min 后,12 000 r/min 4℃离心 15 min。取上清液,然后加入等体积异丙醇颠倒混匀 5 min,静置 10 min,10 000 r/min、4℃离心 10 min,弃液相,加入 800 μ l 75%酒精,洗涤,8 000 r/min、4℃离心 10 min,弃液相,自然干燥 5 min,加入 50 μ l 无 RNA 的水溶解。在 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

使用 M-MLV 反转录酶进行 cDNA 第一链的合成(TaKaRa 公司),反应体系如下:RNA 500 ng, Oligo (dT)18 引物(50 μ mol/L)1 μ l,无 RNA 酶 ddH₂O 补至 6 μ l,70℃保温 10 min 后迅速在冰上急冷 2 min 以上。再加入 5×M-MLV Buffer 2 μ l, dNTP Mixture(各 10 mmol/L)0.5 μ l, RNase 抑制剂(40 U/ μ l)0.25 μ l,反转录酶 M-MLV(200 U/ μ l)0.5 μ l,无 RNA 酶 ddH₂O 补至 10 μ l,42℃保温 60 min 后,70℃保温 15 min 后冰上冷却。合成的 cDNA 第一链可直接作为实时定量 PCR 反应模板。

1.2.5 TICAM1 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 primescrypt 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℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环,自动加入溶解曲线。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溶解曲线分析,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 TICAM 基因在健康鱼组织中的表达

对 TICAM 基因在斑点叉尾鲷不同组织的实时定量表达分析结果表明,TICAM 基因在所检测的 12 种组织中都有表达(图 1)。其中表达量最高的组织分别是血和肌肉($P < 0.05$),其次是肝脏,在头肾、脾脏中的表达量较低,而在胃中的表达是最低的($P > 0.05$)。

2.2 不同病原感染后 TICAM1 基因在不同免疫组织的表达

2.2.1 嗜水气单胞菌感染后 TICAM 基因的表达

人工感染嗜水气单胞菌后,斑点叉尾鲷 TICAM 基因在免疫组织肝脏、脾脏、头肾和后肠中的表达呈现组

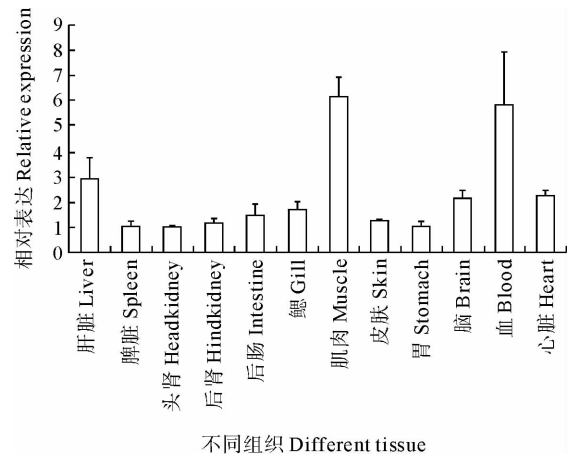


图 1 TICAM 在斑点叉尾鲷不同组织的实时定量相对表达变化

Fig. 1 Relative expression of TICAM gene in different tissues of channel catfish

组织特异性,结果如图 2 所示。其中在肝脏和头肾中,TICAM 的表达总体呈现上调趋势,而在脾脏和后肠中,TICAM 的表达呈现下调表达,但在各组织内的变化幅度不大。在肝脏中,感染嗜水气单胞菌 12 h 和 24 h,TICAM 的基因表达与感染前相比变化不大,但在感染后 48 h,基因表达变化明显上调,达到最大值,为感染前的 2.5 倍,随后的 72 h 和 7 d,基因表达量略有下降,但仍维持在感染前的两倍左右;在头肾中 TICAM 表达在感染后 12 h 起呈现明显的上调,至 24 h 达到最大,为感染前的两倍左右,随后在 48 h~7 d,基因表达量可达到感染前的 1.5 倍左右;TICAM 在脾脏中的变化在 12 h~7 d,处于明显的下调状态,基因表达量仅为感染前的 10%~20% ($P<0.05$);TICAM 在肠中变化幅度不大,在感染后 12~24 h 内,表达量下调了 30%,但在感染后 48 h~7 d,基因表达量缓慢上升,基本接近感染前的水平。

2.2.2 链球菌感染后 TICAM 基因的表达

链球菌感染斑点叉尾鲟后可明显引起 TICAM 基因的上调表达,结果如图 3 所示。其中,在肝脏中,TICAM 的上调表达最为明显,呈现出两个变化高峰,在感染链球菌 12 h,基因表达量达到感染前的 9 倍 ($P<0.01$),自感染后 24 h 和 48 h,表达量降至最低,但仍维系在感染前的 3 倍左右,自感染后 72 h,TICAM 基因表达量逐步升高,在 7 d 达到最高,为感染前的 23 倍 ($P<0.01$);在脾脏中,TICAM 的表达趋势与在肝脏中类似,呈现两个表达高峰。在感染链球菌 12 h 和 72 h,均达到了感染前的 13 和 14 倍 ($P<0.01$),在感染后 24 h,表达量与感染前持平,在 48 h 和 7 d,表达量可达感染前的 5~10 倍 ($P<0.05$);在肠组织中,TICAM 基因的表达上调幅度不明显,表达量维持在感染前的 1~4 倍;在头肾中,感染链球菌 12 h 后,TICAM 基因的表达量达到最高值,为感染前的 10 倍 ($P<0.01$),在 24 h~7 d,基因表达量变化不明显,基本维持在感染前的 3~7 倍 ($P<0.05$)。

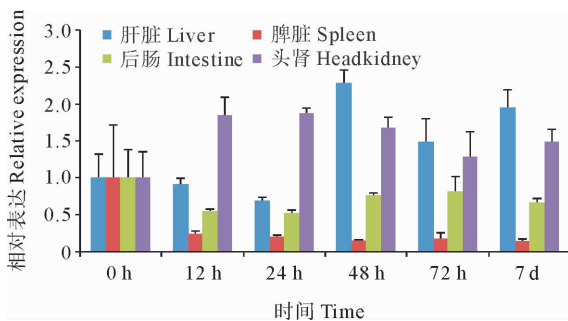


图 2 斑点叉尾鲟 TICAM 基因在嗜水气单胞菌感染后的肝脏、脾脏、头肾和后肠中的定量表达

Fig. 2 Relative expression of TICAM gene in liver, spleen, headkidney and intestine of channel catfish after infection with *A. hydrophila*

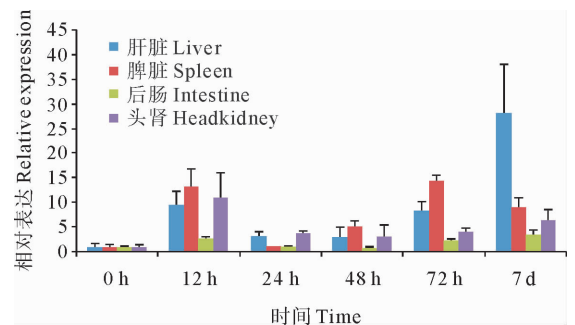


图 3 斑点叉尾鲟 TICAM 基因在链球菌感染后的肝脏、脾脏、头肾和后肠中的定量表达

Fig. 3 Relative expression of TICAM gene in liver, spleen, headkidney and intestine of channel catfish after infection with *Streptococcus* spp.

2.2.3 迟钝爱德华菌感染后 TICAM 基因的表达

斑点叉尾鲟 TICAM 基因在感染迟钝爱德华菌后,在肝脏、脾脏、头肾和后肠中的表达量呈现波动式变化,整体呈现上扬表达,结果如图 4 所示。其中,在脾脏中 TICAM 的表达量变化最为明显,在感染爱德华氏菌后 7 d,基因表达量上扬了 23 倍 ($P<0.01$),而在感染后 12~72 h,基因的表达量为感染前的 5~10 倍 ($P<0.05$)。在肝脏中,TICAM 基因的表达量在感染后 12 h 达到最大,为感染前的 8 倍 ($P<0.05$),在感染 24 h,基因表达回归到感染前水平,在 72 h 基因表达量又提高到感染前的 6 倍水平 ($P<0.05$);在脾脏中,TICAM 的表达趋势与在肝脏中的表达基本相同,在头肾中,基因表达在感染后 12 h 达到最大,为感染前的 5 倍 ($P<0.05$)左右,24 h~7 d,基因表达量降至感染前的 2~3 倍,在肠中,呈现与头肾相似的表达态势,基因表达上扬幅度不大,基本保持感染前的 2~4 倍水平。

2.2.4 斑点叉尾鲟病毒病毒感染后 TICAM 基因的表达

斑点叉尾鲟经斑点叉尾鲟病毒病毒感染后,TICAM 基因在肝脏、脾脏、头肾和后肠中的表达变化呈现不同态势,结果如图 5 所示。其中在肝脏中,TICAM 表达呈先上升后降低的趋势,在感染后 12 h 上调 1.5 倍,24 h 为

1.3 倍,48 h 为 2.8 倍,72 h 达到最高,为 4 倍左右,然后 7 d 为 2.3 倍;在脾脏中,TICAM 的表达呈下调趋势,在注射后 24h 下调至 0.14 倍($P < 0.01$),然后下调幅度逐渐减低,在注射后 7 d 下调至 0.28 倍。在头肾中,TICAM 的表达在感染后 12 h 为 2.5 倍,在 24~72 h 为 1.5 倍左右,在 7 d 达最大,3 倍;在注射后的后肠中,TICAM 的表达变化幅度不大,感染后 24 h 达最高,为 1.5 倍。

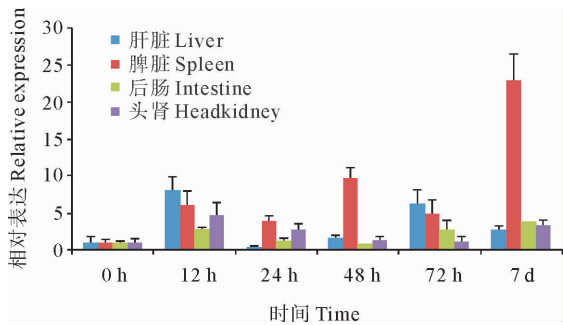


图 4 斑点叉尾鲟 TICAM 基因在爱德华菌感染后的肝脏、脾脏、头肾和后肠中的定量表达

Fig. 4 Relative expression of TICAM gene in liver, spleen, headkidney and intestine of channel catfish after infection with *E. tarda*

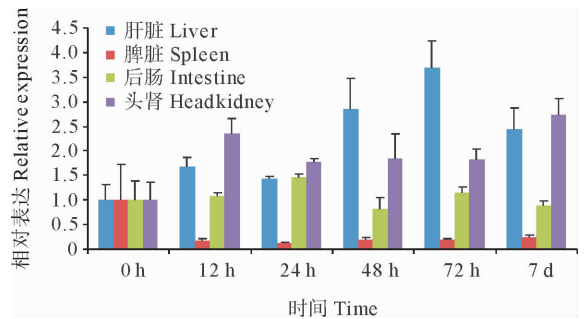


图 5 斑点叉尾鲟 TICAM 基因在斑点叉尾鲟呼肠孤病毒感染后的肝脏、脾脏、头肾和后肠中的定量表达

Fig. 5 Relative expression of TICAM gene in liver, spleen, headkidney and intestine of channel catfish after infection with channel catfish virus

3 讨论

本研究采用实时定量 PCR 的方法研究了斑点叉尾鲟 TICAM 基因的表达变化,旨在发现相应病原刺激后 TICAM 基因本身的表达变化模式,从而发现 TICAM 基因直接参与斑点叉尾鲟天然免疫的证据。TICAM 在斑点叉尾鲟健康鱼的组织(包括肝脏、脾脏、头肾、后肾、鳃、肌肉、皮肤、脑、血、胃、心、后肠)中广泛表达,但也存在组织差异性。免疫组织血和肝脏以及肌肉中表达较高。此结果和 Baoprasertkul 等(2006)的研究结果(TICAM 在健康组织中(包括肝脏、脾脏、小肠、胃、皮肤、肌肉、头肾、后肾、卵巢、鳃)都有表达,但存在组织表达差异,在脾脏和卵巢中表达最高,在头肾中表达最低相吻合。

TICAM 作为一类重要的胞质接头蛋白,在 MyD88 非依赖型信号传导途径中具有重要作用。本研究通过用两种革兰氏阴性菌(嗜水气单胞菌和迟钝爱德华菌)、一种革兰氏阳性菌链球菌和一种病毒斑点叉尾鲟病毒 4 种病原对斑点叉尾鲟进行感染,研究了 TICAM 基因在免疫组织肝脏、脾脏、头肾和后肠中 mRNA 水平的定量表达模式。这 4 种不同的病原均可引起斑点叉尾鲟 TICAM 基因的表达变化(上调或下降),而且每种组织的基因表达模式也不相同。由于鱼体不同组织中的免疫细胞种类不同,如淋巴 B 细胞主要分布于头肾中,而吞噬细胞中的粒细胞则主要分布在脾脏中(张永安等 2000),因此不同病原刺激后,各组织中的免疫细胞可能处于不同的防御状态,导致 TICAM 在不同组织中的表达模式存在差别。虽然嗜水气单胞菌和迟钝爱德华菌都属于革兰氏阴性菌,但经过它们诱导后,TICAM 基因的表达模式和水平却不相同。在注射嗜水气单胞菌后,TICAM 在脾脏和后肠中的表达下调,而在注射爱德华菌后 TICAM 在脾脏和后肠中的表达上调。这可能是与这两种菌在 PAMPs 组成上存在差异有关。在细菌中,细胞壁、鞭毛、DNA 都可以作为 PAMPs,而不同的 PAMPs 可能引起免疫相关基因的表达差异(Akira *et al.* 2006)。LPS 作为革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,能够被 TLR4 识别(Poltorak *et al.* 1998; Shimazu *et al.* 1999)。不同的细菌能够合成出不同结构的 LPS,包括磷酸盐形式的变化、酰基链数目和脂肪酸的不同。这些变化反映出不同的生物活性。因此同属于革兰氏阴性菌的嗜水气单胞菌和爱德华菌诱导的 TICAM 基因表达模式可能不同。在本研究中,感染革兰氏阳性菌链球菌后可引起斑点叉尾鲟 TICAM 基因强烈的上调表达。革兰氏阳性菌中保守的 PAMP 是肽聚糖,在 TLR 信号通路中被 TLR2 所识别(Alexopoulou *et al.* 2002),而 TLR2 信号通路中的接头分子为 MyD88,TLR3 识别的配体主要是病毒来源的双链 RNA,TLR4 的 MyD88 非依赖途径中的接头分子为 TICAM,但是 TLR4 的外源性配体主要是脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、内源性配体为黏多糖(Glycosaminoglycans,

GAGs)降解产物如硫酸肝素(Heparan sulfate, HS)和透明质酸(Hyaluronic Acid, HA)、纤维连接蛋白(Fibronectin)中的 EDA(Extra domain A)片段、热休克蛋白 Heat shock protein, HSP)等(Johnson *et al.*, 2004)。因此,TLCAM 强烈响应革兰氏阳性菌链球菌的刺激,有可能 TLCAAM 本身就是斑点叉尾鲴的免疫基因,可通过基因表达的强烈变化抵御病害的侵袭。在感染病毒后,TICAM 在不同组织中的表达变化可能与 TICAM 是 TLR3 信号传导通路中的接头分子有关。

在感染嗜水气单胞菌和斑点叉尾鲴病毒后,TICAM 在脾脏中的表达下调,而在肝脏、小肠和头肾中的表达上调。这可能与组织免疫特异性和鱼类的特异性免疫有关,如头肾中可能主要进行着细胞免疫,而脾脏可能主要进行着体液免疫。

以上实验结果揭示,TICAM 基因在斑点叉尾鲴的天然免疫中起着至关重要的作用。

致谢:感谢华中农业大学水产学院陈昌福教授惠赠菌株嗜水气单胞菌和链球菌,中国水产科学研究院黄海水产研究所黄 健研究员惠赠菌株爱德华菌,中国水产科学研究院长江水产研究所曾令兵研究员惠赠斑点叉尾鲴病毒。

参 考 文 献

- 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):648~653
- 沙珍霞,王 娜,王启龙,徐田军,王 磊,董晓丽,陈松林. 2010. 半滑舌鲷髓样分化因子的克隆和表达分析. 中国水产科学, 17(4):659~669
- 李爱华. 2007. 斑点叉尾鲴几种疑难疾病的介绍. 中国水产,3:59~60
- 曾令兵,李艳秋,王 瑶,肖 艺,范玉顶,周 勇. 2009. 斑点叉尾鲴出血病病原呼肠孤病毒的分离鉴定. 病毒学报,25(6):460~465
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4):783~801
- Alexopoulou, L., Thomas, V., Schnare, M., Lobet, Y., Anguita, J., Schoen, R. T., Medzhitov, R., Fikrig, E., and Flavell, R. A. 2002. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1-and TLR2-deficient mice. *Nat. Med.* 8(8): 878~884
- Baoprasertkul, P., Peatman, E., Somridhvej, B., and Liu, Z. J. 2006. Toll-like receptor 3 and TICAM genes in catfish: species-specific expression profiles following infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Immunogenetics*, 58(10):817~830
- Belvin, M. P., and Anderson, K. V. 1996. A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12:393~416
- Hardy, M. P., Mcggettrick, A. F., and O'Neill, L. A. 2004. Transcriptional regulation of the human TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon β) gene. *J. Biochem.* 380(pt1): 83~93
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J., and Beutler, B. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*, 424(6 950):743~748
- Ishii, K. J., Coban, C., and Akiral, S. 2005. Manifold mechanisms of Toll-like receptor ligand recognition. *J. Clin. Immunol.* 25(6):511~521
- Johnson, G. B., Brunn, G. J., and Platt, J. L. 2004. Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 172(1): 20~24
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4):621~625
- Medzhitov, R., and Janeway, C. J. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173:89~97
- Medzhitov, R., Preston, H. P., and Janeway, C. A. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6 640):394~397
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funamik, K., Akazawa, T., and Seya, T. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- β induction. *Nat. Immunol.* 4(2):161~167
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C. *et al.* 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice; mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5 396): 2 085~2 088
- Servant, M. J., ten Oever, B., LePage, C., Conti, C., Gessani, S., Julkunen, I., Lin, R., and Hiscott, J. 2001. Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of IRF-3. *J. Biol. Chem.* 276(1):355~363
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189(11):1 777~1 782
- Sullivan, C., Postlethwait, J. H., Lage, C. R., Millard, P. J., and Kim, C. H. 2007. Evidence for evolving Toll-IL-1 receptor-containing adaptor molecule function in vertebrates. *J. Immunol.* 178(7): 4 517~4 527
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. 2003. Toll-like receptors. *J. Annu Rev Immunol.* 21: 335~376
- Trinchieri, G., and Sher, A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 7(3): 179~190
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169(12):6 668~6 672