

# 嗜水气单胞菌和大肠杆菌 LPS 对草鱼免疫相关基因表达的影响

彭小云 刘红 陈孝煊 张棋 袁娟 刘佳佳 吴志新

华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070

**摘要** 将嗜水气单胞菌粗脂多糖(C-LPS)和大肠杆菌脂多糖(E-LPS)分别经腹腔注射草鱼(剂量为4 mg/kg),以注射PBS为对照。48 h后,分别提取各组草鱼的头肾、脾脏、肾脏、肝脏和肠组织中的总RNA,利用Real-time PCR的方法检测不同组织中 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-10$ 和 $TLR4$ 基因的表达情况。结果显示,与对照组相比,头肾中, $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 的表达量在E-LPS组显著升高,而 $IL-10$ 的表达显著下降;C-LPS组 $TNF-\alpha$ 和 $IL-10$ 的表达量显著性升高; $TLR4$ 在两试验组均有显著性降低。脾脏中, $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和 $IL-10$ 在E-LPS组与对照组无显著差异,而 $IL-1\beta$ 和 $IL-10$ 的表达在C-LPS组有显著性升高; $TLR4$ 在两试验组有显著性降低。肾脏中, $TNF-\alpha$ 表达在E-LPS组有显著性升高; $IL-1\beta$ 和 $IL-10$ 在C-LPS组有显著性升高; $TLR4$ 在两试验组中与对照组无显著性差异。肝脏中, $TNF-\alpha$ 、 $IL-10$ 和 $TLR4$ 在两试验组均有显著性升高; $IL-1\beta$ 的表达在E-LPS组显著高于对照组和C-LPS组。肠组织中, $TNF-\alpha$ 和 $IL-10$ 在两试验组有显著性降低和升高; $IL-1\beta$ 和 $TLR4$ 与对照组间无显著性差异。表明嗜水气单胞菌C-LPS和大肠杆菌LPS均可引起草鱼细胞因子基因表达的变化,对于机体免疫反应起到一定的调节作用,但LPS对 $TLR4$ 基因并没有引起显著的上调作用,这与哺乳类动物的研究结果不同。

**关键词** 嗜水气单胞菌; 大肠杆菌; 脂多糖; 草鱼; 免疫相关基因

**中图分类号** S 942.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)01-0067-06

细菌的多糖成分常以3种形式存在:与细胞膜结合的脂多糖(lipopolysaccharides, LPS),与细胞壁共价连接的荚膜多糖(CPS)以及完全分泌到胞外的胞外多糖(EPS)<sup>[1]</sup>。其中LPS是G<sup>-</sup>病原菌内毒素的物质基础,同时具有良好的免疫原性,可以刺激增强机体的免疫力<sup>[2]</sup>,因而被广泛应用于鱼用免疫制剂的研究领域。研究发现,不同致病菌中提取的粗脂多糖CLPS的化学成分不尽相同,其免疫原性也有所不同,但对机体都表现出较强的免疫保护性<sup>[3]</sup>。

有关LPS对水产动物免疫机能影响的研究报道很多。测定的非特异性免疫指标主要是白细胞数量、血清抗体效价及组织过氧化物酶活力<sup>[4]</sup>、吞噬活性<sup>[5]</sup>、呼吸爆发以及溶菌酶活性<sup>[6]</sup>。也有报道表明LPS可促进免疫相关细胞因子的表达,如康吉鳗巨噬细胞 $IL-1\beta$ <sup>[7]</sup>,大西洋鲑前脂肪细胞 $IL-10$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $TNF$ <sup>[8]</sup>,虹鳟巨噬细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和

$IL-6$ <sup>[9]</sup>以及头肾白细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-10$ 和 $IL-6$ <sup>[10]</sup>;同时,LPS刺激后,花鲈头肾、脾脏和肝脏中 $TNF-\alpha$ 的表达量也有升高<sup>[11]</sup>,但不同来源和纯度的LPS对草鱼免疫相关基因表达的影响还未见报道。

水产动物疾病的免疫防治一直备受关注,高效的免疫刺激剂已成为鱼类免疫学的研究热点之一。为使细菌脂多糖作为一种有效的免疫佐剂在生产实践中得到有效利用,进一步深入研究其产生免疫促进作用的机制是非常必要的。为此,本研究以热酚水抽提法提取的嗜水气单胞菌粗LPS和商品化精制的大肠杆菌LPS为免疫原,研究不同来源、不同纯度的LPS对草鱼不同组织中免疫相关基因表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验鱼及饲养

试验草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)购自湖

收稿日期: 2013-03-15

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD25B05, 2012BAD25B06)、公益性行业(农业)科研专项(200803013)和中央高校基本科研业务费专项(2013PY070)

彭小云, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类营养与免疫。E-mail: pxy922@163.com

通信作者: 吴志新, 副教授, 研究方向: 鱼类病理与免疫。E-mail: wuzhixin@mail.hzau.edu.cn

北省仙桃排湖养殖场,选取外观健康、规格基本一致、体质量  $25.0\pm 2.5\text{ g}$  的草鱼,饲养于华中农业大学水产养殖基地,养殖水缸体积约为  $300\text{ L}$ ,采用流水养殖,全天  $24\text{ h}$  充氧。试验鱼用食盐水消毒,暂养  $15\text{ d}$  后正式试验。每天投喂  $2$  次( $09:00$  和  $16:00$ ),日投喂量为体质量的  $3\%\sim 5\%$ ,整个试验期间的水温为  $22\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;保持溶氧  $6\text{ mg/L}$  以上,  $\text{pH } 6.8\sim 7.2$ 。

1.2 细菌与 LPS

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)XS91-4-1 由中国科学院水生生物研究所提供,于 BHI 培养基中  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h}$ ,收集细菌,按改良的热酚水抽提法<sup>[12]</sup>提取粗 LPS,所得粗制 LPS 经冷冻干燥后  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

大肠杆菌(*Escherichia coli* 055:B5) LPS,购买自 Sigma 公司,批号:L2880。

1.3 分组与注射

试验分 3 组:PBS 组,每尾鱼注射灭菌的 PBS  $0.2\text{ mL}$ ;嗜水气单胞菌 LPS(C-LPS)组和大肠杆菌 LPS(E-LPS)组,每尾鱼注射剂量为  $4\text{ mg/kg}$ ,即分别注射  $0.5\text{ mg/mL}$  的 C-LPS 或 E-LPS  $0.2\text{ mL}$ 。注射前,将鱼用 MS-222(质量浓度为  $150\text{ mg/L}$ )麻

醉。每组设 3 个重复,每个重复 15 尾鱼。

1.4 取样及 Real-time PCR 分析

试验鱼注射 PBS 或 LPS  $48\text{ h}$  后取样。先用 MS-222 将鱼麻醉,再解剖取头肾、肾、脾、肝和肠组织,对照组和试验组每重复取 3 尾鱼并将每重复下相应组织混合,然后快速置于液氮中冷冻,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。采用 Trizol(TaKaRa,产品号,9108)分别提取各组织中的总 RNA。

将从各组织中提取的总 RNA 用于逆转录(TaKaRa,产品号,DRR047S),反应液配制均在冰上进行。RT-PCR 反应采用荧光染料 SYBR Green,根据所采用公司产品(TaKaRa,产品号:DRR081A)设计反应体系,所用基因引物见表 1。扩增反应是在 Rotor-Gene 6500 Thermocycler(Corbett Research, Australia)荧光定量 PCR 仪上进行。同时以 18S rRNA 为内参照基因。PCR 反应液配制如下(反应液配制在冰上进行):  $20\text{ }\mu\text{L}$  PCR 反应液中加入  $2\text{ }\mu\text{L}$  cDNA 模板、 $0.8\text{ }\mu\text{L}$  正反向引物( $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ )、 $10\text{ mL}$  SYBR<sup>R</sup> PremixEx-Taq<sup>TM</sup>II( $2\times$ )以及  $6.4\text{ }\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。反应条件是:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $1\text{ min}$ ;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$   $10\text{ s}$ ,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$   $30\text{ s}$ ,  $40$  个循环。

表 1 RT-PCR 中所用引物序列及退火温度

Table 1 PCR primers and annealing temperatures used in RT-PCR

| 引物名称<br>Primer's name | 登录号<br>GenBank | 退火温度/ $^{\circ}\text{C}$<br>Annealing temperature | 引物序列<br>Primer sequence (5'-3')                  |
|-----------------------|----------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| TNF- $\alpha$         | EU047718.1     | 57                                                | GATTGGAGAGTGAACCAGGACC<br>GCTGTAGACGAAGTAAATGCCG |
| IL-1 $\beta$          | JN705663.2     | 57                                                | GTGCCAGGTGCCAAGTAGC<br>AAGCCAAGATATGCAGGAGT      |
| IL-10                 | HQ388294.1     | 57                                                | TCCCTTTGAGTTTGCCACCAT<br>GCCAGCCATCATCCAATCCAC   |
| TLR4                  | EU699768.1     | 55                                                | TTCCACCTATTCATCTTTGC<br>ACTTTACGGCTGCCATT        |
| 18S rRNA              | EU047719.1     | 57                                                | ATTTCGACACGGAGAGG<br>CATGGGTTTAGGATACGCTC        |

1.5 数据分析

采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法对待测基因的表达水平进行相对定量,数据用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,采用方差分析法(ANOVA)进行差异显著性分析,  $P<0.05$  表示显著性差异。

2 结果与分析

2.1 头肾中各基因的表达

头肾中,各基因的表达如图 1A。可以看出 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-10 在各组间的表达量有显著性差

异。与对照组相比,E-LPS 组中 IL-10 的表达有显著性下降,而 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表达量有显著性升高;C-LPS 组中 IL-10 和 TNF- $\alpha$  的表达有显著性上升,IL-1 $\beta$  的表达量却显著下降。同时,相对于 C-LPS 组,E-LPS 组中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  表达量有显著升高;而 IL-10 有明显的下降。TLR4 的表达量在 E-LPS 和 C-LPS 组中相比对照组都有显著下降,而这两组间 TLR4 的表达量无显著性差异。

2.2 脾脏中各基因的表达

脾脏中各基因的表达情况如图 1B。发现与对

照组相比,在 C-LPS 组中  $IL-1\beta$  和  $IL-10$  的表达量显著升高,E-LPS 组中其表达量只有略微的升高,无显著差异;而 C-LPS 组中  $IL-1\beta$  和  $IL-10$  的表达量显著高于 E-LPS 组中表达量。 $TNF-\alpha$  基因在各组间的表达无显著性差异。但  $TLR4$  在各组间的表达均有显著性差异,且处理组均低于对照组。

2.3 肾脏中各基因的表达

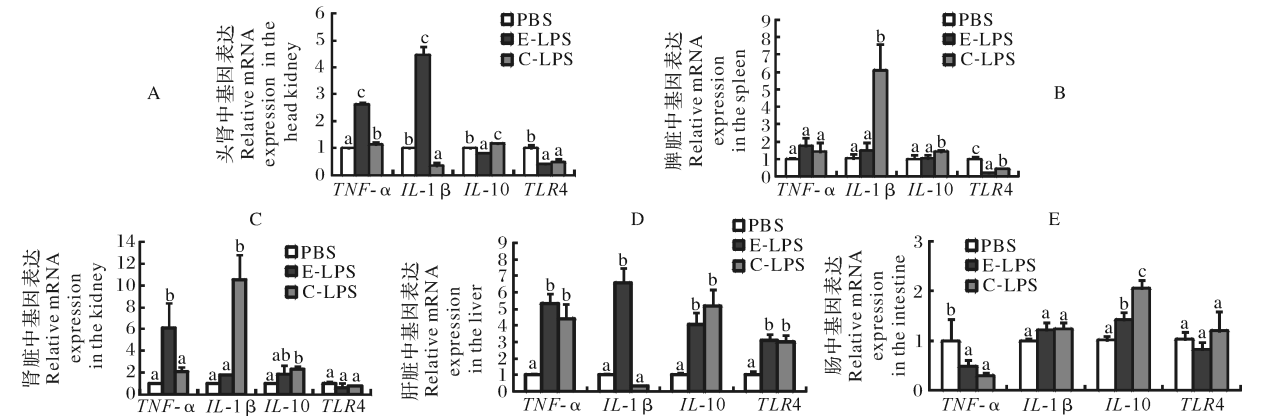
肾脏中各基因的表达情况如图 1C。可以看出 E-LPS 组中,  $IL-1\beta$  和  $IL-10$  的表达量略高于对照组,但  $TNF-\alpha$  有显著性升高。而 C-LPS 组中,相对于对照组,  $IL-1\beta$  和  $IL-10$  的表达量有显著性升高,  $TNF-\alpha$  的表达却无显著性差异,且 C-LPS 组中  $IL-1\beta$  的表达量相对 E-LPS 组也有显著性的升高。各组间  $TLR4$  的表达却不存在显著性差异。

2.4 肝脏中各基因的表达

肝脏中各基因的表达情况如图 1D。发现在 E-LPS 组中  $IL-1\beta$  表达最高,且与对照组和 C-LPS 组均有显著性差异,而 C-LPS 组中,  $IL-1\beta$  的表达量与对照组间无显著性差异。处理组中 (E-LPS 和 C-LPS),  $TNF-\alpha$ 、 $IL-10$  和  $TLR4$  的表达量均显著高于对照组,而这两组间无显著性差异。

2.5 肠组织中各基因的表达

肠组织中,各基因的表达如图 1E。可以发现  $IL-1\beta$  和  $TLR4$  的表达在各组间无显著差异。在 E-LPS 组和 C-LPS 组中,  $TNF-\alpha$  表达量相对于对照组均有显著下降,而这两组间无显著性差异;  $IL-10$  的表达量却显著升高,且 C-LPS 组中  $IL-10$  表达量显著高于 E-LPS 中的表达量。



同一基因下数据标注不同小写字母者表示差异显著 ( $P < 0.05$ ),  $n = 3$ 。Data with different letters in the same gene mean significant difference ( $P < 0.05$ ),  $n = 3$ 。

图 1 嗜水气单胞菌粗 LPS 和大肠杆菌 LPS 对草鱼头肾 (A)、脾脏 (B)、肾脏 (C)、肝脏 (D) 和肠 (E) 中  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-10$  和  $TLR4$  表达的影响

Fig.1 A. *hydrophilia* crude LPS and *E. coli* LPS influence the expression of  $TNF-\alpha$ ,

$IL-1\beta$ ,  $IL-10$  and  $TLR4$  in head kidney (A), spleen (B), kidney (C), liver (D) and intestine (E) of grass carp

3 讨论

细胞因子是鱼类免疫系统重要的组成部分,是一类由免疫细胞和非特异性免疫细胞合成或分泌的小分子多肽物质,具有调节多种细胞生理功能的作用。其中白细胞介素 (IL) 家族作为一类细胞因子,由活化的单核/巨噬细胞及淋巴细胞等产生,作用于淋巴细胞、巨噬细胞或其他细胞,参与炎症反应的部分或全过程,在免疫激活、免疫趋化、免疫应答、炎症放大或炎症抑制方面起重要作用。目前已知,大多数 IL 在免疫反应中都发挥免疫增强作用,如  $IL-1\beta$

是一种多效的促炎细胞因子,具有一系列引发炎症、调节代谢、造血和促进免疫学活性的作用,其作为免疫调控细胞因子具有增强免疫反应的潜力。其可以通过诱导淋巴细胞、相关组织细胞、血管内皮细胞和炎症反应效用细胞的生长和发育,促进细胞调控免疫。但过多的释放对组织或许会有不同程度的伤害,并导致炎症和自身免疫反应的发生。研究发现, *E. coli* LPS 可促进虹鳟体外培养白细胞中  $IL-1\beta$  的表达<sup>[13-14]</sup>。本研究中 E-LPS 组  $IL-1\beta$  的表达在肝脏、肠和头肾组织中显著高于对照组,说明 *E. coli* LPS 可促进草鱼相关组织的免疫反应。这与 *E. co-*

*li* LPS 刺激黄鳍鲷头肾和脾组织<sup>[15]</sup>以及松江鱼脾脏<sup>[16]</sup>中  $IL-1\beta$  的表达结果一致。在 C-LPS 组中  $IL-1\beta$  的表达量在脾脏和肾脏中有显著上升,说明 *A. hydrophila* LPS 同样可促进机体的免疫反应。在头肾中,  $IL-1\beta$  的表达量在 C-LPS 组中有显著下降,表明 C-LPS 与 E-LPS 对草鱼的免疫刺激强度是不尽相同的。对虹鳟研究结果表明大肠杆菌粗 LPS 可促进巨噬细胞  $IL-1\beta$  的表达,但纯的 *E. coli* LPS 对  $IL-1\beta$  表达水平没有影响<sup>[17]</sup>。因此,不同试验对象以及 LPS 作用时间均会影响表达水平,并且与细胞因子半衰期较短等特点有关<sup>[19]</sup>,而不同组织对 LPS 刺激的应答也是不同的。

TNF- $\alpha$  在炎症反应与免疫调节中具有重要的作用,也由多种免疫细胞分泌。在炎症所引起的细胞因子级联反应中最先释放的是 TNF- $\alpha$ ,其后即为  $IL-1\beta$ ,TNF- $\alpha$  的功能大多与  $IL-1\beta$  的功能交错呼应并且协同工作<sup>[18]</sup>。研究表明 LPS 刺激体外培养的牙鲈血液白细胞<sup>[19]</sup>和虹鳟头肾白细胞<sup>[20]</sup> TNF- $\alpha$  基因的表达。Chettri 等<sup>[10]</sup>对虹鳟的研究也证明,LPS 可促进头肾巨噬细胞 TNF- $\alpha$ 、 $IL-1\beta$  的表达,且  $IL-1\beta$  的表达表现出剂量和时间的依赖性。本研究发现,除了肠组织外其他组织中 TNF- $\alpha$  的表达在 E-LPS 和 C-LPS 组比对照组都有升高,特别是在肾、肝和头肾组织。LPS 刺激花鲈 4 h 后,脾和头肾中 TNF- $\alpha$  的表达最高,其次是肝脏等组织<sup>[11]</sup>。Rohrer 等<sup>[21]</sup>研究发现,纯的 LPS 更能刺激虹鳟 TNF- $\alpha$  的释放。Jovanovic 等<sup>[22]</sup>发现,任何浓度下的粗 LPS 都不能引起肥头鲈嗜中性粒细胞的呼吸爆发,超纯的 LPS 却表现出潜在的诱导呼吸爆发的能力。在本研究中,E-LPS 更能刺激 TNF- $\alpha$  基因的表达,表明 E-LPS 可能在预防病原菌引起的鱼类疾病方面具有潜在的功能。

在 IL 家族中,大多成员具有免疫促进作用,但也有少数具有免疫抑制作用,如 IL-10。同时 IL-10 也属于抗炎因子,系 Th2 细胞分泌,可从源头上抑制 Th1 细胞(主要分泌促炎细胞因子)增殖,有助于清除致炎因素,从而降低致炎因子功能,有利于炎症反应的降低或停止,使机体重新恢复免疫稳态。Zhang 等<sup>[23]</sup>研究发现,斑马鱼在受到 LPS 刺激 4 h 时,其肾、鳃、肠中  $IL-10$  有显著性表达。虹鳟注射 LPS 3~6 h 后,  $IL-10$  在头肾和脾中表达量有明显上升<sup>[24]</sup>。本研究发现,在肝脏和肠组织中,与对照

组相比,处理组中  $IL-10$  有显著性的升高。说明 E-LPS 与 C-LPS 都可刺激 Th2 细胞,从而诱导  $IL-10$  的分泌。结合本试验肠组织中 TNF- $\alpha$  的表达变化,说明肠组织中 E-LPS 或 C-LPS 能抑制或减少其促炎细胞因子的表达,促进抗炎细胞因子(如  $IL-10$ )的表达,从而预防和缓解炎症反应。而在脾脏、肾脏及头肾组织中,  $IL-10$  的变化只有在 C-LPS 组中有显著性的升高,说明 E-LPS 的致炎作用比 C-LPS 更强。

Toll 样受体(Toll-like receptors,TLRs)是存在于细胞膜上的模式识别受体,在病原识别、启动和诱导机体的免疫应答中发挥极其重要的作用。其表达于各种免疫细胞,包括巨噬细胞、树突状细胞(DCs)、B 细胞和某些特殊类型的 T 细胞,甚至在某些非免疫细胞如成纤维细胞和上皮细胞也有表达<sup>[25]</sup>。哺乳动物中,LPS 可被 TLR4 所识别,注射 LPS 会引起 TLR4 表达的增加<sup>[26]</sup>,但在鱼类中 TLR4 对 LPS 不是很敏感。一些研究表明,TLR4 在鱼类进化中是缺失的<sup>[27]</sup>,但目前发现鲤科鱼类中存在 TLR4 基因<sup>[28-29]</sup>。病原菌可引起鱼类组织中 TLR4 的上调<sup>[30]</sup>,但 LPS 却不引起类似变化<sup>[31]</sup>。本研究中,注射 LPS 后,TLR4 表达水平只有在肝脏中升高,但在头肾和脾脏中均下降,说明鱼类 TLR4 对 LPS 的应答与哺乳动物是不同的,在鱼类中 LPS 的受体还有待进一步的研究。

综上所述,E-LPS 或 C-LPS 对草鱼主要免疫组织中各细胞因子参与免疫的活性有较大影响,可促进机体免疫反应。而对于粘膜免疫系统,其作用可能不同于系统免疫。同时,E-LPS 和 C-LPS 对草鱼免疫的刺激有所不同,粗提的 *A. hydrophila* LPS 因可能含有细胞外的其他成分,导致其一些作用效果不同于纯的 LPS。

## 参 考 文 献

- [1] WANG L Y, LI S T, LI Y. Identification and characterization of a new exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Streptomyces* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 220(1): 21-27.
- [2] 陈昌福,陈超然. 鱼类三种致病菌的粗脂多糖对异育银鲫的免疫原性[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 483-488.
- [3] NAYAK S K, SWAIN P, NANDA P K, et al. Immunomodulating potency of lipopolysaccharides (LPS) derived from smooth type of bacterial pathogens in Indian major carp [J]. Vet Microbiol, 2011, 151(3/4): 413-417.

- [4] 康洁. 大肠杆菌脂多糖对草鱼的免疫调节作用[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 295-297.
- [5] 张波, 曾令兵, 罗晓松, 等. 嗜水气单胞菌3种疫苗免疫的青鱼外周血免疫指标的变化[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1): 100-105.
- [6] SUN J H, WANG Q K, QIAO Z Y, et al. Effect of lipopolysaccharide (LPS) and outer membrane protein (OMP) vaccines on protection of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) against *Aeromonas hydrophila* [J]. Isr J Aquacult-bamid, 2012, 64: 1-8.
- [7] TSUTSUI S, IWAMOTO T, NAKAMURA O, et al. LPS induces gene expression of interleukin-1 beta in conger eel (*Conger myriaster*) macrophages: first cytokine sequence within Anguilliformes [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(4): 911-916.
- [8] SKUGOR S, SKUGOR A, TODORCEVIC M, et al. Exposure to lipopolysaccharide induces immune genes in cultured preadipocytes of Atlantic salmon [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(5): 817-824.
- [9] TELES M, MACKENZIE S, BOLTANA S, et al. Gene expression and TNF-alpha secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(1): 340-346.
- [10] CHETTRI J K, RAIDA M K, HOLTEN-ANDERSE N, et al. PAMP induced expression of immune relevant genes in head kidney leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Dev Comp Immunol, 2011, 35(4): 476-482.
- [11] 邱丽华, 宋林生, 蔡中华, 等. 花鲈肿瘤坏死因子基因及其在LPS和病毒刺激下表达的研究[J]. 高技术通讯, 2004(11): 81-86.
- [12] WESTPHAL O, JANN K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure [C]//WHISTLER R L, BEMILLER J N, WOLFROM M L. Methods in carbohydrate chemistry. New York: Academic Press, 1965, 5: 83-91.
- [13] ZOU J, HOLLAND J, PLEGUEZUELOS O, et al. Factors influencing the expression of interleukin-1 beta in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes [J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24(6/7): 575-582.
- [14] ZOU J, GRABOWSKI P S, CUNNINGHAM C, et al. Molecular cloning of interleukin 1 beta from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ice cut site [J]. Cytokine, 1999, 11(8): 552-560.
- [15] JIANG S G, ZHANG D C, LI J Z, et al. Molecular characterization, recombinant expression and bioactivity analysis of the interleukin-1  $\beta$  from the yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 24(3): 323-336.
- [16] LIU Y Y, YU S S, CHAI Y M, et al. Lipopolysaccharide-induced gene expression of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 and interleukin-1  $\beta$  in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33(4): 690-698.
- [17] MACKENZIE S A, ROHER N, BOLTANA S, et al. Peptidoglycan, not endotoxin, is the key mediator of cytokine gene expression induced in rainbow trout macrophages by crude LPS [J]. Mol Immunol, 2010, 47(7/8): 1450-1457.
- [18] SECOMBES C J, WANG T, HONG S, et al. Cytokines and innate immunity of fish [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25(8/9): 713-723.
- [19] HIRONO I, NAM B H, KUROBE T, et al. Molecular cloning, characterization and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. J Immunol, 2000, 165(8): 4423-4427.
- [20] LAING K J, WANG T, ZOU J, et al. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- $\alpha$  [J]. Eur J Biochem, 2001, 268(5): 1315-1322.
- [21] ROHER N, CALLOL A, PLANANS J V, et al. Endotoxin recognition in fish results in inflammatory cytokine secretion not gene expression [J]. Innate Immunity, 2011, 17(1): 16-28.
- [22] JOVANOVIC B, BARAN E, GOETZ F W, et al. Effects of different lipopolysaccharide preparations on neutrophil function in the fathead minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque [J]. J Fish Dis, 2011, 34(11): 877-880.
- [23] ZHANG D C, SHAO Y Q, HUANG Y Q, et al. Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. J Biochem Mol Biol, 2005, 38(5): 571-576.
- [24] INOUE Y, KAMOTA S, ITO K, et al. Molecular cloning and expression analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-10 cDNAs [J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 18(4): 335-344.
- [25] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. Cell, 2006, 124(4): 783-801.
- [26] 任大宾, 杜烨玮, 张健, 等. 静脉注射脂多糖上调小鼠肺及肝CD14和Toll-like受体4表达 [J]. 基础医学与临床, 2005, 25(4): 331-335.
- [27] BAOPRASERTKUL P, XU P, PEATMAN E, et al. Divergent toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5S, TLR20, TLR21 [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(6): 1218-1230.
- [28] MEIJER A H, GABBY KRENS S F, MEDIA RODRIGUEZ I A, et al. Expression analysis of the toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish [J]. Mol Immunol, 2004, 40(11): 773-783.
- [29] JAULT C, PICHON L, CHLUBA J. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio* [J]. Mol Immunol, 2004, 40(11): 759-771.
- [30] SU J G, YANG C R, XIONG F, et al. Toll-like receptor 4 signaling pathway can be triggered by grass carp reovirus and *Aeromonas hydrophila* infection in rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(1): 33-39.

[31] SEPULCRE M P,PEREZ F A,MUNOZ A L,et al. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-κB activation[J]. J Immunol,2009,182(4):1836-1845.

Effects of LPS from *Aeromonas hydrophila* and *Escherichia coli* on expression of immune related genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*

PENG Xiao-yun   LIU Hong   CHEN Xiao-xuan   ZHANG Qi  
YUAN Juan   LIU Jia-jia   WU Zhi-xin

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture /  
Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

**Abstract** In the present study, grass carps were injected intraperitoneally with crude *Aeromonas hydrophila* lipopolysaccharide (C-LPS), pure *Escherichia coli* LPS (E-LPS) and phosphate-buffered saline (PBS, as control) at 4 mg/kg, respectively. After 48 h, fish tissues including head kidney, spleen, liver, kidney and intestine in the treated and control group were taken to detect the expression of *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-10* and *TLR4* genes by quantitative real time PCR. The results showed that, in head kidney, the expression of *TNF-α* and *IL-1β* genes was significantly up-regulated, but the expression of *IL-10* was significantly decreased in E-LPS group; the expression of *TNF-α* and *IL-10* genes were significantly up-regulated in C-LPS group, and the *TLR4* was significantly decreased in both treated groups. In spleen, the expression of *TNF-α*, *IL-1β* and *IL-10* genes was not significantly different in E-LPS group from the control, the *IL-1β* and *IL-10* levels were significantly up-regulated in C-LPS group, and the expression of *TLR4* was significantly decreased in both treated groups. In kidney, the *TNF-α* and *IL-1β*, *IL-10* levels were significantly increased in the two treated groups, but the expression of *TLR4* gene was not different from the control. In liver, the *TNF-α*, *IL-10* and *TLR4* levels were significantly higher in the two treated groups, while the expression of *IL-1β* was significantly up-regulated in E-LPS group compared to both the control and C-LPS groups. In intestine, the *TNF-α* and *IL-10* genes were significantly induced in the two treated groups and the *IL-1β* and *TLR4* genes were not significantly induced. These results indicated that LPS can induce the expression of the immune related genes of the host, but LPS could not make the up-regulation of the *TLR4* gene, which is different from the mammal.

**Key words** *Aeromonas hydrophila*; *Escherichia coli*; LPS; grass carp; immune related gene

(责任编辑:边书京)