

嗜水气单胞菌感染对团头鲂肝脏铁代谢的影响

杨永波^{1,2} 扶晓琴^{1,2} 陈柏湘³ 王卫民¹ 刘红^{1,2}

1.华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室,武汉 430070;

2.淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心,武汉 430070; 3.湖北百容水产良种有限公司,黄冈 438800

摘要 为研究细菌感染对鱼类肝脏铁代谢的影响,以团头鲂为研究对象,通过腹腔注射嗜水气单胞菌,在感染后不同时间点取团头鲂的血液和肝脏组织,分别采用分光光度法和 ICP 法检测血清和肝脏中的铁含量,采用实时荧光定量 PCR 法对铁代谢调节相关基因——铁调素(*hepc*)、白细胞介素 6(*il-6*)、JAK/STAT 信号通路的蛋白质酪氨酸激酶 3(*jak3*)、信号转导子和转录激活因子 3(*stat3*)等表达量进行检测。结果显示:感染嗜水气单胞菌后,团头鲂血清中铁浓度明显降低,在 12、24 h 时显著低于对照组,总铁结合力有所上升,但没有达到显著水平;肝脏中铁含量相对于对照组虽没有达到显著性差异水平,但仍有明显升高。肝脏中 *hepc* 基因的表达量显著上升;*il-6*、*jak3* 和 *stat3* 基因表达量开始均有所上调,随后有所下降,但各时间点的表达量均高于对照。试验结果说明,机体通过调节 *hepc* 等铁代谢相关基因的表达,进而降低自身游离铁和增加储存铁来应对病原菌的感染。

关键词 嗜水气单胞菌; 铁代谢; 铁调素; 白细胞介素 6; JAK/STAT 信号通路

中图分类号 S 917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)04-0097-05

铁是机体不可或缺的微量元素之一,参与诸多代谢途径,也是免疫系统发挥作用的重要辅助因子,可影响巨噬细胞的杀菌功能以及免疫细胞的增殖和活性^[1]。缺铁和铁过量均会导致机体损伤,所以维持机体铁稳态十分重要。同时,铁也是需铁病原微生物和宿主相互竞争的对象,机体可以通过调节铁代谢水平,一定程度上抑制病原微生物的侵害。Hepcidin 基因(*hepc*)是一种主要由肝细胞产生的防御性抗菌肽,属于防御素蛋白家族^[2],具有抑菌活性^[3],同时也是机体铁代谢的关键调节因子,对维持铁平衡具有重要作用,俗称铁调素^[4-5]。炎症能强烈地刺激铁调素的表达,大量的证据表明,引起铁调素表达的炎症介质主要是白细胞介素 6(*il-6*)^[6]。*il-6* 是通过刺激 JAK/STAT(janus protein tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription, janus 蛋白酪氨酸激酶/信号转导子和转录激活子)信号通路调节铁调素表达的,铁调素基因的启动子包含有磷酸化的 STAT3 二聚体的结合位点^[7]。*il-6* 与受体结合后激活 JAK/STAT 信号,进而磷酸化 STATs 蛋白,主要是 STAT3,进入细胞核,上调 *hepc* 基因的表达。团头鲂(*Megalobrama*

amblycephala)是我国主要的淡水养殖品种之一。近年来,嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),一种革兰氏阴性菌,也是需铁病原菌,对团头鲂养殖造成的危害日渐严重^[8]。本试验拟通过检测感染嗜水气单胞菌后团头鲂铁代谢水平和肝脏中 *hepc*、*il-6*、JAK/STAT 信号通路的 *jak3* 和 *stat3* 基因表达量变化趋势,探讨病原菌感染和机体铁代谢之间的相互作用,为进一步研究铁代谢在机体应对细菌感染中的作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

嗜水气单胞菌由笔者所在实验室分离、保存。

试验用团头鲂购自湖北省黄冈市团风县湖北百容水产良种有限公司,选取外观健康、大小基本一致的团头鲂幼鱼,鱼体质量为(30±5) g、体长为(12±3) cm。将试验鱼随机分为 2 个处理组:试验组和对照组,每个处理组设 3 个平行,每个平行组 80 尾鱼,共 480 尾。

1.2 嗜水气单胞菌感染和样品采集

根据以往文献^[9]及预试验结果,确定用于感染

收稿日期: 2015-03-02

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD26B00); 中央高校基本科研业务费专项(2014PY042)

杨永波,硕士研究生. 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: 1054033770@qq.com

通信作者: 刘红,博士,教授. 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

的最适菌悬液浓度为 1.0×10^6 cfu/mL。将 28 °C 恒温过夜培养的嗜水气单胞菌菌苔用 0.65% 无菌生理盐水洗脱, 稀释成 1.0×10^6 cfu/mL 的菌悬液, 采用腹腔注射法, 注射前用乌来糖将试验用鱼进行轻度麻痹, 试验组每尾注射 0.1 mL 的菌悬液, 对照组注射等量的无菌生理盐水。注射后 0、4、12、24、72、120 h 分别采集试验组和对照组鱼的肝脏和血液, 每个时间点每个平行取 6 尾鱼, 将一次性 1 mL 注射器用肝素钠(1 000 IU/mL) 润洗, 从鱼体尾静脉取血 0.5~1.0 mL。采血后立即解剖, 取出肝脏组织置于液氮中, 之后于 -80 °C 保存, 用于后面的肝脏铁含量和基因表达测定。

1.3 血清铁浓度、总铁结合力的测定

血清样品制备: 采取的血液于 4 °C 静置 2 h 左右, 以 4 000 r/min 离心 13 min 后收集上层血清, -20 °C 冰箱过夜, 次日血清解冻后再次低速度离心, 吸取上层液 -80 °C 保存备用。

血清铁浓度及总铁结合力(mg/L)的测定使用血清铁、总铁结合力试剂盒(南京建成生物工程研究所)。血清铁浓度的检测原理: 在酸性溶液和还原剂的作用下, 使转铁蛋白中铁与蛋白分离, 使血清中高铁还原成亚铁, 后者与双吡啶结合成粉红色的络合物, 在一定范围内, 铁离子的多少与色泽成正比。总铁结合力的检测原理: 血清内加入过量的铁, 使血清中转铁蛋白全部与铁结合, 再加入铁吸附剂将多余的铁吸附掉。然后依据血清铁检测方法测定铁含量, 即总铁结合力。测定步骤具体参照试剂盒说明书, 利用紫外分光光度计(NanoDrop 2000, 德国 epENDORF 公司)测定, 每一样品重复检测 3 次。

1.4 肝脏铁浓度的测定

采用电感耦合等离子发射光谱仪(Inductive Coupled Plasma Emission Spectrometer)检测肝脏铁含量(干法消化): 将肝脏样品解冻后, 用冷生理盐水冲洗干净并用滤纸吸干后称质量(精确到 0.000 1 g), 粉碎均匀后置于瓷干锅中, 在电炉上炭化完全, 无烟为止, 置于马弗炉内, 由室温开始, 徐徐升温, 经 600 °C 灼烧 5 h, 直至试样呈白色或者灰白色、无炭粒为止。冷却后取出, 用 1:1 的硝酸(5 mL)溶解, 电炉上加热直至沸腾为止, 过滤至 50 mL 容量瓶, 并用双蒸水反复洗涤坩埚和滤纸, 洗涤液并入容量瓶中, 然后用双蒸水定容, 混匀, 作为试样溶液。同时配置试剂空白液。采用 ICP 仪(Optima 8000DV 型, 美国 PEKINELMER 公司)测定, 每一样品重复检测 3 次。

1.5 肝脏铁代谢相关基因时空表达特征分析

根据团头鲂 *hepc*、*il-6* 基因 cDNA 序列(JQ308841、KJ755058)和亲缘关系较近的鲤 *jak3* 基因 cDNA 序列(AF148993)、草鱼 *stat3* 基因序列(JX976548)设计引物(表 1)。采用 RNAiso(TaKaRa, Dalian, China)提取肝脏总 RNA, 反转录成 cDNA, 根据说明书在 Rotor-Gene6500 实时定量仪(澳大利亚)上进行实时荧光定量 PCR。目的基因在肝脏中的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法确定, 选择团头鲂 18S rRNA 基因作为内参(AB860215.1)。实时荧光定量 PCR 反应体系: 0.4 μ L 上下游引物, 2 μ L cDNA 模板, 7.2 μ L ddH₂O, 总体积 20 μ L。反应条件为: 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环, 溶解曲线温度从 52 °C 到 99 °C。每一样品重复检测 3 次。

表 1 目的基因荧光定量 PCR 扩增引物序列

Table 1 The primer sequences of target genes used for qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度/°C Annealing temperature	预计扩增片段长度/bp Expected amplified fragment length
<i>hepc</i>	CAGACCGCAGCCGTTCCCTT AGCAGTATCCACAGCCTTTG	58	135
<i>il-6</i>	ACAGCAGTATGGGGAGTTAT TTCATCACGCAGAGTTTTCAC	56	156
<i>jak3</i>	CTTCAGGTTGCGTTCTCC CCAGAGGCTCACAGACAAG	60	121
<i>stat3</i>	CGCATCACTGTTGGTTCGG GCAGCCATTAGAGGTTACG	58	142
18S rRNA	CGGAGGTTTGAAGACGATCA GGGTCGGCATCGTTTACG	60	154

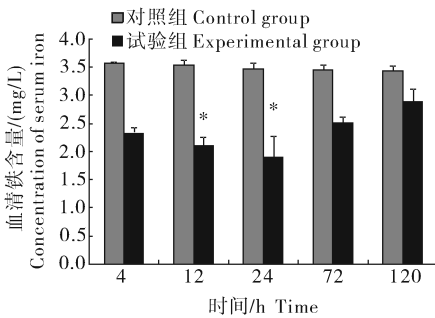
1.6 数据分析

所有数据利用 SPSS17.0 软件进行统计分析,采用 *t* 检验法进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。所有数值均为平均值 ± 标准差。

2 结果与分析

2.1 嗜水气单胞菌感染对团头鲂血清铁浓度的影响

嗜水气单胞菌感染后不同时间点团头鲂血清中铁浓度的变化趋势如图 1 所示。细菌感染后各时间点, 试验组团头鲂的血清铁浓度均有不同程度降低, 感染后 12、24 h 均达到了显著性水平 ($P < 0.05$), 随后有所上升, 但仍低于对照组。



* : 显著性差异 $P < 0.05$ * means significant difference ($P < 0.05$).

图 1 嗜水气单胞菌感染后团头鲂血清铁浓度

Fig.1 Concentration of serum iron in *M. amblycephala* after *A. hydrophila* infection

2.2 嗜水气单胞菌感染对血清总铁结合力的影响

嗜水气单胞菌感染后不同时间点团头鲂血清中转铁蛋白总铁结合力的变化趋势如图 2 所示。试验组团头鲂血清的总铁结合力相对于对照组略有不同程度增加, 但均未达到显著性水平。

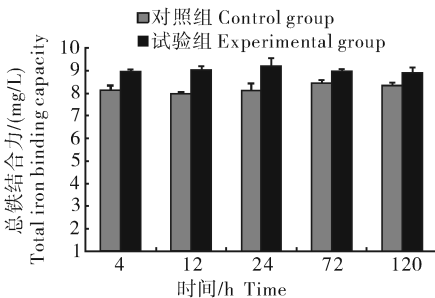


图 2 嗜水气单胞菌感染后团头鲂血清总铁结合力

Fig.2 Total iron binding capacity of *M. amblycephala* serum after *A. hydrophila* infection

2.3 嗜水气单胞菌感染对团头鲂肝脏铁含量的影响

在嗜水气单胞菌感染后各个时间点试验组肝脏铁含量均高于对照组, 但并无显著差异 ($P > 0.05$) (图 3)。

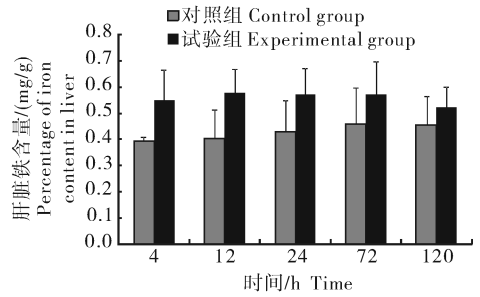


图 3 嗜水气单胞菌感染后不同时点团头鲂肝脏铁含量

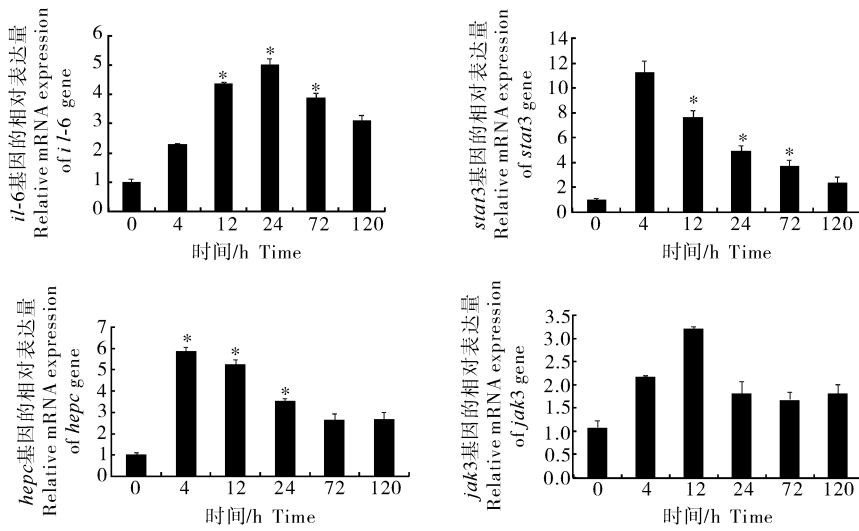
Fig.3 Iron content in the *M. amblycephala* liver after *A. hydrophila* infection

2.4 嗜水气单胞菌感染对 hepc、il-6、jak3、stat3 基因表达的影响

在注射嗜水气单胞菌后, *hepc* 基因在各时点表达量相对于 0 h 明显上调, 在 4、12、24 h 达到显著性差异 ($P < 0.05$), 在感染后 4 h 达到最高, 随后逐渐下降。 *il-6* 基因在感染后的表达量明显上调, 在 24 h 时表达量最高, 随后有所下降, 在 12、24、72 h 均达到了显著性差异 ($P < 0.05$); *jak3*、*stat3* 基因的表达量亦均有所上调, *jak3* 基因在 12 h 时表达量达到最高 ($P < 0.05$), *stat3* 基因在 4 h 时的表达量达到最高, 随后逐步下降, 但仍明显高于感染前的表达水平, 见图 4。

3 讨论

铁是机体多种酶类合成的必要元素, 参与氧气运输、细胞增殖和分化、电子转移等多种生命活动^[10]。铁也是需铁病原菌增殖分化的必要元素, 并且对致病病毒力的强弱也具有重要影响。病原菌入侵后通过摄取宿主体内的铁以满足其增殖和致病力的表达。宿主通过降低机体的铁代谢水平, 在一定程度上可以抑制病原菌的增殖并降低其致病力^[11]。本试验结果显示, 在感染嗜水气单胞菌后团头鲂血清铁含量有所下降, 并在感染后 12、24 h 达到显著性水平。肝脏铁含量在感染后有所上升, 但没有达到显著性水平。这可能与机体在感染后通过一系列自我调节, 降低机体的铁循环以抑制病原菌的侵害以及病原菌在机体内迅速增殖消耗大量铁有关^[12]。感染后的血清总铁结合力相对于对照组有所上升, 虽没有达到显著性水平, 但结合细菌感染后鱼体血清铁含量的变化趋势和转铁蛋白的上调^[13], 可以认为, 血清铁和转铁蛋白的比率显著下降, 进一步提高了铁与转铁蛋白的结合效率, 有利于抑制嗜水气单胞菌从体内摄取铁的能力。



* 表示显著性差异 ($P < 0.05$) * means significant difference ($P < 0.05$).

图 4 嗜水气单胞菌感染后 *hepc*、*il-6*、*jak3*、*stat3* 基因在团头鲂肝脏中相对表达量

Fig.4 Relative mRNA expression of the *hepc*, *il-6*, *jak3*, *stat3* genes in the liver of *M. amblycephala* after *A. hydrophila* infection

本试验中所检测的团头鲂肝脏 *hepc*、*il-6*、*jak3* 和 *stat3* 基因在嗜水气单胞菌感染后早期 4、12 h 都有不同程度的显著上调,表明这些基因都参与了鱼体的非特异性免疫反应,同时这些基因也不同程度地参与了细菌感染后的铁代谢调节。*hepc* 基因主要在肝脏中合成和分泌,可以抑制肠道铁的吸收和肝脏铁的释放以降低机体的铁代谢水平,是机体调节铁代谢的关键因素^[14]。研究证实,大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* Linnaeus) 在感染病原菌后,肝、脾、鳃等组织中 *hepc* 基因的表达量均显著性增高^[15]。感染链球菌 (*Streptococcus iniae*) 后,鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 肝细胞 *hepc* mRNA 水平在数小时内明显上调^[16]。香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 肝脏中 *hepc* 基因表达量在感染鳃利斯顿氏菌 (*Listonella anguillarum*) 后显著上升^[17]。本试验中,*hepc* 基因在感染后不同时间点的表达量均有所上升,并在 4、12、24 h 达到了显著性差异。

机体受病原菌侵害时,巨噬细胞等免疫细胞会合成、分泌大量的炎症因子,其中主要为白细胞介素 6 (*il-6*)。炎症反应可通过一系列生化过程调节 *hepc* 基因的表达,进而影响机体铁代谢水平。*il-6* 和受体结合后可激活 *jak* 基因,进而磷酸化 *stat3*, 进入细胞核,调节 *hepc* 基因的转录,促进 *hepc* 基因的表达^[7]。研究显示,在感染病菌后,金头鲷 (*Sparus aurata*) 各组织 *il-6* 的表达量均有所上调^[18]。

本试验中,在感染嗜水气单胞菌后各时间点团头鲂肝脏中 *il-6* 的表达量均有所上升,在 12 h 达到最高,随后有所下降,但仍明显高于 0 时点的表达量。*jak3* 和 *stat3* 基因的表达量也均有所上调,在 4、12 h 分别达到最高,随后有所下降。可以推测,当病原菌入侵时,引起机体发生炎症反应,在 *il-6* 基因和 JAK/STAT 通路相关基因的影响下,*hepc* 基因的表达量上升,进而下调机体的循环铁浓度,以应对病原菌的侵害。

参 考 文 献

- [1] 张玉超,沈媛媛,晏向华,等.哺乳动物铁稳态分子机制研究进展[J].中国细胞生物学学报,2011,33(11):1179-1190.
- [2] DRAKESMITH H, PRENTICE A M. Hcpidin and the iron-infection axis[J]. Science, 2012, 338: 768-772.
- [3] PARK C H, VALORE E V, WARING A J, et al. Hcpidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 7806-7810.
- [4] PIGEON C, ILYIN G, COURSELAUD B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hcpidin, is overexpressed during iron overload[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 7811-7819.
- [5] 李擎天,褚嘉祐,郭晓奎. Hcpidin、铁代谢与感染[J]. 国外医学:微生物学分册, 2004, 27(6): 20-23.
- [6] PEELING P, DAWSON B, GOODMAN C. Cumulative effects

- of consecutive running sessions on hemolysis, inflammation and Hepsidin activity[J]. *European Journal of Applied Physiology*, 2009, 106(1): 51-59.
- [7] VERGA FALZACAPPA M V, VUJIC SPASIC M, KESSLER R. STAT3 mediates hepatic Hepsidin expression and its inflammatory stimulation[J]. *Blood*, 2007, 109(1): 353-358.
- [8] 陈婷婷, 杨永波, 杨东辉, 等. 湖北、江苏团头鲂源嗜水气单胞菌致病性与药敏特性研究[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(8): 29-35.
- [9] DING Z J, WU J J, SU L, et al. Expression of heat shock protein 90 genes during early development and infection in *Megalobrama amblycephala* and evidence for adaptive evolution in teleost[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41: 683-693.
- [10] LIEU P T, HEISKALA M, PETERSON P A, et al. The roles of iron in health and disease[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2001, 22(1/2): 1-87.
- [11] PATRUTA S I, HORL W H. Iron and infection[J]. *Kidney International*, 1999, 55: 125-130.
- [12] 苗魏, 底晓静, 段相林, 等. Hepsidin: 连接免疫和铁代谢的桥梁[J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 23: 1052-1054.
- [13] DING Z, ZHAO X, SU L, et al. The *Megalobrama amblycephala* transferrin and transferrin receptor genes: molecular cloning, characterization and expression during early development and after *Aeromonas hydrophila* infection [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 49(2): 290-297.
- [14] 刘树欣, 卢红梅, 刘玉倩, 等. 铁调素的表达与调节机制[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(41): 7739-7742.
- [15] CHEN S L, LI W, MENG L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22: 172-181.
- [16] RODRIGUES P N S, VAZQUEZ-DORADO S, NEVES J V, et al. Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2006, 30: 1156-1167.
- [17] 陈梅珍, 陈炯, 陆新江, 等. 香鱼 hepcidin 基因的克隆、序列分析及组织表达特征[J]. *动物学研究*, 2010, 31: 595-600.
- [18] CASTELLANAA B, ILIEV D B, SEPULCRE M P. Molecular characterization of interleukin-6 in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45: 3363-3370.

Effect of *Aeromonas hydrophila* infection on iron metabolism in *Megalobrama amblycephala* liver

YANG Yong-bo^{1,2} FU Xiao-qin^{1,2} CHEN Bo-xiang³ WANG Wei-min¹ LIU Hong^{1,2}

1. College of Fisheries/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Freshwater Aquaculture Collaboration Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China;

3. Hubei Bairong Improved Aquatic Seed CO., LTD, Huanggang 438800, China

Abstract To study the effects of *Aeromonas hydrophila* infection on iron metabolism of *Megalobrama amblycephala*, the iron content of serum and liver was determined by spectrophotometer and Inductive Coupled Plasma Emission Spectrometer, respectively, and expression of the iron metabolism related genes were detected by quantitative real-time PCR at 0, 4 h, 12 h, 24 h, 72 h and 120 h after *A. hydrophila* infection. The results showed that the content of serum iron in the experimental group was significantly descended at 12 h and 24 h after infection ($P < 0.05$), while the iron content in the liver was increased though not significantly ($P > 0.05$). After infection, the expression level of *hepc*, *il-6*, *jak3*, *stat3* genes increased firstly, and then descended in the liver, but still significantly higher than that in the control. The results indicated that fish reduced the iron serum content in response to bacterial infections. The *hepc*, *il-6*, *jak3* and *stat3* genes may play important roles in both innate immunity and iron metabolism regulation upon bacterial infection.

Key words *Aeromonas hydrophila*; iron regulation; HEPIC; IL-6; JAK/STAT