

王辉,李思思,吴志新,等. 黄颡鱼朗格汉斯细胞的鉴定及其功能基因的表达分析[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(6): 173-179.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.06.023

黄颡鱼朗格汉斯细胞的鉴定及其功能基因的表达分析

王辉^{1,2}, 李思思^{1,2}, 吴志新^{1,2,3}, 许荔立¹, 田丁², 陈孝煊^{1,2,3}

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心, 武汉 430070;

3. 水产养殖国家级实验教学示范中心(华中农业大学), 武汉 430070

摘要 为研究黄颡鱼朗格汉斯细胞的结构特点以及细菌感染对其功能相关基因表达的影响, 采用免疫组化技术对黄颡鱼免疫器官中朗格汉斯细胞进行鉴定, 通过透射电镜进一步观察到黄颡鱼朗格汉斯细胞的超微结构, 并采用荧光定量 PCR 检测鲶爱德华氏菌感染后黄颡鱼免疫相关组织内朗格汉斯细胞功能相关基因 *IL-1 β* 、*TNF- α* 、*IL-10* 和 *TLR-4* 的表达情况。结果显示, 黄颡鱼头肾和脾脏中具有朗格汉斯细胞的特异性分子标记 CD207 蛋白, 且黄颡鱼朗格汉斯细胞的结构与其他脊椎动物类似, 即细胞质中大量的伯贝克颗粒围绕着中心粒呈放射状排列。在鲶爱德华氏菌感染后, 朗格汉斯细胞功能相关基因 *IL-1 β* 、*TNF- α* 、*IL-10* 和 *TLR-4* 在黄颡鱼免疫器官内的表达量显著上调。上述结果表明, 黄颡鱼含有朗格汉斯细胞, 并且其可能参与了机体抗鲶爱德华氏菌感染的免疫反应。

关键词 黄颡鱼; 朗格汉斯细胞; 鲶爱德华氏菌; 荧光定量 PCR; 基因表达; 超微结构; 免疫反应; 免疫组化

中图分类号 Q 959.499 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)06-0173-07

朗格汉斯细胞(Langerhans cells, LCs)是存在于哺乳动物表皮复层鳞状上皮细胞之间唯一的抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC), 能够有效捕获抗原并将其传递给 T 淋巴细胞, 诱导相应的免疫反应, 在特异性免疫反应的发生以及免疫耐受的维持方面发挥重要作用^[1-2]。

LCs 生物学功能的发挥是由众多基因共同调控的。研究表明, LCs 能够表达 CD207、CD1a、Toll-样受体(TLRs)、主要组织相容性复合体 II 类分子(MHC-II)以及共刺激分子 CD80 和 CD86 等抗原呈递相关基因^[3-4]。局部高表达的 *IL-1 β* 能够将 LCs 招募到炎症发生的位置, 吞噬侵入的病原菌^[5]。CD207 和 CD1a 不仅被认为是 LCs 相对特异性的分子标记, 更是呈递非多肽抗原的关键分子^[6-7]。此外, LCs 表面的 TLRs 能够识别不同类型的抗原, 抗原经过加工、处理后与细胞表面的 MHC-II 分子结合形成 MHC-II-抗原肽复合物, 并在趋化因子及其受体的共同作用下迁移到淋巴器官; 之后, 与高表达的共刺激分子 CD80 和 CD86 共同作用, 活化幼稚 T 淋巴细胞^[8]。

迄今为止, 免疫组化和透射电镜技术是研究硬骨鱼类朗格汉斯细胞的主要方法^[9-10]。Langerin/CD207 主要表达于朗格汉斯细胞表面, 是其生长和发育过程中不可或缺的重要分子^[11]。因此, 常以 CD207 抗体用于朗格汉斯细胞的鉴定。但至今还未在硬骨鱼类中找到哺乳动物 CD207 分子同系物。因此, 一直以人 CD207 多克隆抗体用于硬骨鱼类朗格汉斯细胞的鉴定。目前, 已经通过人 CD207 多克隆抗体在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑(*Atlantic salmon*)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)等多种硬骨鱼类的免疫器官中发现朗格汉斯细胞的存在^[12-13]。此外, 伯贝克颗粒(Birbeck granule)是朗格汉斯细胞特异性的形态学标记, 其通常呈网球拍状或者杆状并围绕中心粒呈放射状排列^[11]。有研究者通过这一形态特征在大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑(*Atlantic salmon*)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)等多种硬骨鱼类的免疫器官中发现朗格汉斯细胞的存在^[10, 12-15]。但关于黄颡鱼朗格汉斯细胞的研究尚未见报道。本研究

收稿日期: 2020-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672683, 31972819)

王辉, 硕士研究生。研究方向: 水产动物病害防治。E-mail: WangH9307@163.com

通信作者: 陈孝煊, 教授。研究方向: 鱼类病理与病害防控。E-mail: chenxx@mail.hzau.edu.cn

中,我们通过免疫组化和透射电镜技术观察到黄颡鱼朗格汉斯细胞的形态特点、HE 染色分析鲶爱德华氏菌对黄颡鱼鳃和肠道的病理损伤,并采用荧光定量 PCR 分析了鲶爱德华氏菌感染后黄颡鱼免疫相关组织内朗格汉斯细胞功能相关基因的表达情况,以期为黄颡鱼细胞免疫及抗菌感染机制的研究提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验鱼、菌株与样品采集

本试验中所用黄颡鱼购自湖北省武汉市黄陂源渔业发展有限公司,养殖在华中农业大学水产养殖基地循环水系统中,规格为体长(15 ± 3) cm、体质量(40 ± 5) g。试验开始前,暂养 2 周以适应实验室环境:水温 $23 \sim 25$ °C,溶解氧 $5 \sim 7$ mg/L,光周期为光照:黑暗 = 12 h:12 h。分别于每天 09:00 和 16:00 投喂商业饲料,投喂量约为黄颡鱼总体质量的 2%~3%。

鲶爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)由中国科学院水生生物研究所李爱华先生馈赠。菌种经划线活化后,挑选单菌落接种到液体 BHI 培养基(Hopebio,青岛)中,于 28 °C 摇床中培养 17 h。通过离心收集所有细菌,并用灭菌的 PBS 冲洗 2 次以去除多余的培养基。获得的细菌经过梯度稀释调整其浓度为 1.0×10^6 CFU/mL,备用。

暂养结束后,选择 100 尾健康黄颡鱼,分为感染组和对照组(每组 50 尾),分别腹腔注射 0.1 mL (1.0×10^6 CFU/mL)的鲶爱德华氏菌菌液和灭菌 PBS。分别在感染后 3 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、5 d 和 7 d 时,从每组中随机取 6 尾黄颡鱼,经 MS-222 麻醉后,取头肾、脾脏、鳃和肠道组织迅速放入 Trizol(TaKaRa,大连)中, -20 °C 保存,用于荧光定量 PCR。此外,为了更加直观地研究鲶爱德华氏菌对黄颡鱼的鳃和肠道组织的损伤,分别在感染后第 1、4 和第 7 天时,从感染组中随机选 3 尾黄颡鱼,经过 MS-222 麻醉后,取鳃和肠道固定于 4% 的多聚甲醛中,用于 HE 染色。

1.2 免疫组织化学染色

取健康黄颡鱼头肾、脾脏、皮肤、鳃和肠道组织迅速转移到 4% 多聚甲醛中固定 24 h。固定后的组织依次通过 60%、75%、85%、90%、95% 乙醇及无水乙醇溶液进行脱水。之后,将脱水后的组织浸入二甲苯中使其达到透明状态,并经过浸蜡和包埋等

步骤将组织完全地包埋在石蜡中。用切片机将包埋好的组织切成 $5 \mu\text{m}$ 的切片。

切片依次经过二甲苯 I、二甲苯 II、无水乙醇 I、无水乙醇 II、95% 乙醇、85% 乙醇和自来水漂洗后脱去石蜡并使切片水化。将切片依次经过抗原修复(0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(Servicebio,武汉))、血清封闭(10%的 BSA 封闭液(Servicebio,武汉))、人 CD207 多克隆抗体(Bioss,北京)孵育、HRP 标记的山羊抗兔鼠通用二抗(Protein Tech,美国)孵育以及 DAB 显色液(Sangon Biotech,上海)显色等步骤。对照组中以同浓度的兔源 IgG 多克隆抗体(Servicebio,武汉)代替人 CD207 多克隆抗体。最后,经过苏木素溶液复染以及一系列浓度的无水乙醇脱水后以中性树胶封片。显微镜观察并采集图像。

1.3 透射电镜观察

取新鲜的黄颡鱼头肾和脾脏组织,迅速投入 2.5%的戊二醛溶液(Servicebio,武汉)中 4 °C 固定 4 h。固定后的样品放于 1%四氧化锇-0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.4)中浸泡固定 2 h 后,依次经过 50%、70%、80%、90%、95%、100% 的乙醇溶液、100%丙酮 I、100%丙酮 II 脱水,每次 15 min。脱水后的组织经过渗透、Epon812 树脂包埋、切片、铀铅双染色(2%醋酸铀饱和乙醇溶液和枸橼酸铅溶液各染色 15 min)。切片在室温环境下过夜干燥,通过透射电子显微镜(HT7700)观察结果,并采集图像。

1.4 苏木精-伊红染色

将黄颡鱼鳃和肠道组织的石蜡切片经过脱蜡水化后,分别用苏木精染料和伊红染料对细胞核和细胞质染色。最后以中性树胶封片,显微镜下观察。

1.5 荧光定量 PCR

采用 Trizol 法提取组织中总 RNA,通过微量分光光度计和 1%的琼脂糖凝胶电泳确定总 RNA 的质量和完整性。将完整的样品调整质量浓度为 300 ng/ μL ,按照诺唯赞反转录试剂盒(Vazyme,南京)操作指南去除残留基因组污染,在 Random primers/Oligo(dT)23VN 混合引物和 HiScript II 反转录酶的作用下将总 RNA 反转录成 cDNA,保存于 -20 °C。

根据 NCBI 中公布的黄颡鱼 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、TLR-4 和 β -actin 基因的编码区设计荧光定量 PCR 特异性引物,并由武汉擎科生物技术有限公司合成(表 1)。PCR 体系包括:10 μL 的 2 $\times$ SYBR

qPCR Mix(Aidlab,北京),2 μ L 的模板 cDNA,7 μ L 的 ddH₂O,上下游引物各 0.5 μ L。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C,2 min;(94 $^{\circ}$ C,10 s;56 $^{\circ}$ C,15 s;72 $^{\circ}$ C,20 s) $\times$ 40。每个样品重复 3 次。以 β -actin 基因作为内参基因。反应结束后,通过熔解曲线和测序分析确定反应体系中无非特异性扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因的表达水平。

表 1 荧光定量 PCR 所使用的引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR	
引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
IL-1 β	F:TAGGCATAGAGGAGGTAA
	R:AAGGTGTTTCAGGGAGTCA
TLR-4	F:GCTATGGCTGTATTCTGCT
	R:ACCACGATAACTTTACGACT
TNF- α	F:CAGTGGGTGAGTGGAGTG
	R:TCGTGGGGAATGAGGATA
IL-10	F:CTCCTCCCCCTGAGGATTCA
	R:CGGATCACGGCGTATGAAGA
β -actin	F:TCCCTGTATGCCTCTGGTGCT
	R:AAGCTGTAGCCTCTCTCGGTC

所有试验数据均以平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$

SE)的形式表示,并通过 SPSS 21.0 对其进行统计分析,采用独立样本 t 检验分析试验组和对照组中目的基因表达差异的显著性。 $P<0.05$,被认为在统计学上存在显著性差异,以 * 表示; $P<0.01$,被认为统计学上存在极显著差异,以 ** 表示。

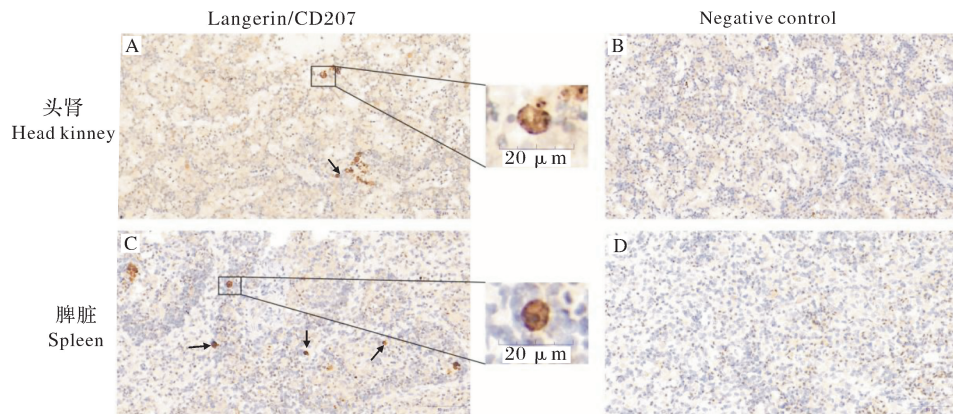
2 结果与分析

2.1 黄颡鱼头肾和脾脏中 CD207 阳性细胞的鉴定

通过免疫组化技术,在黄颡鱼头肾和脾脏中均发现 CD207 阳性细胞的存在(图 1),但是鳃、皮肤和肠道中并未发现 CD207 阳性细胞。此外,细胞膜上 CD207 蛋白的表达量高于细胞质中。

2.2 黄颡鱼朗格汉斯细胞的超微结构

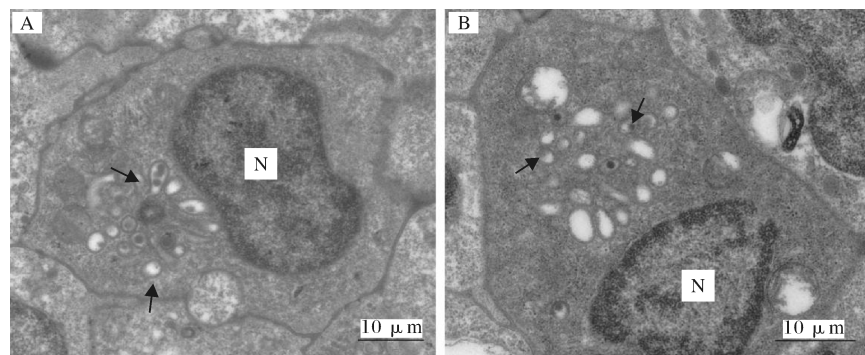
在透射电镜下,黄颡鱼头肾和脾脏中均发现朗格汉斯细胞。黄颡鱼朗格汉斯细胞与其他脊椎动物朗格汉斯细胞类似,细胞质中的伯贝克颗粒围绕着中心粒呈放射状排列,并且这些颗粒的形态多呈现为圆形(图 2A,B)。



图中箭头所示为 CD207 阳性细胞。The CD207 positive cells are showed with arrows.

图 1 黄颡鱼头肾和脾脏中的 Langerin/CD207 阳性细胞

Fig.1 Langerin/CD207 positive cells in the head kidney,spleen of yellow catfish



N 代表细胞核,箭头所示为伯贝克颗粒。The nucleus and the Birbeck granule are denoted with "N" and arrows, respectively.

图 2 黄颡鱼朗格汉斯细胞的结构特点

Fig.2 The structural features of Langerhans cells of yellow catfish

圆形的伯贝克颗粒内存在由高密度物质组成的圆形致密颗粒,而有的伯贝克颗粒内没有致密颗粒(图 3A);有的伯贝克颗粒内仅有一个致密颗粒,分布于中心或偏向一侧(图 3B、C),此外,还有的伯贝克颗粒内含有 2 个致密颗粒,均分布于中心或各居一侧(图 3D、E)。而且,这些致密颗粒在不规则的杆状伯贝克颗粒中的数量较多,高达 5 个(图 3J)。除此之外,在圆形的伯贝克颗粒内还观察到有管状结构(图 3F、G)。同时,多泡小体类似的

结构也存在于黄颡鱼朗格汉斯细胞的细胞质中(图 3H、I)。

2.3 鲶爱德华氏菌感染对黄颡鱼鳃和肠道的病理损伤

根据 HE 染色结果,鲶爱德华氏菌感染后,黄颡鱼鳃和肠道出现不同程度的病理损伤,并且随着感染时间的增加,损伤程度不断加剧(图 4)。例如,鳃丝上皮细胞坏死、脱落、鳃丝变短等;肠道中,肠上皮细胞之间的杯状细胞数量增多。

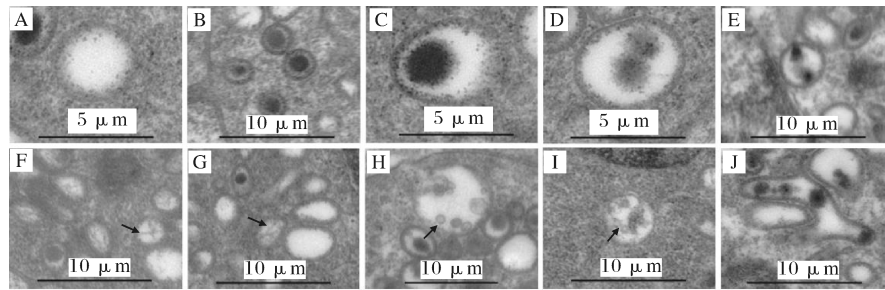
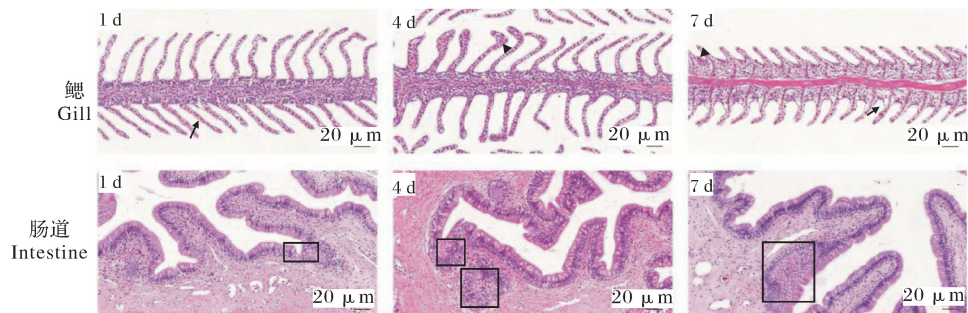


图 3 黄颡鱼伯贝克颗粒的结构特点

Fig.3 The structural features of Birbeck granule of yellow catfish



箭头所示为鳃上皮细胞坏死、脱落,三角所示为鳃丝组织增生;框内的部分表示为肠道中的杯状细胞。The necrosis and exfoliation of epithelial cells are denoted with arrows, and the hyperplasia of gill filament is showed by triangle. The goblet cells in the intestine is represented by box.

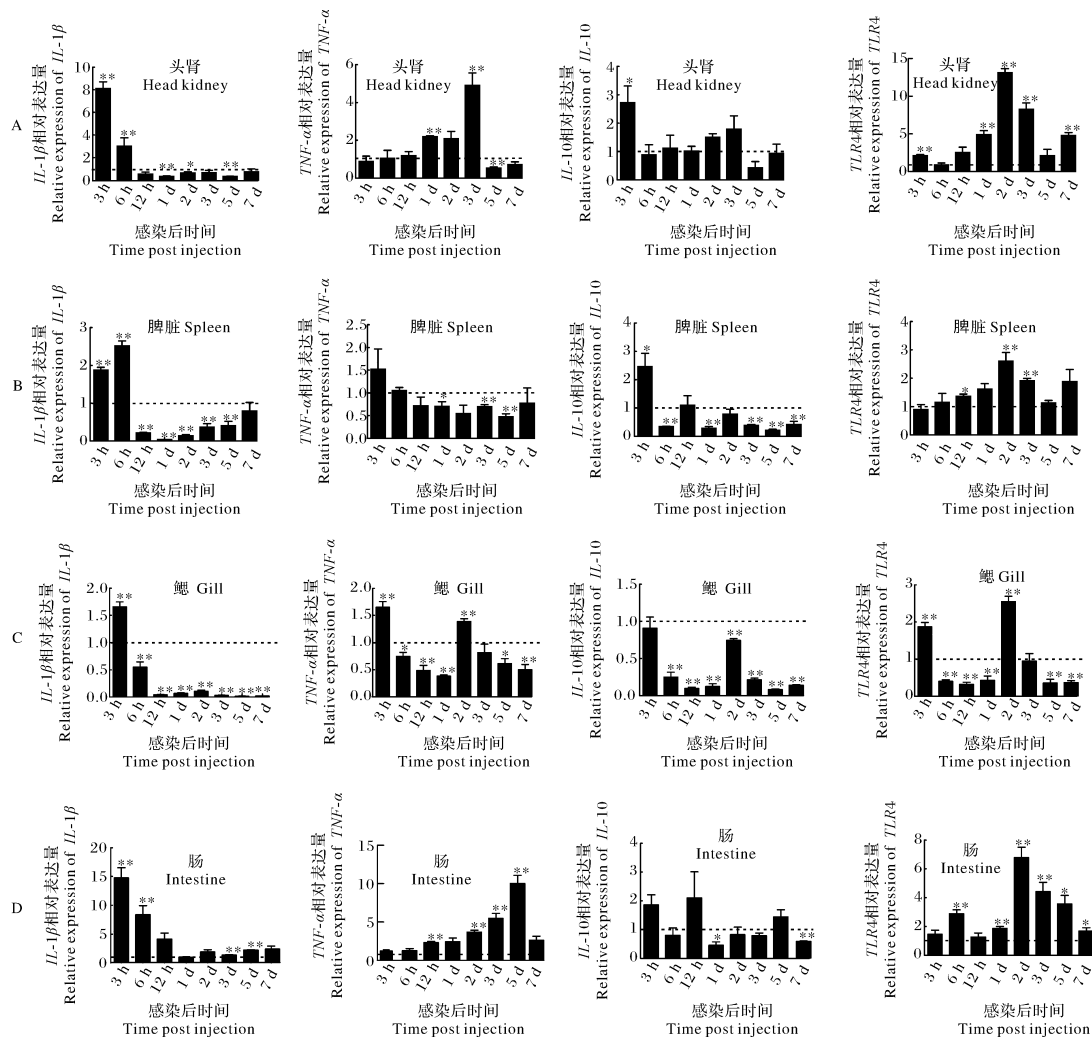
图 4 鲶爱德华氏菌感染后黄颡鱼鳃和肠道的病理损伤($n=3$)

Fig.4 Histopathological changes of gill and intestine of yellow catfish after *E. ictaluri* infection

2.4 鲶爱德华氏菌感染对朗格汉斯细胞功能相关基因表达的影响

q-PCR 的结果显示,鲶爱德华氏菌能够诱导黄颡鱼免疫器官中朗格汉斯细胞功能相关基因发生不同程度的表达上调(图 5)。在头肾、鳃和肠道中, $IL-1\beta$ 在感染后 3 h 时表达量最高,之后下降,在 12 h 至 7 d 内表达量上调的变化不明显;而在脾脏中,感染后 6 h 时的表达量最高,12 h 时迅速下调并显著低于对照组,在 1~7 d 内缓慢上调。 $TLR-4$ 在头肾、脾脏、鳃和肠道中均显著上调,并且在 2 d 时

表达量最高。头肾和脾脏中, $IL-10$ 仅在感染后 3 h 时的表达量显著高于对照组,鳃中大部分时间点的表达量显著低于对照组,肠道中的表达量变化不明显。 $TNF-\alpha$ 基因在头肾中的表达量在 3 h 到 3 d 内逐渐上调并且第 3 天时达到峰值,在肠道中的表达量从 3 h 到 5 d 内逐渐上调,并且在第 5 天时达到最大值。在鳃中, $TNF-\alpha$ 基因仅在 3 h 和 2 d 时的表达量显著高于对照组,而脾脏中 $TNF-\alpha$ 基因在 1 d、3 d、5 d 时的表达量显著低于对照组,其他时间点与对照组没有显著性差异。



差异显著($P < 0.05$)以“*”表示,差异极显著($P < 0.01$)以“**”表示。图中虚线代表对照组。The statistically significant difference and extremely significant difference are denoted with “*” and “**”, respectively. The dotted line in these figures represents the control group.”

图5 鲶爱德华氏菌感染后,黄颡鱼头肾(A)、脾脏(B)、鳃(C)和肠道(D)中 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-10$ 和 $TLR-4$ 的表达

Fig.5 The expression patterns of $IL-1\beta$ 、 $TLR-4$ 、 $IL-10$ and $TNF-\alpha$ in the head kidney (A), spleen (B), gill (C) and intestine (D) of yellow catfish after *E. ictaluri* infection

3 讨论

树突状细胞作为连接固有免疫系统和适应性免疫系统的桥梁,在免疫反应的发生以及维持免疫耐受过程中发挥重要作用。目前已经在虹鳉^[16]、斑马鱼^[17]和草鱼^[18]等众多硬骨鱼类中分离出树突状细胞,并且发现硬骨鱼类树突状细胞与哺乳动物类似,都具有吞噬、运动以及刺激幼稚T淋巴细胞增殖的能力。作为树突状细胞亚型之一,朗格汉斯细胞在免疫反应过程中同样发挥重要作用。本研究采用免疫组化和透射电镜技术,首次从形态学上证实黄颡鱼朗格汉斯细胞的存在,并采用荧光定量PCR,从mRNA水平上分析了鲶爱德华氏菌感染后, $IL-1\beta$ 、

$TNF-\alpha$ 、 $IL-10$ 和 $TLR-4$ 等朗格汉斯细胞功能相关基因在黄颡鱼免疫相关组织中的表达情况。

免疫组化显示,与其他硬骨鱼类类似,人CD207多克隆抗体能够识别黄颡鱼头肾和脾脏中表达的CD207蛋白,并且脾脏中CD207阳性细胞的数量高于头肾,与斑点叉尾鲷中的结果相反^[13]。此结果可能是因为人CD207分子与黄颡鱼CD207分子核酸序列的保守度不高,人CD207多克隆抗体不能完全特异性结合黄颡鱼CD207蛋白^[19]。由于缺乏可用的黄颡鱼CD207序列信息以及相应抗体,具体原因有待于进一步研究。除此之外,在这些阳性细胞中,黄颡鱼CD207蛋白在细胞膜上的表达水平高于细胞质中的表达水平。此结果符合CD207

蛋白的特性并且与斑点叉尾鲷中观察到的结果类似^[9,13]。透射电镜可直观地观察到黄颡鱼朗格汉斯细胞的形态结构,黄颡鱼朗格汉斯细胞与哺乳动物或者其他硬骨鱼类朗格汉斯细胞相似,也是多个伯贝克颗粒围绕着中心粒呈放射状排列^[20]。此外,相比于鲑科鱼类等其他脊椎动物,黄颡鱼伯贝克颗粒的形态与斑点叉尾鲷伯贝克颗粒的形态更为接近,而与其他脊椎动物却有明显差异,这可能与黄颡鱼和斑点叉尾鲷同属于鲶形目有关。

鲈爱德华氏菌是一种胞内寄生菌,主要感染黄颡鱼等鲶形目鱼类。鲈爱德华氏菌感染后,黄颡鱼的鳃和肠道均发生不同程度的病理损伤。为了更详细了解朗格汉斯细胞在细菌感染过程中的调控机制,通过荧光定量 PCR 检测了细菌感染后黄颡鱼免疫器官内朗格汉斯细胞功能相关基因的表达。结果显示,鲈爱德华氏菌感染后,黄颡鱼头肾、脾脏、鳃和肠道中 *IL-1 β* 基因的表达量在感染前期显著上调,此结果说明大量的朗格汉斯细胞可能通过高表达的 *IL-1 β* 被招募到病原菌的入侵位点,吞噬侵入的病原菌^[5]。*TNF- α* 基因仅在头肾、鳃和肠道中显著上调,并且与 *IL-1 β* 基因的表达模式不同,表明这 2 个基因可能是通过不同的信号通路招募朗格汉斯细胞迁移的^[4]。与此不同,*IL-10* 作为一种抑炎因子,其表达量仅在脾脏和头肾中显著上调,说明 *IL-10* 主要是由头肾和脾脏中的免疫细胞合成并释放出来,调控机体免疫反应^[21]。Toll 样受体作为模式识别受体的一种,主要识别革兰氏阴性菌细胞壁中的脂多糖^[22]。我们发现,鲈爱德华氏菌感染后,*TLR-4* 基因在黄颡鱼头肾、脾脏、鳃和肠道中均显著上调,说明鲈爱德华氏菌感染鱼体之后,可能通过合成脂多糖引起机体炎症^[23]。上述结果表明,朗格汉斯细胞可能参与了鱼体抗鲈爱德华氏菌感染的免疫反应。

本试验通过免疫组化技术证实了黄颡鱼头肾、脾脏等免疫器官中具有能与 CD207 多克隆抗体结合的朗格汉斯细胞分子标记 CD207 蛋白,用透射电镜观察了黄颡鱼朗格汉斯细胞的形态结构。通过荧光定量 PCR,从 mRNA 水平上研究了细菌感染后黄颡鱼免疫器官内朗格汉斯细胞功能相关基因的表达。对黄颡鱼朗格汉斯细胞的研究,将有助于我们更好地了解朗格汉斯细胞在免疫系统中的作用,可为细菌性疾病的防控提供理论基础。

参考文献 References

[1] HOVAV A H. Mucosal and skin Langerhans cells nurture calls

[M]. Trends in immunology, 2018, 39(10): 788-800.

- [2] CHORRO L, SARRDE A, LI M, et al. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network[J]. The journal of experimental medicine, 2009, 206(13): 3089-3100.
- [3] DECKERS J, HAMMAD H, HOSTE E. Langerhans cells: sensing the environment in health and disease[J]. Frontiers in immunology, 2018, 9(9): 1-14.
- [4] 李航, 王晖. 朗格汉斯细胞在皮肤免疫学中的研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2014, 28(3): 304-306. LI H, WANG H. Research advances about Langerhans cells in skin immune system [J]. The Chinese journal of dermatovenereology, 2014, 28(3): 304-306 (in Chinese with English abstract).
- [5] CUMBERBATCH M, BHUSHAN M, DEARMAN R J, et al. *IL-1 β* induced Langerhans' cell migration and *TNF- α* production in human skin: regulation by lactoferrin[J]. Clinical and experimental immunology, 2003, 132: 352-359.
- [6] MIZUMOTO N, TAKASHIMA A. CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers[J]. The journal of clinical investigation, 2004, 113(5): 658-660.
- [7] HUNGER R E, SIELING P A, OCHOA M T, et al. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present non-peptide antigens to T cells[J]. The journal of clinical investigation, 2004, 113(5): 701-708.
- [8] 葛安兴, 褚旭芳, 文日, 等. 发热样温度对朗格汉斯细胞表面抗原呈递相关分子及 Toll-like 受体表达的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(6): 491-499. GE A X, CHU X F, WEN R, et al. A study of the effects of molecules associated with antigen presentation and Toll-like receptors on Langerhans cells at a fever-like temperature [J]. Journal of pathogen biology, 2015, 10(6): 491-499 (in Chinese with English abstract).
- [9] KORDON A O, ABDELHAMED H, AHMED H, et al. Assessment of the live attenuated and wild-type *Edwardsiella ictaluri*-induced immune gene expression and Langerhans-like cell profiles in the immune-related organs of catfish[J]. Frontiers in immunology, 2019, 10(10): 1-12.
- [10] LOVY J, WRIGHT G M, SPEARE D J. Morphological presentation of a dendritic-like cell within the gills of chinook salmon infected with *Loma salmonae*[J]. Developmental and comparative immunology, 2006, 30(3): 259-263.
- [11] TAKAHARA K, OMATSU Y, YASHIMA Y, et al. Identification and expression of mouse Langerin (CD207) in dendritic cells[J]. International immunology, 2002, 14(5): 433-444.
- [12] LOVY J, SAVIDANT G P, SPEARRE D J, et al. Langerin/CD207 positive dendritic-like cells in the haemopoietic tissues of salmonids[J]. Fish and shellfish immunology, 2009, 27(2): 365-368.
- [13] KORDON A O, SCOTT M A, IBRAHIM I, et al. Identification of Langerhans-like cells in the immunocompetent tissues of channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. Fish and shellfish immunology, 2016, 58(58): 253-258.

- [14] LOVY J, SAVIDANT G P, WRIGHT G M. Ontogeny and disease responses of Langerhans-like cells in lymphoid tissues of salmonid fish[J]. Cell and tissue research, 2011, 346(1): 111-118.
- [15] LOVY J, WRIGHT G M, SPEARE D J, et al. Comparative cellular morphology suggesting the existence of resident dendritic cells within immune organs of salmonids[J]. The anatomical record, 2008, 291(4): 456-462.
- [16] BASSITY E, CLARK T G. Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. PLoS One, 2012, 7(3): 1-14.
- [17] LUGO-VILLARINO G, BALLA K M, STACHURE D L, et al. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(36): 15850-15855.
- [18] ZHOU C C, WANG H, LI X G, et al. Regulatory effect of *Bacillus subtilis* on cytokines of dendritic cells in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(2): 1-17.
- [19] 林树根, 王寿昆, 李志刚, 等. 3种硬骨鱼类消化道肥大细胞的组织化学与免疫组化[J]. 水产学报, 2010, 34(1): 126-131.
- [20] LOVY J, WRIGHT G M, SPEARE D J, et al. Comparative ultrastructure of Langerhans-like cells in spleens of ray-finned fishes (*Actinopterygii*) [J]. Journal of morphology, 2010, 271(10): 1229-1239.
- [21] MOORE K W, MALEFYT R D W, COFFMAN R L, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. Annual review of immunology, 2001, 19: 683-765.
- [22] ROACH J C, GLUSMAN G, ROWEN L. The evolution of vertebrate Toll-like receptors[J]. The proceedings of the national academy of sciences, 2005, 102(27): 9577-9582.
- [23] 曹承华, 贺雅静, 高荧苒, 等. LPS介导的炎症反应过程及作用机制[J]. 河南大学学报(医学版), 2017, 36(1): 70-76.
- CAO C H, HE Y J, GAO Y R, et al. LPS mediated inflammatory response and mechanism[J]. Journal of Henan University (medical science edition), 2017, 36(1): 70-76 (in Chinese with English abstract).

Identification and functional gene expression analysis of Langerhans cells in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

WANG Hui^{1,2}, LI Sisi^{1,2}, WU Zhixin^{1,2,3}, XU Lili¹, TIAN Ding², CHEN Xiaoxuan^{1,2,3}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Engineering Technology Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention, Wuhan 430070, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Aquaculture Education (Huazhong Agricultural University), Wuhan 430070, China

Abstract To study the structural characteristics of Langerhans cells (LCs) and the effect of bacterial infection on the expression of functional genes of LCs in yellow catfish, the LCs in immune tissues of yellow catfish were identified by immunohistochemical (IHC) technique, the ultrastructure of LCs was further observed by transmission electron microscope (TEM) technique, and the expression levels of *IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-10* and *TLR-4* genes related to the function of LCs in the immunity related tissues of yellow catfish were detected by real-time quantitative PCR in this study. The results showed that the CD207 protein, a specific molecular marker for LCs, were detected in the head kidney and spleen, and the structure of the yellow catfish LCs was similar to that of other vertebrates, with granules arranged radially around the centriole in cytoplasm. The expression levels of the *IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-10* and *TLR-4* genes in the immunity related tissues of yellow catfish were significantly up-regulated after *Edwardsiella ictaluri* infection. The above results indicated that the LCs were distributed in yellow catfish, and they may participate in the body's immune response against *E. ictaluri* infection.

Keywords yellow catfish; Langerhans cell; *Edwardsiella ictaluri*; qRT-PCR; gene expression; ultrastructure; immune reaction; immunohistochemical technique

(责任编辑:边书京)