

郑云鹏, 翟文娅, 王振生, 等. 斑马鱼 *nr4a1* 在嗜水气单胞菌感染引起的炎症反应中的作用[J]. 华中农业大学学报, 2025, 44(6): 283-292.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.06.028

斑马鱼 *nr4a1* 在嗜水气单胞菌感染引起的炎症反应中的作用

郑云鹏, 翟文娅, 王振生, 王焕岭, 刘红

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 为深入探究鱼类抵抗细菌性炎症的调控机制, 通过生物信息学方法分析斑马鱼 (*Danio rerio*) *nr4a1* 基因的结构特征, 并利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建 *nr4a1*^{-/-} 斑马鱼模型。进一步结合实时荧光定量 PCR (qPCR)、组织细菌负载检测及病理学分析等方法, 系统评估在嗜水气单胞菌感染条件下, *nr4a1*^{-/-} 斑马鱼及 *nr4a1* 过表达斑马鱼 ZF4 细胞系中该基因的表达动态、炎症因子水平、细菌清除能力及组织病理变化, 以阐明 *nr4a1* 基因在嗜水气单胞菌感染引起的斑马鱼肝脏炎症反应中的作用及其机制。结果显示, 斑马鱼 *nr4a1* 基因序列高度保守, 其开放阅读框编码 1 条由 574 个氨基酸组成的多肽, 预测蛋白质等电点为 5.79, 相对分子质量为 63.04, 在鱼体多个组织中广泛表达。*nr4a1*^{-/-} 斑马鱼在第 2 个外显子处发生 7 bp 缺失, 导致翻译提前终止, 使编码蛋白从 574 个氨基酸截短至 297 个氨基酸。嗜水气单胞菌感染后, 斑马鱼肝组织中 *nr4a1* 基因的表达呈现先下降后回升的趋势。与野生型相比, *nr4a1*^{-/-} 斑马鱼存活率降低, 肝脏组织载菌量显著上升, 且肝脏组织病理损伤更为严重。qPCR 分析表明, *nr4a1*^{-/-} 斑马鱼中 *il-1 β* 、*tnf- α* 、*nf- κ B* 以及 *il-22* 等炎症因子的表达水平均显著高于野生型。而在斑马鱼 ZF4 细胞系中过表达 *nr4a1*, 则可显著抑制嗜水气单胞菌感染所诱导的炎症因子表达升高。以上结果表明 *nr4a1* 可以作为负性调节因子抑制促炎因子的表达, 从而在嗜水气单胞菌感染引起的斑马鱼免疫炎症反应中发挥重要的保护作用。

关键词 斑马鱼; 嗜水气单胞菌; *nr4a1*; 炎症反应; 基因敲除

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)06-0283-10

核受体 Nr4a1 是 NR4A (nuclear receptor subfamily 4, group A) 家族的关键成员, 亦称为 Nur77、TR3, 在多种细胞过程中起核心作用, 广泛表达于各组织、器官, 参与细胞炎症反应、增殖、分化、凋亡、自噬、代谢等过程^[1]。在神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 诱导的反应中, *nr4a1* 作为一种早期即刻反应基因在鼠源的嗜铬细胞瘤细胞系 (PC12) 中被发现^[2], 是孤儿核受体中未发现其生理性配体的一类^[3]。正常生理条件下, *nr4a1* 的表达水平受到严密的调控, 但在一些生理信号的刺激下会被瞬时诱导和激活, 这些信号包括前列腺素、生长因子、脂肪酸、钙、炎症细胞因子和细胞应激等^[4-5]。已有研究表明, 在一些炎症性疾病中 Nr4a1 的激活可以显著抑制炎症反应, 延缓疾病的进程^[6]。

NR4A 孤儿受体家族可以调控炎症通路尤其是 NF- κ B 信号通路, 在血管内皮激活、巨噬细胞功能等方面都起着至关重要的作用, 其中, Nr4a1 对于炎症的调控作用被研究得最为广泛^[7]。在小鼠巨噬细胞中过表达 *nr4a1* 可以导致炎症、凋亡和细胞周期循环等相关基因的转录活化^[8], 亦有研究发现在小鼠细胞中 *nr4a1* 的过表达减轻了 siIkB- α 诱导的炎症^[9]。而采用三硝基苯磺酸或硫酸葡聚糖诱导的小鼠肠炎模型研究的结果显示, *nr4a1*^{-/-} 小鼠更容易出现全身多个组织器官免疫炎症损伤^[10]。亦有其他研究表明 Nr4a1 在炎症反应中有显著抑制炎症的作用, 在炎症性肠病、脓毒症等疾病中作为负性调节因子参与疾病的发生发展^[11]。然而, Nr4a1 在炎症反应中并非只扮演抑制炎症的角色, 其通过转录调控作用活化炎

收稿日期: 2025-01-07

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD2400604); 现代农业产业技术体系国家大宗淡水鱼产业技术体系建设专项 (CARS-45-08)

郑云鹏, E-mail: 980357232@qq.com

通信作者: 刘红, E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

性信号通路起到促进炎症的作用也有过报道^[12]。

随着我国水产养殖业的快速发展,挑战也随之出现,包括经济性性状退化、抗病力减弱、生态环境恶化、水质不达标、药物滥用以及饲养管理不当等问题,导致养殖鱼类病害日益严重,进而使得养殖业经济损失不断攀升^[13],嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染在其中造成重大的经济损失,影响水产品健康和存活率,增加养殖成本^[14]。肝脏是参与鱼类免疫反应和解毒过程的重要器官,其巨噬细胞可将越过肠屏障的病原菌吞噬,在鱼类抵御嗜水气单胞菌感染过程中具有不可或缺的作用^[15]。为此,本研究选用模式鱼类斑马鱼(*Danio rerio*)作为研究对象,探究 *nr4a1* 在嗜水气单胞菌感染引起的斑马鱼肝脏炎症反应中的作用及其背后机制,旨在为深入了解鱼类抵抗炎症的调节机制和抗病育种提供新的靶点和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用野生型(WT)斑马鱼均为AB品系野生型,饲养于华中农业大学水产学院斑马鱼养殖系统,养殖条件为:28℃恒温循环水系统,pH 7.5±0.5,光暗周期比为14 h光照/10 h黑暗,每日09:00和16:00分别饲喂丰年虫。斑马鱼胚胎成纤维(ZF4)细胞系购于American Type Culture Collection,培养条件为:28℃、5% CO₂培养箱培养。

1.2 斑马鱼 *nr4a1* 生物信息学分析

本研究所用到的基因和氨基酸序列文件下载于NCBI数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov),斑马鱼Nr4a1的蛋白质分子质量(MWs)和理论等电点(pI)利用ExPASy(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测。使用DNAMAN软件对斑马鱼、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的Nr4a1进行多序列比对并计算序列一致性。采用MEGA 5软件,应用邻接法(neighbour-joining, NJ)构建Nr4a1的系统进化树。

1.3 斑马鱼 *nr4a1* 敲除品系构建

通过CRISPR-Cas9基因编辑技术构建斑马鱼 *nr4a1* 敲除体。在NCBI网站获得斑马鱼 *nr4a1* 基因序列,选取其CDS区前2/3区域的序列在张锋团队CRISPR设计网站(<https://www.zlab.bio/guide-design-resources>)进行靶点设计。选取评分较高的靶点

序列在NCBI网站上Blast,进行特异性分析,避免脱靶效应,最终确立的靶点序列为:GAGGGACGCT-GCGCCGTGTG。采用MEGAscript™ T7(Thermo Fisher)转录试剂盒体外转录gRNA并纯化,混合Cas9蛋白后,注射至斑马鱼受精卵I细胞期的动物极。检测靶点有效后将F₀代斑马鱼培养至性成熟,与WT斑马鱼杂交,获得F₁代杂合子斑马鱼。筛选出相同突变类型的F₁代雌雄斑马鱼进行自交得到F₂代斑马鱼,从F₂中筛选出纯合 *nr4a1*^{-/-} 斑马鱼。

1.4 嗜水气单胞菌感染试验和样品采集

随机取18尾健康斑马鱼的肌肉、心脏、脑、腮、眼、性腺、脾脏、肝脏、肠、肾脏组织,每6尾为1个混样,共3个重复,探究 *nr4a1* 在健康斑马鱼各组织中的表达模式。嗜水气单胞菌感染试验,以3月龄斑马鱼成鱼为试验对象,设置对照组与感染组,每组设置3个生物学重复(每个生物学重复设置6尾鱼),探究嗜水气单胞菌感染后肝脏中 *nr4a1* 和炎症因子相对表达量的变化趋势。研究所用嗜水气单胞菌D4为华中农业大学水产学院罗毅老师课题组馈赠,感染试验中,感染组和对照组(CK)分别注射1 μL浓度为2.5×10⁶ CFU/mL(注射浓度和剂量根据预试验确定)的嗜水气单胞菌或等量磷酸盐缓冲溶液(PBS)。在注射后的0、4、8、12、24、48 h分别取感染组和对照组的肝脏组织。在细胞转染24 h后使用2.5×10² CFU/mL嗜水气单胞菌感染细胞,收集感染4 h细胞样本,探究炎症因子的表达变化。样品采集后,快速置于液氮中冷冻,存于-80℃冰箱中备用。

1.5 总RNA的提取及cDNA合成

将保存在-80℃下的各组织样品取出,使用Trizol法进行样品总RNA的提取。将提取的斑马鱼样品总RNA严格按照TaKaRa公司反转录试剂盒的说明进行反转录合成cDNA。

1.6 荧光定量PCR(qPCR)及数据分析

本研究以cDNA为模板,β-actin为内参基因,参照文献[16]进行qPCR。相对表达量使用2^{-ΔΔCt}法进行计算,数值均采用平均值±标准误(mean±SE)表示,使用Graph Pad Prism 8绘制图表,使用单因素方差分析方法(ANOVA)和Duncan's进行差异表达分析,P<0.05时为差异显著(*),P<0.01时为差异极显著(**),不同字母标记表示组间具有显著差异(P<0.05)。本研究所用引物通过Primer Premier 5.0软件设计并由武汉擎科公司合成,引物具体信息见表1。

表 1 本研究用到的引物序列
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
IL-22-F	TCGACATCGAGGAACAACGG	qPCR
IL-22-R	CACGAGCACAGCAAAGCAAT	qPCR
p65-F	ACCTCCTTTTCTCTCCGCC	qPCR
p65-R	CATCCCTACCGGTGGAAC	qPCR
IL1 β -F	ATGGCGAACGTCATCCAAGA	qPCR
IL1 β -R	CTTTCAAGTCGCTGCTTCCG	qPCR
TNF α -F	TTGCCTTTACCGCTGGTGAT	qPCR
TNF α -R	TTGTTGATTGCCCTGGGTCT	qPCR
NF κ B-F	CACCTGCGTTCCATTCTT	qPCR
NF κ B-R	GCTCCTTTGCGTCTACAT	qPCR
bactin-F	CGAGCAGGAGATGGGAACC	qPCR
bactin-R	CAACGGAAACGCTCATTGC	qPCR
nr4a1-F	AGAGCCCAAACGGATCGAAG	qPCR
nr4a1-R	GGTGGGACCAAGTCTTCCAG	qPCR
shai-F	ACTCCGCAACATGGTTCT	PCR
shai-R	AAGCCTTTGCATCCTTCA	PCR
pCMV-nr4a1-F	TCAAGCTTCTGCAGGAATTCAT-GACCTGTGTTCAAAGTCAACATG	PCR
pCMV-nr4a1-R	CCCAGTAGTTCTAGACTCGAGT-CAGAATGGCAACGTGTCCA	PCR

1.7 组织切片和HE染色

取斑马鱼肝脏组织于4%多聚甲醛通用型组织固定液中固定24 h以上,将修切好的肝脏组织和对应的标签放于包埋框内包好后依次加入梯度乙醇进行脱水。脱水完成后浸蜡包埋,于-20℃冻台冷却,蜡凝固后将蜡块从包埋框中取出并修整,置于石蜡切片机切片,厚4 μ m。摊片机40℃展平,60℃恒温烘干。然后用苏木精-伊红染色,脱水封片后于正置显微镜下观察,进行图像采集分析。

1.8 斑马鱼 *nr4a1* 过表达载体的构建和细胞转染

利用同源重组的方法构建pCMV-N-*nr4a1*过表达质粒,使用引物pCMV-nr4a1-F/pCMV-nr4a1-R克隆*nr4a1*的CDS片段,通过DNA回收试剂盒纯化回收PCR产物。将酶切回收的PCR产物与pCMV-N-Flag载体通过同源重组连接,转化后筛选阳性克隆并测序。将筛选出的菌株扩大培养,使用TianGen质粒提取试剂盒进行质粒的抽提。将处于快速增长期的ZF4细胞传代至细胞培养板中(12孔板),传代12~24 h后,细胞贴壁率达到80%以上时进行细胞转染,具体转染操作步骤参照文献[16]。转染pCMV-N-*nr4a1*质粒和空载pCMV-N-Flag检测过表达效率。

1.9 组织载菌量的计算

通过稀释涂布板法检测嗜水气单胞菌感染后斑马鱼肝脏组织细菌负荷^[17],本研究于嗜水气单胞菌感染8 h后取*nr4a1*^{-/-}和野生型斑马鱼肝脏组织,按照每克组织加入1 mL PBS缓冲液的比例匀浆稀释后,取10 μ L均匀涂布在嗜水气单胞菌培养基培养,16 h后对生长的黄色菌落进行计数统计。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼 *nr4a1* 基因的生物信息学分析

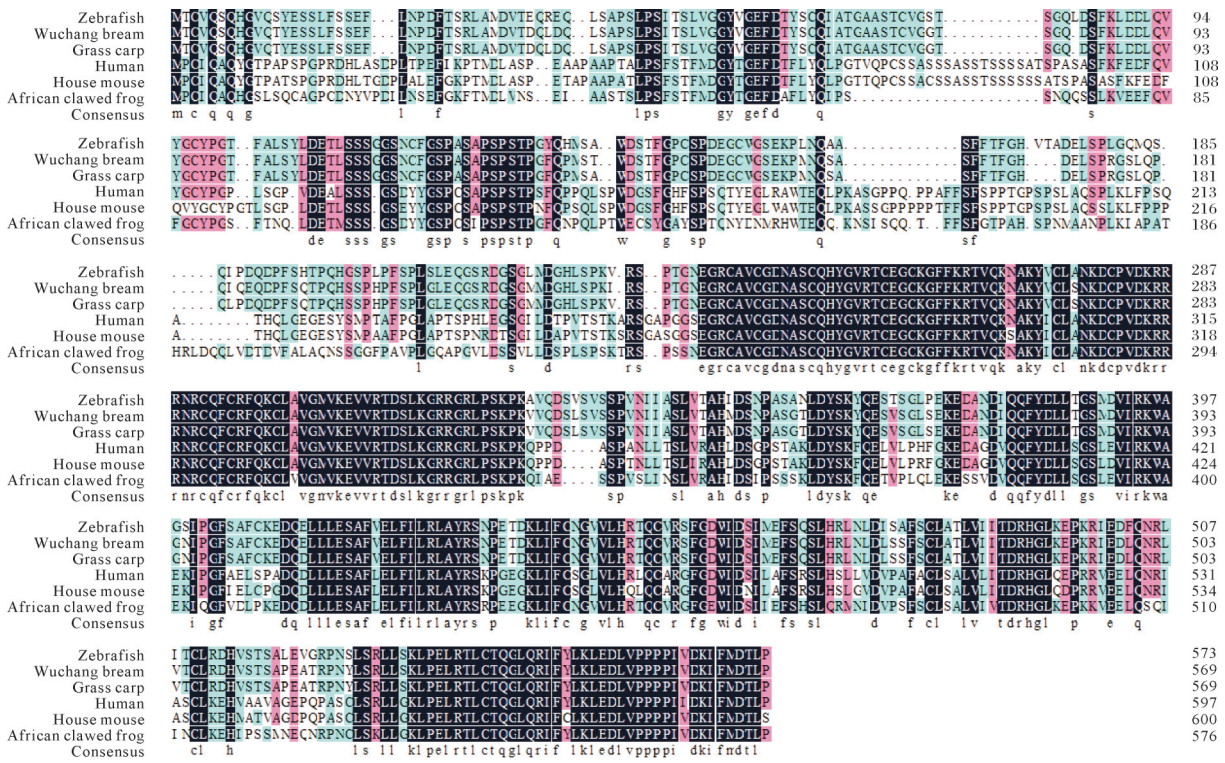
通过NCBI下载斑马鱼*nr4a1*基因的碱基和氨基酸序列,对斑马鱼*nr4a1*基因序列特征进行生物信息学分析。结果显示,斑马鱼*nr4a1*基因开放阅读框共1 725个碱基,编码1条574个氨基酸的多肽,编码的蛋白质等电点为5.79,蛋白分子质量为63.04 ku。使用DNAMAN对草鱼、团头鲂、人、小鼠以及非洲爪蟾的Nr4a1进行氨基酸多序列比对(图1)。结果表明,Nr4a1在6个物种中序列一致性达到74.26%,序列高度保守,与斑马鱼序列一致性最高的为草鱼86.39%,其次为团头鲂86.06%,最低的为小鼠50.89%。通过MEGA 5构建Nr4a1的系统进化树,如图2所示,鱼类、两栖动物、哺乳动物各成1个小支,哺乳动物和两栖动物汇成1个大支并最终和鱼类汇聚在一起。

2.2 *nr4a1* 基因在健康斑马鱼组织和嗜水气单胞菌感染后肝组织中的相对表达量

通过qPCR检测*nr4a1*基因在斑马鱼成鱼中不同组织中的表达,结果显示*nr4a1*在斑马鱼中具有一定的组织表达特异性。如图3所示,在健康成年斑马鱼的多种组织中,*nr4a1*基因表达水平以肌肉组织为最高,心脏和大脑次之,而肠道、体肾、脾脏和肝脏中的表达量相对较低。在嗜水气单胞菌感染后,斑马鱼肝组织中*nr4a1*基因的相对表达量呈现下降趋势,在12 h时降到最低值,之后出现回升(图4)。

2.3 斑马鱼 *nr4a1* 敲除品系构建

胚胎注射24 h后,取部分*nr4a1*-KO-F0与WT斑马鱼受精卵用于测序分析,测序结果如图5A所示,*nr4a1*-KO-F0在靶点位置出现明显多峰,突变率为17%,表明本研究选择的靶点有效。相对于野生型斑马鱼,*nr4a1*突变纯合子在第2个外显子处出现了7 bp的缺失(图5B),该缺失导致翻译的提前终止,原本编码574个氨基酸的蛋白质多肽链被截短至297



图中黑色表示该位置氨基酸序列一致度为 100%，粉色表示一致度大于 75%，蓝色表示一致度大于 50%。In the figure, black indicates that the amino acid sequence identity at that position is 100%, pink indicates an identity greater than 75%, and blue indicates an identity greater than 50%.

图 1 斑马鱼等 6 个物种 Nr4a1 的氨基酸多序列比对

Fig.1 Multiple alignments of Nr4a1 amino acid sequence in six species including zebrafish

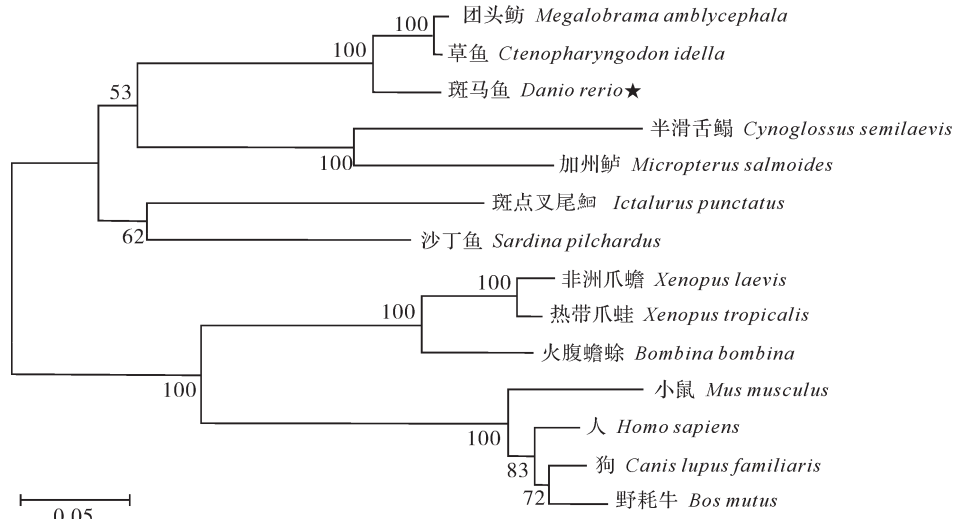


图 2 Nr4a1 系统进化树

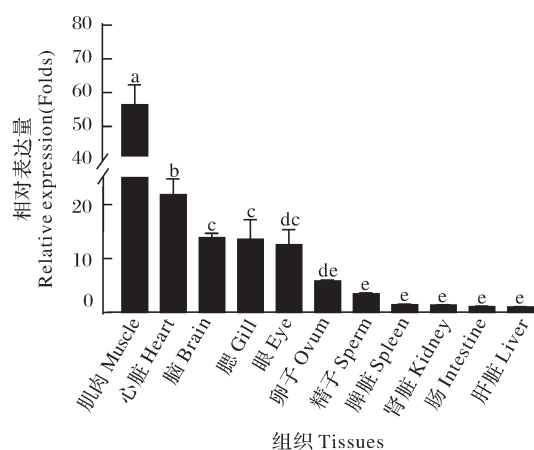
Fig.2 Phylogenetic tree of Nr4a1

个氨基酸,使 *nr4a1* 编码的蛋白重要结构域发生缺失 (图 5C)。

2.4 嗜水气单胞菌感染后 *nr4a1*^{-/-} 斑马鱼的免疫炎症反应

通过 HE 切片检测嗜水气单胞菌感染后

nr4a1^{-/-} 和 WT 斑马鱼肝脏损伤情况。如图 6A 所示,相较于 WT, *nr4a1*^{-/-} 斑马鱼出现更加严重的肝脏充血和组织病理损伤。生存曲线结果显示, *nr4a1*^{-/-} 斑马鱼在嗜水气单胞菌感染后存活率相对较低(图 6B)。同时细菌负荷检测结果显示, *nr4a1*^{-/-}



不同小写字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。下同。Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same as below.

图3 *nr4a1*在斑马鱼不同组织中的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of *nr4a1* in different tissues of zebrafish

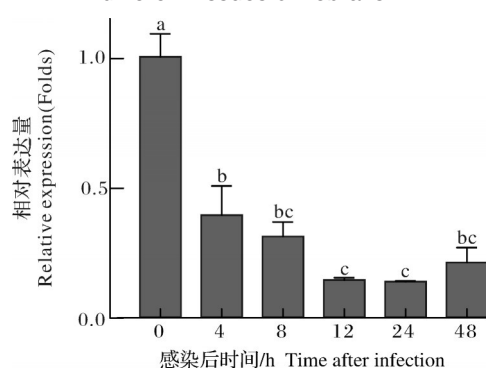


图4 嗜水气单胞菌感染后各时间点 *nr4a1*在斑马鱼肝脏中的相对表达量

Fig.4 Relative expression of *nr4a1* in zebrafish liver at various time points after *A. hydrophila* infection

斑马鱼肝脏组织载菌量显著高于野生型(图6C)。

为进一步明确 *nr4a1* 在嗜水气单胞菌感染引起的斑马鱼免疫炎症反应中的作用,通过qPCR检测了在嗜水气单胞菌感染前后 *nr4a1*^{-/-}斑马鱼和WT斑马鱼中炎症因子白细胞介素 1 β (*il-1 β*)、肿瘤坏死因子 α (*tnf- α*)、核因子 κ B(*nf- κ B*)以及白细胞介素 22(*il-22*)的相对表达量(图7)。结果显示,在嗜水气单胞菌感染前,*nr4a1*^{-/-}斑马鱼中 *il-1 β* 、*nf- κ B* 以及 *il-22* 的表达量显著高于野生型,*nr4a1*^{-/-}斑马鱼中 *tnf- α* 的表达量亦略高,但并无统计学差异。在嗜水气单胞菌感染后 8 h,*nr4a1*^{-/-}斑马鱼中 4 种炎症相关因子的表达量显著高于野生型且差异更加明显。以上结果表明,在嗜水气单胞菌感染引起的斑马鱼炎症反应中,*nr4a1*可能发挥负向的抑炎作用。

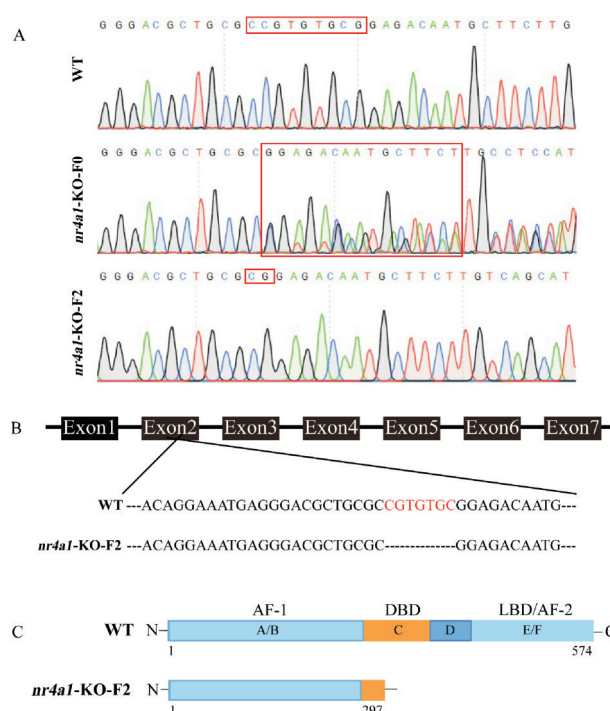


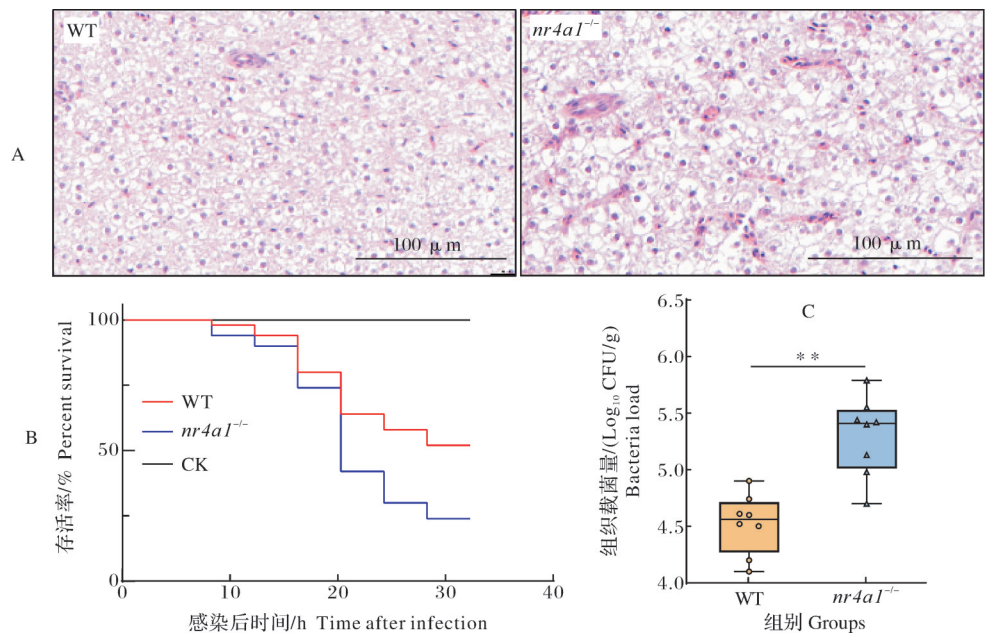
图5 *nr4a1*敲除靶点有效性检测及纯合突变示意图

Fig.5 Schematic diagram of *nr4a1* knock-out target validity assay and pure mutation

2.5 *nr4a1*过表达对ZF4细胞中炎症因子表达的影响

为进一步验证 *nr4a1* 在嗜水气单胞菌感染引发的炎症中的作用,在斑马鱼 ZF4 细胞系中进行了 *nr4a1* 的过表达试验。如图 8A 所示,*nr4a1* 过表达效率显著,可以进行后续试验。

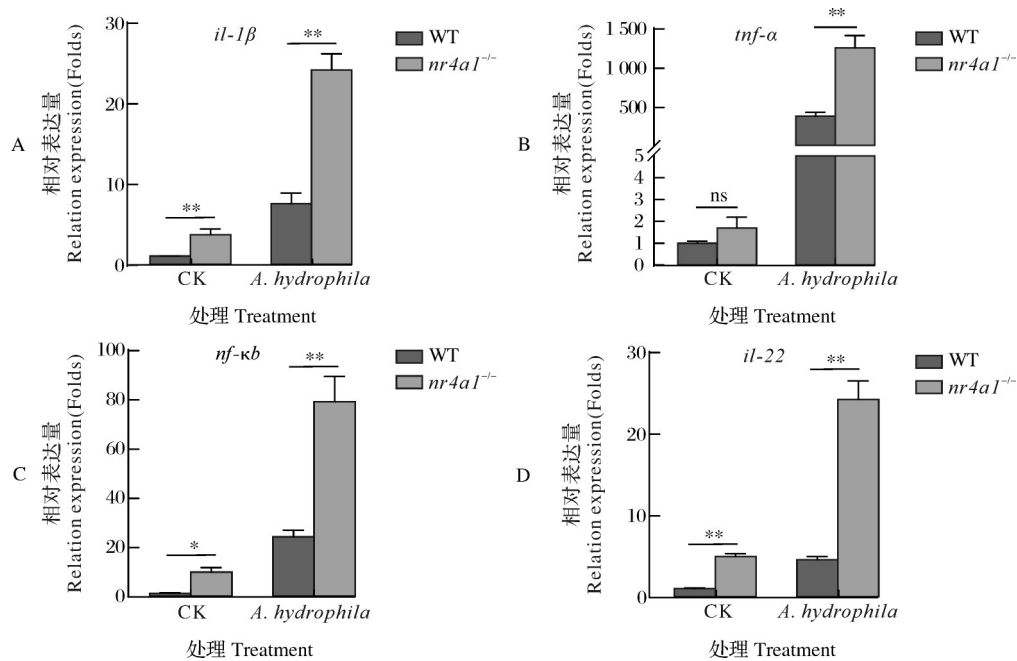
在嗜水气单胞菌感染前,过表达组中炎症因子 *il-1 β* 、*tnf- α* 、*nf- κ B* 以及 *il-22* 相较于未过表达组并无显著差异,但在嗜水气单胞菌感染后过表达组中 4 种炎症因子表达量均显著低于未过表达组(图 8C~F)。同时,在嗜水气单胞菌感染前后,过表达 *nr4a1* 的细胞中核因子 κ B p65 亚基(*p65*)的表达量均显著较低(图 8B)。以上结果表明,*nr4a1* 可以抑制嗜水气单胞菌诱发的炎症反应中相关炎症因子的表达。



A:嗜水气单胞菌感染后8 h野生型和 $nr4a1^{-/-}$ 斑马鱼的肝脏组织HE切片。B:嗜水气单胞菌感染后野生型和 $nr4a1^{-/-}$ 斑马鱼的存活率曲线。C:嗜水气单胞菌感染后8 h野生型和 $nr4a1^{-/-}$ 斑马鱼肝脏组织载菌量。A: HE sections of liver tissue from wild-type and $nr4a1$ -deficient zebrafish 8 h after *A. hydrophila* infection; B: Survival curves of wild-type and $nr4a1$ -deficient zebrafish after *A. hydrophila* infection; C: Bacterial load in wild-type and $nr4a1$ -deficient zebrafish liver tissue 8 h after *A. hydrophila* infection.* $P<0.05$,** $P<0.01$.

图6 嗜水气单胞菌感染后野生型和 $nr4a1^{-/-}$ 斑马鱼的组织损伤、存活率和组织载菌量检测

Fig.6 Detection of tissue damage, survival rate, and tissue bacteria load in WT and $nr4a1^{-/-}$ zebrafish after *A. hydrophila* infection



A: $il-1\beta$;B: $tnf-\alpha$;C: $nf-\kappa B$;D: $il-22$. * $P<0.05$,** $P<0.01$.

图7 嗜水气单胞菌感染后8 h野生型和 $nr4a1^{-/-}$ 斑马鱼炎症因子的相对表达量

Fig.7 Relative expression of inflammatory factors in wild-type and $nr4a1^{-/-}$ zebrafish 8 h after *A. hydrophila* infection

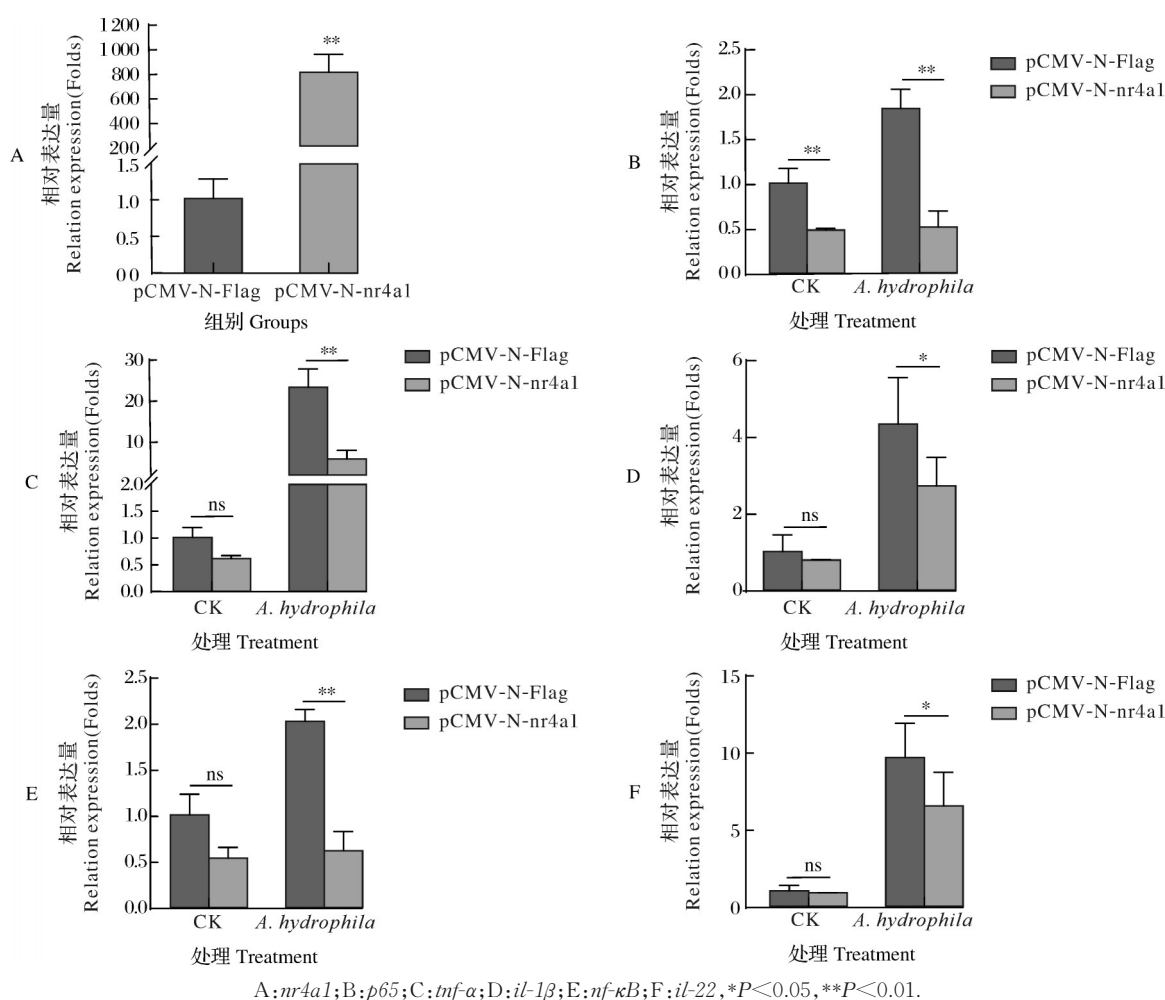


图8 嗜水气单胞菌感染前后未过表达和过表达 *nr4a1* 组 ZF4 细胞中炎症因子的相对表达量

Fig.8 Relative expression of inflammatory factors in control and overexpressing *nr4a1* group ZF4 cells before and after *A. hydrophila* infection

3 讨论

孤儿核受体 Nr4a1 广泛参与炎症反应、凋亡和代谢等过程^[18],为探究 *nr4a1* 在嗜水气单胞菌感染引起的斑马鱼免疫炎症反应中的作用,本研究首先分析了斑马鱼 Nr4a1 的结构特征,该基因在斑马鱼、草鱼、团头鲂、人、小鼠以及非洲爪蟾中高度保守,且斑马鱼 *nr4a1* 编码的氨基酸序列与草鱼、团头鲂高度一致。通过这些分析和系统进化树的结果,我们认为 Nr4a1 在鱼类和哺乳动物中可能具有相似的免疫功能,即在不同生理情况下发挥促炎^[19]或抑炎^[20]的生理作用。

在斑马鱼健康组织中,*nr4a1* 存在广泛的表达,其在肌肉、心脏中的表达略高于其他组织,这可能与 *nr4a1* 在肌肉发育^[21]和大脑小胶质细胞中的免疫调节功能^[22]有关。在嗜水气单胞菌感染斑马鱼之后,我们观察到在肝脏组织中 *nr4a1* 对于嗜水气单胞菌

的入侵发生响应,相对表达量呈现先下降再回升的趋势。为明确斑马鱼 *nr4a1* 在嗜水气单胞菌感染中的作用,本研究使用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建 *nr4a1*^{-/-} 斑马鱼并进行了感染试验。

嗜水气单胞菌感染后,*nr4a1*^{-/-} 斑马鱼表现出比野生型更低的存活率。感染后 8 h,*nr4a1*^{-/-} 斑马鱼肝脏组织呈现更严重的病理损伤,包括更严重的肝脏充血和水肿;同时,其肝脏载菌量也显著高于野生型。这些结果与在 *nr4a1*^{-/-} 小鼠模型中观察到的严重炎症反应如脾肿大、肝脏炎性细胞严重渗透等结果^[10]类似。鉴于 *nr4a1* 缺失导致感染后果加剧,提示 *nr4a1* 在嗜水气单胞菌感染后斑马鱼的肝脏组织中发挥抑制炎症的作用。

在炎症反应中,炎症因子 Il-1β、Tnf-α、Nf-κB 以及 Il-22 各自扮演着重要的角色。Il-1β 是一种关键的促炎细胞因子,它在炎症性肠病中起着重要作用,通

过招募和激活肠黏膜免疫细胞来促进促炎反应的诱导^[23]。Tnf- α 通过特异性结合位于细胞表面的2种受体TNF-R1和TNF-R2起到信号传导与调节作用,TNF-R1在大多数组织中表达,与TNF结合后产生经典的促炎反应,促进炎症因子的表达,参与炎症诱导^[24]。NF- κ B^[25]和IL-22^[26]同样被认为具有促进炎症的作用。在哺乳动物的研究中发现,Nr4a1可以通过调节炎症细胞因子的表达参与炎症反应,包括通过调节代谢转换来影响T细胞的激活,进而影响炎症因子的表达^[27]以及调控凋亡细胞的清除发挥其抗炎作用等^[28]。为确定Nr4a1在斑马鱼的肝脏组织中调控炎症作用的机制,本研究通过qPCR检测在嗜水气单胞菌感染前后4种炎症因子在Nr4a1^{-/-}和野生型斑马鱼肝脏中的相对表达量,结果显示,在感染前Nr4a1^{-/-}斑马鱼中除tnf- α 外,il-1 β 、nf- κ B以及il-22的表达量均显著高于野生型斑马鱼。感染后,Nr4a1^{-/-}斑马鱼中4种炎症因子的表达均出现显著上调,且其变化幅度相较于感染前更加显著,这一结果表明,Nr4a1在斑马鱼的炎症反应中扮演着负性调节因子的角色,通过抑制炎症因子的表达来调控免疫炎症反应。

为了验证这一发现和进一步探究Nr4a1在斑马鱼中的作用机制,本研究在体外斑马鱼ZF4细胞系中构建了Nr4a1的过表达细胞模型,结果表明,在嗜水气单胞菌感染前,过表达Nr4a1的斑马鱼ZF4细胞中炎症因子il-1 β 、tnf- α 、nf- κ B以及il-22的表达与未过表达组相比没有显著差异。这一发现暗示,在没有外界病原体刺激的情况下,Nr4a1的过表达可能并不直接影响这些炎症因子的基础表达水平,或者这种影响在没有炎症刺激的情况下并不明显。然而,在嗜水气单胞菌感染后,过表达组中这些炎症因子的表达显著低于未过表达组。这一结果表明,Nr4a1的过表达能够抑制嗜水气单胞菌诱导的炎症,其机制在于其减少炎症因子的产生,即通过这一途径控制了炎症反应的强度,避免了过度免疫损伤。

此外,试验中还观察到,过表达Nr4a1的细胞中p65的表达量显著较低。nf- κ B是一种重要的核转录因子,在细胞内参与调节多种生理过程,包括炎症反应、免疫应答、细胞增殖和凋亡^[29],p65是NF- κ B家族的5个亚基之一,在NF- κ B信号通路的激活中扮演关键角色^[30],这提示在ZF4细胞中Nr4a1可能通过抑制NF- κ B信号通路来减少炎症因子的表达,从而在嗜水气单胞菌感染中发挥抗炎作用。嗜水气单胞

菌作为一种常见的水生病原体,能够引起鱼类和人类的严重感染^[31-32],通过调节Nr4a1的表达,可以开发出新的治疗策略,这可为解决由嗜水气单胞菌引发的鱼类炎症性疾病提供新的思路和靶点。当然,本研究也存在一定的局限,Nr4a1的过表达试验仅在体外细胞模型中得到验证,而未在体内模型中进行确认。尽管体外模型具有条件可控、便于机制探究的优点,但其结果仍需通过体内实验进一步验证。例如,体外细胞可能无法完全模拟体内复杂的免疫微环境和炎症反应。在鱼体内激活Nr4a1对抵御嗜水气单胞菌感染的功能研究和对细胞其他功能的潜在影响仍需进一步探索。

综上,本研究首次在鱼类中探究了Nr4a1在嗜水气单胞菌感染引起的免疫炎症反应中的作用与机制,发现Nr4a1的敲除会加重嗜水气单胞菌引发的斑马鱼炎症反应并上调炎症因子表达,而在细胞中过表达Nr4a1可以抑制嗜水气单胞菌感染引起的炎症因子的表达,且这种抑制作用可能与NF- κ B信号通路的调控有关。

参考文献 References

- [1] 张文歆,吴子媚,石焕英,等.孤核受体Nur77在肿瘤治疗中的研究进展[J].上海医药,2021,42(23):3-7.ZHANG W X, WU Z M, SHI H Y, et al. Research progress of orphan nuclear receptor Nur77 in cancer therapy[J]. Shanghai medical & pharmaceutical journal, 2021, 42(23): 3-7 (in Chinese with English abstract).
- [2] SAFE S, JIN U H, HEDRICK E, et al. Minireview: role of orphan nuclear receptors in cancer and potential as drug targets[J]. Molecular and cellular endocrinology, 2014, 28(2): 157-172.
- [3] RIUS J, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ J, CRESPO J, et al. Involvement of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB[J]. Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology, 2004, 24(4): 697-702.
- [4] LEE S O, LI X, KHAN S, et al. Targeting NR4A1 (TR3) in cancer cells and tumors[J]. Expert opinion on therapeutic targets, 2011, 15(2): 195-206.
- [5] ZHANG X K. Targeting Nur77 translocation[J]. Expert opinion on therapeutic targets, 2007, 11(1): 69-79.
- [6] LITH S C, DE VRIES C J M. Nuclear receptor Nur77: its role in chronic inflammatory diseases[J]. Essays in biochemistry, 2021, 65(6): 927-939.
- [7] ZHAO W M, MA L, CAI C, et al. Caffeine inhibits NLRP3 inflammasome activation by suppressing MAPK/NF- κ B and

- A2aR signaling in LPS-induced THP-1 macrophages [J]. International journal of biological sciences, 2019, 15 (8) : 1571-1581.
- [8] PEI L M, CASTRILLO A, TONTONZO P. Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77 [J]. Molecular endocrinology, 2006, 20 (4) : 786-794.
- [9] TIAN H L, CHEN F, WANG Y F, et al. Nur77 prevents osteoporosis by inhibiting the NF- κ B signalling pathway and osteoclast differentiation [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2022, 26(8) : 2163-2176.
- [10] LI X M, LU X X, XU Q, et al. Nur77 deficiency leads to systemic inflammation in elderly mice [J/OL]. Journal of inflammation, 2015, 12: 40 [2025-01-07]. <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0085-0>.
- [11] DENG Z, LIU Q, WANG M M, et al. GPA peptide-induced Nur77 localization at mitochondria inhibits inflammation and oxidative stress through activating autophagy in the intestine [J/OL]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2020, 4964202 [2025-01-07]. <https://doi.org/10.1155/2020/4964202>.
- [12] RODRÍGUEZ-CALVO R, FERRÁN B, ALONSO J, et al. NR4A receptors up-regulate the antiproteinase alpha-2 macroglobulin (A2M) and modulate MMP-2 and MMP-9 in vascular smooth muscle cells [J]. Thrombosis and haemostasis, 2015, 113(6) : 1323-1334.
- [13] 谢理, 高崧, 高清清, 等. 江苏人工养殖团头鲂嗜水气单胞菌感染的调查分析 [J]. 动物医学进展, 2021, 42(11) : 125-128. XIE L, GAO S, GAO Q Q, et al. Investigation and analysis of *Aeromonas hydrophila* infection in *Megalobrama amblycephala* cultured in Jiangsu Province [J]. Progress in veterinary medicine, 2021, 42 (11) : 125-128 (in Chinese with English abstract).
- [14] 丁祝进. 团头鲂铁蛋白和转铁蛋白基因在嗜水气单胞菌感染过程中的免疫功能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017. DING Z J. Immune function of the ferritin and transferrin genes in *Megalobrama amblycephala* after infection by *Aeromonas hydrophila* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [15] GRAYFER L, KERIMOGLU B, YAPARLA A, et al. Mechanisms of fish macrophage antimicrobial immunity [J/OL]. Frontiers in immunology, 2018, 9: 1105 [2025-01-07]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01105>.
- [16] 王济秀. 团头鲂 IL-6 介导的 JAK/STAT3 通路对非特异性免疫应答的调控机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2022. WANG J X. Regulation mechanism of IL-6 mediated JAK/STAT3 pathway on innate immune response in *Megalobrama amblycephala* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [17] TAI H M, HUANG H N, TSAI T Y, et al. Dietary supplementation of recombinant antimicrobial peptide *Epinephelus lanceolatus* piscidin improves growth performance and immune response in *Gallus gallus domesticus* [J/OL]. PLoS One, 2020, 15 (3) : e0230021 [2025-01-07]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230021>.
- [18] 蒋玉洁, 罗维贵, 廖品琥. 孤儿核受体 Nur77/NR4A1 调节巨噬细胞炎症反应研究进展 [J]. 右江医学, 2020, 48(6) : 401-406. JIANG Y J, LUO W G, LIAO P H. Research progress of orphan nuclear receptor Nur77/NR4A1 in the regulation of inflammatory response of macrophages [J]. Chinese Youjiang medical journal, 2020, 48 (6) : 401-406 (in Chinese with English abstract).
- [19] PULAKAZHI VENU V K, ALSTON L, IFTINCA M, et al. Nr4A1 modulates inflammation-associated intestinal fibrosis and dampens fibrogenic signaling in myofibroblasts [J]. American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology, 2021, 321(3) : 280-297.
- [20] YAO Y. NR4A1 destabilizes TNF mRNA in microglia and modulates stroke outcomes [J/OL]. PLoS biology, 2023, 21 (7) : e3002226 [2025-01-07]. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002226>.
- [21] PAN X H, LIU B D, CHEN S J, et al. Nr4a1 as a myogenic factor is upregulated in satellite cells/myoblast under proliferation and differentiation state [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2019, 513(3) : 573-581.
- [22] ZHANG Y J, SONG J R, ZHAO M J. NR4A1 regulates cerebral ischemia-induced brain injury by regulating neuroinflammation through interaction with NF- κ B/p65 [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2019, 518 (1) : 59-65.
- [23] AGGELETOPOULOU K, KALAFATELI M, TSOUNIS E P, et al. Exploring the role of IL-1 β in inflammatory bowel disease pathogenesis [J/OL]. Frontiers in medicine, 2024, 11: 1307394 [2025-01-07]. <https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1307394>.
- [24] DECOURT B, LAHIRI D K, SABBAGH M N. Targeting tumor necrosis factor alpha for Alzheimer's disease [J]. Current Alzheimer research, 2017, 14(4) : 412-425.
- [25] LAWRENCE T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation [J/OL]. Cold spring harbor perspectives in biology, 2009, 1 (6) : a001651 [2025-01-07]. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>.
- [26] SAXTON R A, HENNEBERG L T, CALAFIORE M, et al. The tissue protective functions of interleukin-22 can be decoupled from pro-inflammatory actions through structure-based design [J]. Immunity, 2021, 54(4) : 660-672.
- [27] LIEBMANN M, HUCKE S, KOCH K, et al. Nur77 serves as a molecular brake of the metabolic switch during T cell activation to restrict autoimmunity [J]. PNAS, 2018, 115(34) : 8017-8026.
- [28] IPSEIZ N, UDERHARDT S, SCHOLTYSEK C, et al. The nuclear receptor Nr4a1 mediates anti-inflammatory effects of

- apoptotic cells [J]. Journal of immunology, 2014, 192 (10) : 4852-4858.
- [29] GIRIDHARAN S, SRINIVASAN M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation [J]. Journal of inflammation research, 2018, 11: 407-419.
- [30] FLORIO T J, LOKAREDDY R K, YEGGONI D P, et al. Differential recognition of canonical NF- κ B dimers by importin α 3 [J/OL]. Nature communications, 2022, 13 (1) : 1207 [2025-01-07]. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28846-z>.
- [31] 王春瑞. 嗜水气单胞菌的分子流行病学调查及其两种分型方法的研究 [D]. 宁波: 宁波大学, 2011. WANG C R. The study of molecular epidemiological surveillance and two typing methods of *A. hydrophila* [D]. Ningbo: Ningbo University, 2011 (in Chinese with English abstract) .
- [32] LIAN L L, SUN L N, ZHAO X R, et al. Analysis of pathogenicity factors in the highly virulent *Aeromonas hydrophila* strain LP-2 [J/OL]. Aquaculture, 2025, 598: 741982 [2025-01-07]. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741982>.

Role of zebrafish *nr4a1* in inflammatory response induced by *Aeromonas hydrophila* infection

ZHENG Yunpeng, ZHAI Wenya, WANG Zhensheng, WANG Huanling, LIU Hong

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The structure of the *nr4a1* gene in zebrafish (*Danio rerio*) was characterized with bioinformatics and a *nr4a1*^{-/-} zebrafish model was constructed with CRISPR-Cas9 genome editing to study in depth the mechanism of regulating the resistance to bacterial inflammation in fish. The expression dynamics of *nr4a1*, levels of inflammatory factors, bacterial clearance capacity, and histopathological changes in *nr4a1*^{-/-} zebrafish and a *nr4a1*-overexpressing ZF4 cell line following by the infection with *Aeromonas hydrophila* were systematically evaluated with quantitative real-time PCR (qPCR), tissue bacterial load assessment, and pathological analysis to elucidate the role and mechanism of *nr4a1* in *A. hydrophila*-induced hepatic inflammation in zebrafish. The results showed that the sequence of *nr4a1* gene in zebrafish was highly conserved, with an open reading frame encoding a polypeptide of 574 amino acids. The predicted protein has an isoelectric point of 5.79 and a relative molecular mass of 63.04. The *nr4a1* gene in zebrafish was widely expressed across various tissues. In *nr4a1*^{-/-} zebrafish, a 7 bp deletion in the second exon resulted in premature termination of translation, truncating the encoded protein from 574 aa to 297 aa. The relative expression of *nr4a1* in liver tissues of zebrafish initially decreased and then increased after the infection with *A. hydrophila*. Compared with wild-type zebrafish, *nr4a1*^{-/-} mutants exhibited a lower survival rate, with a significantly higher bacterial loads and more severe hepatic pathological damage in liver tissues. The results of qPCR analysis showed that the expression level of inflammatory factors including *il-1 β* , *tnf- α* , *nf- κ B* and *il-22v* was significantly higher in *nr4a1*^{-/-} zebrafish than that in wild-type controls. On the contrast, overexpression of *nr4a1* in ZF4 cells significantly inhibited the infection-induced upregulation of these inflammatory factors. It is indicated that Nr4a1 acts as a negative regulator to inhibit the expression of pro-inflammatory factors, thereby playing a crucial role in protecting the immune inflammatory response to *A. hydrophila* infection in zebrafish.

Keywords zebrafish (*Danio rerio*); *Aeromonas hydrophila*; *nr4a1*; inflammatory response; gene knockout

(责任编辑:边书京)