

## 弗氏柠檬酸杆菌感染诱导斑马鱼皮肤免疫相关基因的差异表达

吕爱军<sup>1\*</sup>, 胡秀彩<sup>2</sup>, 朱静榕<sup>1</sup>, 薛军<sup>1</sup>, 王艺<sup>1</sup>, 程超<sup>1</sup>

(1. 徐州师范大学生命科学学院, 江苏 徐州 221116;

2. 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

**摘要:** 从草鱼肠道中分离到1株细菌,通过形态学观察、生理生化特征和16S rDNA序列分析等鉴定为弗氏柠檬酸杆菌,动物试验结果表明,该菌对斑马鱼有致病性;从感染诱导的斑马鱼皮肤组织中提取总RNA,经Biotin荧光标记与拥有15 617个cDNA片段的斑马鱼基因芯片(affymetrix)杂交筛选分析,获得斑马鱼皮肤免疫相关差异表达基因88个,其中有74个上调表达基因和14个下调表达基因;进一步根据基因功能聚类(GO)分析,初步将88个差异表达基因分为8个生物学功能,其中主要参与补体激活、急性期反应、应激防御反应、细胞凋亡、抗原加工提呈、细胞迁移粘附、凝血因子和血小板激活等免疫应答过程;同时进行信号通路(pathway)分析,结果表明MAPK(*hsp70*、*daxx*、*nfkbiab*)、JAK/STAT(*ifn1*)和TGF- $\beta$ (*thbs1*)等信号通路参与斑马鱼皮肤抗弗氏柠檬酸杆菌感染免疫应答。采用基因芯片方法筛选与鱼类皮肤免疫相关的功能基因,为将来以斑马鱼为模型研究鱼类皮肤局部免疫应答的分子机制提供科学依据。

**关键词:** 弗氏柠檬酸杆菌; 斑马鱼; 皮肤; 免疫相关基因; 表达; 基因芯片

**中图分类号:** S 917; Q 786; Q 939.91

**文献标志码:** A

鱼类皮肤中含有大量的黏液细胞、巨噬细胞和抗体分泌细胞(antibody-secreting cells),与其它活性物质组成了抵御病原微生物感染的有效防线<sup>[1]</sup>。最近相继从斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)等鱼类的皮肤培养液中检测到特异性抗体<sup>[2-3]</sup>。鱼类皮肤分泌的抗体可以参与保护机体,并防御病原的感染<sup>[1-4]</sup>。研究表明,浸泡免疫抗原摄取的部位主要在皮肤和鳃,并且主要诱导局部免疫应答<sup>[5]</sup>。因此,鱼类除了具有有机体系统免疫应答外,针对病原可能还有其它的免疫保护机制,一般认为鱼类存在独立的皮肤免疫系统(skin immune system, SIS)。对人、哺乳动物和鱼类的研究表明,皮肤不仅具有非特异性免疫防御功能,而且参与机体特异性免疫的抗原识别、免疫细胞激活及皮肤免疫应答等过程<sup>[6-9]</sup>。与哺乳动物相比,关于鱼类皮肤非特异性免疫应答的分子机制,目前

仍不十分清楚。

弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)是一种“人—兽—鱼”共患性条件致病菌,可引起人、哺乳动物、鱼、蟹等感染发病<sup>[10-13]</sup>。斑马鱼(*Danio rerio*)作为一种新型模式生物,已广泛用于生长发育、遗传、免疫和生理病理等领域<sup>[14-15]</sup>。近年来,关于鱼类的机体系统免疫应答报道较多<sup>[16-18]</sup>。最近,基因芯片技术已应用于斑马鱼免疫相关基因表达谱等研究<sup>[17-18]</sup>。Meijer等<sup>[19]</sup>采用3种不同的基因芯片(45 465个基因)对海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)感染成体斑马鱼的基因表达谱分析表明,获得159个基因差异表达显著一致,主要涉及炎症反应、信号转导等免疫相关基因。迄今,尚未见有关通过cDNA芯片技术筛选斑马鱼皮肤免疫相关差异表达基因的报道。本研究以鱼源弗氏柠檬酸杆菌感染诱导的成体斑马鱼为实

收稿日期:2011-08-21 修回日期:2011-10-31

资助项目:国家自然科学基金项目(30800847);江苏省高校“青蓝工程”(2008)

通讯作者:吕爱军, E-mail: lajand@126.com

验动物模型,通过基因芯片技术分析其皮肤免疫相关因子的应答机制,旨在为鱼类疾病诊断防治提供一定的理论参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

**实验动物** 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 购自江苏省徐州市某菜市场,选取体质量约 500 g 的草鱼用于细菌分离;野生型斑马鱼成鱼购自徐州市某花鸟市场,带回实验室饲养于水族箱中,饲养用自来水经生物过滤器过滤并充分曝气,温度(25 ± 1) °C、光照/黑暗周期(12 h/12 h)条件下饲养 2 周,确认健康后用于感染试验。

**培养基** 营养琼脂、麦康凯琼脂(MAC)、肠杆菌科细菌生化编码鉴定管 GYZ-15e 等购自杭州微生物试剂有限公司。

**基因芯片** cDNA 芯片为斑马鱼表达谱芯片(Zebrafish Genome Array, GPL1319),由美国 Affymetrix 公司研制,其包含的序列信息覆盖了来自 GenBank、UniGene 公共数据库中全部的斑马鱼基因组序列,包括 15 617 个探针,可用于超过 14 900 个转录本的基因表达研究。

### 1.2 实验方法

**菌株分离、形态观察与生化试验** 菌株的分离、形态观察按常规方法进行,细菌微量生化鉴定参照文献[20]方法进行。

**细菌总 DNA 提取、16S rDNA 基因的 PCR 扩增及系统进化树分析** 采用革兰阴性菌基因组提取试剂盒(上海捷瑞生物工程公司)提取细菌总 DNA。以总 DNA 为模板,采用细菌通用引物 F27 和 R1492 进行 16S rDNA 基因扩增,PCR 产物连接 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司),转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  筛选阳性克隆,送生工生物工程(上海)有限公司测序。将菌株的 16S rDNA 基因序列通过 NCBI 的 BLAST 检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>)进行序列同源性分析,采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树,并通过 1 000 次的自举分析(Bootstrap)进行置信度检测。

**斑马鱼感染试验** 将分离菌株接种于营养琼脂斜面,28 °C 恒温培养 18 ~ 24 h,用无菌生理盐水洗下菌苔,制成菌悬液,以活菌浓度为 10<sup>8</sup> CFU/L 对斑马鱼进行浸泡感染试验,浸泡 10

min,观察斑马鱼发病和死亡情况,连续观察 7 d。对照组鱼浸泡于 0.65% 无菌生理盐水中。随机选取诱导 7 h 的感染组和对照组各 20 尾斑马鱼,取其背部皮肤组织样品混合后,贮存于液氮中备用。

RNA 提取及 cRNA 的合成、标记和芯片杂交按 Affymetrix 公司提供的操作规程进行,2 个生物学重复,由北京博奥生物芯片公司完成。主要步骤:斑马鱼皮肤总 RNA 经 Qiagen 公司的 RNeasy Mini Kit 纯化后,采用 Affymetrix One Cycle cDNA Synthesis Kit 合成单链 cDNA。新合成的 cDNA 纯化后,经 GeneChip<sup>®</sup> IVT Labeling Kit 完成 cDNA 的转录合成和 Biotin 荧光标记。Biotin 荧光标记的 cDNA 片段纯化后,待芯片杂交液加入到芯片中,在 45 °C 60 r/min 条件下杂交反应持续 16 h (Hybridization Oven 640, Affymetrix 公司)。杂交结束后,吸出芯片中杂交液,加入洗液,充分洗涤后,进行基因芯片扫描分析。

**芯片扫描和数据处理分析** 经杂交洗涤后的基因芯片采用 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 进行扫描,通过对芯片灰度扫描图进行分析,将与斑马鱼基因芯片的 15 617 个基因杂交反应所获的数据应用 GeneChip Operating Software(GCOS 1.4)软件进行数据统计分析。实验组与对照组基因表达量的比值(ratio) ≥ 2 或 ≥ 0.5 的基因点为表达差异基因。对筛选出的差异表达基因,参考 NCBI 公共数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)和 Affymetrix 公司的网站的数据库(<http://www.Affmetrix.com>)查阅相关的基因信息,并对基因进行分类。为了获得弗氏柠檬酸杆菌感染诱导变化基因的潜在功能,运用通路分析工具 GOstat 在(<http://bioinfo.capitalbio.com/mas3>)上进行通路(pathway)分析,以找出与斑马鱼皮肤免疫相关的特定差异基因。

## 2 结果

### 2.1 菌株鉴定

从草鱼肠道中分离到 1 株细菌,革兰氏染色阴性,电镜观察菌体呈杆状、两端钝圆,大小为(0.5 ~ 0.8) μm × (1.0 ~ 2.5) μm(图 1);生化特性结果见表 1,查阅《伯杰氏系统细菌学手册》

和肠杆菌科(Enterobacteriaceae)细菌生化数值编码表,鉴定为弗氏柠檬酸杆菌。PCR 扩增分离株的 16S rDNA 序列长度为 1 505 bp(图 2-a),通过 Blast 软件进行序列同源性检索,表明该菌株 16S rDNA 序列与弗氏柠檬酸杆菌 DSM 30039 模式菌株同源性为 99.47%,选取柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)11 个模式菌株的 16S rDNA 序列进行系统发育学分析,结果显示,分离株与弗氏柠檬酸杆菌处于同一分支(图 3)。

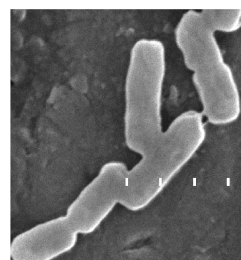


图 1 分离菌株的扫描电镜形态(标尺=0.5 μm)

Fig. 1 Scanning electron micrograph of the isolated strain (bar = 0.5 μm)

表 1 分离菌株的生化特征

Tab. 1 Biochemical characteristics of the isolated strain

项目 items	结果 results	项目 items	结果 results
运动性 motility	+	鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	-
枸橼酸盐 citrate	+	苯丙氨酸酶 phenylalanine	-
葡萄糖酸盐 gluconate	-	侧金花盏醇 adonitol	-
甲基红试验 methyl red test	+	山梨醇 sorbitol	+
H <sub>2</sub> S 产生 H <sub>2</sub> S production	+	葡萄糖产气 glucose (gas)	+
吲哚产生 indole production	-	木糖 xylose	+
脲酶 urease	-	棉子糖 melitose	-
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	-	编码值 coding value	43 305

注: + 为阳性; - 为阴性。

Notes: + is positive; - is negative.

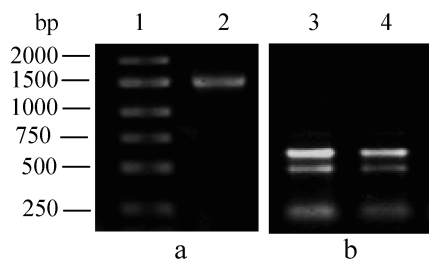


图 2 PCR 扩增结果

(a) 菌株 16S rDNA PCR 扩增; (b) 斑马鱼皮肤总 RNA。  
1. DNA marker; 2. 16S rDNA; 3. 对照组; 4. 感染组。

Fig. 2 Result of PCR

(a) agarose gel electrophoresis of PCR; (b) total RNA isolated from zebrafish skin. 1. DNA marker; 2. 16S rDNA of the strain; 3. control fish; 4. infected fish.

## 2.2 斑马鱼感染试验

将弗氏柠檬酸杆菌分离株对斑马鱼浸泡感染试验,结果表明,当饲养温度约为 25 °C 时,24 ~ 96 h 致死率为 66.7%。感染发病死亡的斑马鱼呈现皮肤、腮部出血,腹部膨胀等症状(图 4)。对照组斑马鱼无病变症状。

## 2.3 斑马鱼皮肤免疫相关基因

从鱼源弗氏柠檬酸杆菌感染诱导的成体斑马鱼皮肤组织中提取总 RNA(图 2-b),经 Biotin 荧光标记与拥有 15 617 个 cDNA 片段的斑马鱼基因芯片(Affymetrix)杂交后,共检测筛选获得 88 个皮肤免疫相关差异表达基因,其中有 74 个上调表达基因(ratio ≥ 2.0)和 14 个下调表达基因(ratio ≤ 0.5);在斑马鱼皮肤组织 88 个差异表达基因中,其中有 83 个为已知功能基因,5 个为未知功能新基因(LOC799904、zgc:173545、zgc:92049、zgc:64115 和 zgc:64003)。进一步将 88 个差异表达基因数据输入芯片分子功能注释 MAS 系统,进行 GO(gene ontology)分析,结果发现斑马鱼皮肤组织中 88 个差异表达基因主要涉及 8 种生物学功能,其中主要参与补体激活(*c9*, *c8γ*, *c8β*, *c3c*, *c3b*, *cfb*)、急性期反应(*a2ml*, *tfa*, *cp*, *agt*, *ambpl*)、细胞凋亡(*bokb*, *bag4*, *wdr92*, *pdcd7*, *pdcd4b*, *nfkbiab*, *nfkbiaa*)、抗原加工提呈(*mhc1uaa*, *thy1*, *mhc2a*)、细胞迁移粘附(*scarb1*, *pvr13*, *oep*, *wnt8a*, *dnd*, *cldng*, *cldnf*, *cldnd*)、凝血因

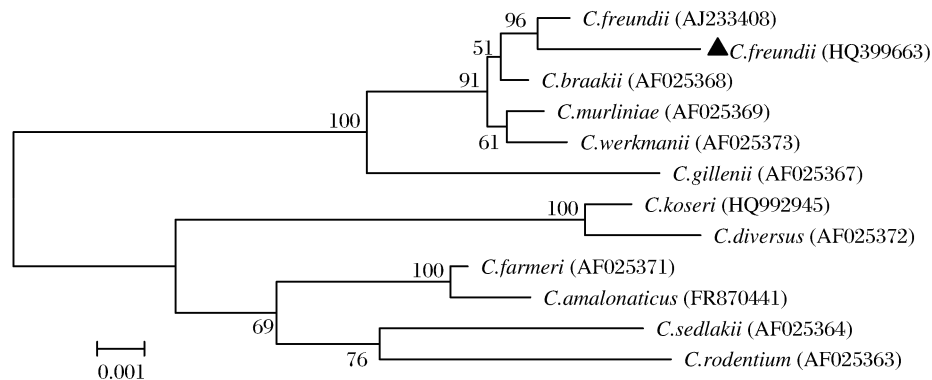
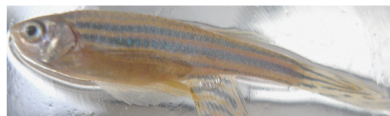


图3 菌株 16S rDNA 基因序列构建的 NJ 树

▲代表分离株。

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rDNA gene sequences of the strain

▲ indicates the isolate.



(a)



(b)

图4 弗氏柠檬酸杆菌感染斑马鱼试验

(a) 对照组; (b) 感染组。

Fig. 4 Pathogenicity assays in zebrafish using *C. freundii* infection

(a) control fish; (b) infected fish.

子 (*fg*) 和血小板激活 (*fgg*、*fgb*、*fga*、*thbs1*) 以及应激防御反应等免疫应答过程; 并且以防御应答反应 (defense immune response)、应激反应 (response to stress and stimulus) 方面的差异表达基因最多, 占有比例分别为 29.55% 和 23.86% (图 5)。同时根据 88 个差异表达基因的 ratio 值, 依次将各个差异表达基因所涉及的分子功能途径进行通路分析, 结果表明, MAPK 信号通路 (*hsp70*、*daxx*、*nfkbiab*;  $P < 0.01$ )、JAK/STAT 信号通路 (*ifn1*;  $P < 0.05$ )、Wnt 信号通路 (*wnt8a*;  $P < 0.05$ ) 和 TGF- $\beta$  信号通路 (*thbs1*;  $P < 0.05$ ) 等参与斑马鱼皮肤抗弗氏柠檬酸杆菌感染免疫应答 (表 2)。

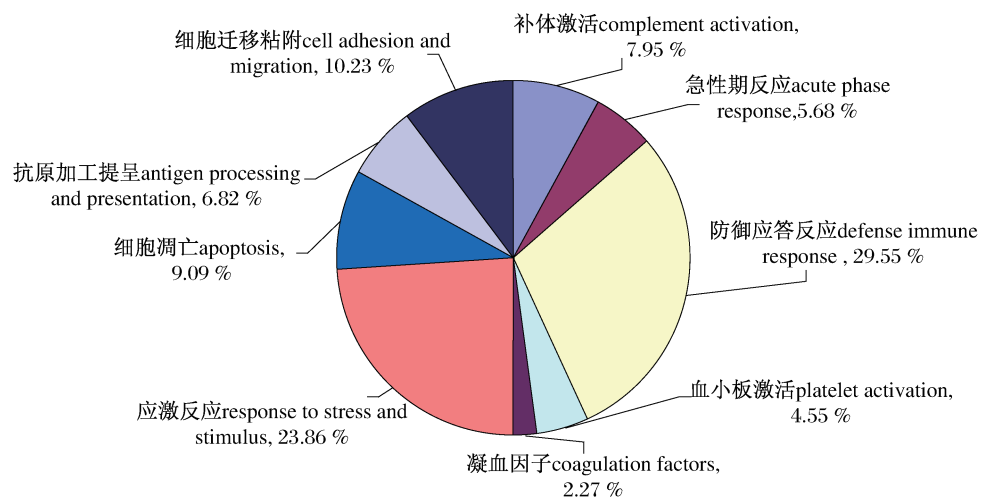


图5 88 个斑马鱼皮肤免疫相关基因的分子功能分类

Fig. 5 Functional annotations of the 88 immune-related genes of skin in zebrafish

表 2 斑马鱼皮肤组织中免疫应答相关基因差异表达  
Tab.2 Immune response related-gene in zebrafish skin

GenBank 登录号 accession no.	基因 gene	差异倍数 fold change	GenBank 登录号 accession no.	基因 gene	差异倍数 fold change
BQ284848	补体 9(c9)	3.98	AW421213	苯丙氨酸羟化酶(pah)	2.55
AW019689	补体 8,γ 肽(c8γ)	2.16	BI673274	MUS81 内切核酸酶同源物(mus81)	2.43
AW116668	补体 8,β 肽补体(c8β)	2.29	AF349034.1	髓过氧化物酶(mpx)	5.33
BM036389	补体 3c(c3c)	2.48	AA606011	基质金属蛋白酶 14α(mmp14α)	2.37
NM_131338.1	补体因子 B(cfb)	4.45	BI705604	MAP 激酶相互作用丝/苏氨酸激酶 1 (mknk1)	2.44
AI477673	补体 3b 类似物(LOC100149939)	2.29	CD014748	细胞色素 P450 3A 亚家族多肽 65 (cyp3a65)	2.35
BM316867	α2 巨球蛋白(α2m1)	15.06	BC053263.1	细胞色素 b5(cyb5a)	2.54
BM957464	转铁蛋白(tfa)	6.36	CD014874	水通道蛋白 12(aqp12)	2.28
BC048037.1	铜蓝蛋白(cp)	2.24	BE693167	载脂蛋白 B(apob1)	6.10
AY049731.1	血管紧张素原(agt)	3.85	NM_131264.1	芳香烃受体 2(ahr2)	2.52
CD014745	α1 微球蛋白(ambp1)	2.58	BC053218.1	BCL2 相关卵巢杀伤基因(bokb)	2.96
AY135716.1	干扰素 1(ifn1)	2.64	BG303781	BCL2 相关永生基因 4(bag4)	2.22
BI885399	干扰素调节因子 2 结合蛋白 1(irf2bp1)	2.09	BI840078	caspase 招募域样基因(DKEY-1O2.6)	3.56
BM095841	免疫球蛋白 μ 结合蛋白 2(ighmbp21)	2.05	BM025856	色氨酸 - 天门冬氨酸域重复蛋白 92 (wdr92)	3.70
BC052765.1	肿瘤坏死因子,α 诱导蛋白 8(tnfaip8)	2.17	BI983388	程序性细胞死亡 7(pdcd7)	2.14
BM956789	肿瘤坏死因子受体相关蛋白(ttrap)	2.18	BC045513.1	程序性细胞死亡 4b(pdcd4b)	2.29
BC045371.1	激活转录因子 3(atf3)	2.03	Z46776.1	主要组织相容性复合体 I 类 UAA 基因 (mhc1uaa)	2.03
BQ093532	趋化因子 CXC 受体(cxcr7b)	2.21	AY157574.1	Thy1 细胞表面抗原(thy1)	2.06
BC053242.1	B 细胞易位基因 4(btg4)	2.97	BC044516.1	B 类清道夫受体成员 1(scarb1)	2.30
BQ284855	甘露糖结合凝集素 1(lman1)	2.00	BM182506	脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白 3 (pvrl3)	2.37
BM533848	凝集素(1CH211-250E5.11)	2.30	NM_131092.1	one-eyed pinhead(oep)	2.24
BC050502.1	粘蛋白 4 类似物(LOC100000152)	2.72	BM861543	LOC799904	2.10
BC044508.1	ras 基因家族成员 GB(rhogb)	2.04	NM_130946.1	wnt8a	2.29
BC044471.1	ras 基因家族 11 成员 B(ras11b)	3.21	AY225448.1	末路基因(dnd)	3.55
NM_131128.1	载脂蛋白 A-I(apoal)	3.39	NM_180965.2	水闸蛋白 g(cldng)	2.41
BM071714	半乳糖结合凝集素域样蛋白(DKEYP-98A7.10)	2.49	NM_131766.1	水闸蛋白 f(cldnf)	2.46
CD053071	胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 3 (igf2bp3)	2.13	NM_180964.2	水闸蛋白 d(cldnd)	3.21
BC044456.1	蛋白激酶(prkrir)	2.12	AI721528	补体调控蛋白因子 I-B 类似物 (LOC557557)	0.34
CD605575	钙释放激活钙调节蛋白 1(orai1)	4.41	BI879542	嗜中性粒细胞胞质因子 1(ncf1)	0.49
AI667252	死亡相关蛋白 6(daxx)	2.01	BE017652	脂多糖诱导的肿瘤坏死因子类似物 (LOC561592)	0.48
BG306394	unc-51 样激酶 1(ulk1)	2.12	BC049401.1	CCAAT 增强子结合蛋白 β(cebpb)	0.47
BM101522	zgc:173545	2.81	BM185859	趋化因子 CCL-C11b(ccl-c11b)	0.48
BC045868.1	γ-纤维蛋白原多肽(fgg)	4.88	NM_131062.1	CC 型趋化因子 1(ccl1)	0.47
BI878927	纤维蛋白原 Bβ(fgb)	5.43	AI793480	血小板反应蛋白 1(thbs1)	0.32
BG729013	纤维蛋白原 α 链(fga)	4.95	NM_153657.1	前列腺素内过氧化物合酶(ptgs2a)	0.33
CD606451	凝血因子 VIII 类似物(LOC100147976)	2.07	BC050175.1	B 细胞 κ 轻链基因增强子核因子抑制 因子(nfkbiab)	0.32
AF515275.1	凝血因子 V(f5)	2.28	AW019105	B 细胞 κ 轻链基因增强子核因子抑制 因子(nfkbiaa)	0.41
BG306502	热休克蛋白 90α2(hsp90a.2)	2.64	NM_131695.1	MHC II 类整合膜蛋白 α(mhc2a)	0.42
BM103343	热休克蛋白 90α1(hsp90a.1)	2.69	NM_131695.1	zgc:92049	0.41
AB062116.1	热休克同源蛋白 70(hsp70)	6.86	BC053259.1	zgc:64115	0.47
BC045359.1	DnaJ(Hsp40)同源物亚家族 B 成员 1b (dnaj1b)	2.33	BI882036	zgc:64003	0.10
NM_178298.2	硒蛋白 P(sepp1b)	5.93			
BC049475.1	金属硫蛋白 2(mt2)	2.25			
NM_170767.1	卵黄蛋白原 1(vtg1)	118.70			
BG303658	卵黄蛋白原 2(vtg2)	14.58			
BI878405	卵黄蛋白原 4(vtg4)	85.81			
BC045464.1	解偶联蛋白 4(ucp4)	4.08			

注:基因平均差异表达率。

Notes: values are averaged from two biological replicates (ratio  $\geq 2$  or  $\leq 0.5$ ).

### 3 讨论

近年来,关于弗氏柠檬酸杆菌导致鱼类感染疾病的报道不断增加<sup>[10-13]</sup>。Sato等<sup>[10]</sup>最早从水族箱养殖的翻车鲀(*Mola mola*)分离到弗氏柠檬酸杆菌,感染发病表现皮肤腐烂、出血、肠炎等症状。Svetlana等<sup>[11]</sup>报道弗氏柠檬酸杆菌可引起虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)肠炎,导致较高的死亡率。陈翠珍等<sup>[12]</sup>研究表明弗氏柠檬酸杆菌引起中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)感染。舒新华等<sup>[13]</sup>报道弗氏柠檬酸杆菌感染乌鳢(*Ophiocephalus argus*)导致腹水病。本研究从草鱼肠道中分离获得弗氏柠檬酸杆菌,人工腹腔注射感染草鱼结果证实为致病株( $LD_{50} = 10^8$  cfu/mL),同时感染斑马鱼可引起皮肤出血等症状,因此建立以鱼源弗氏柠檬酸杆菌感染诱导的成体斑马鱼为实验动物模型,通过基因芯片技术分析其皮肤免疫相关因子的应答机制,旨在为鱼类疾病诊断防治提供一定的理论参考。

近几年,cDNA基因芯片技术等已用于检测牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)等鱼类机体免疫相关基因研究<sup>[9,17]</sup>。最近,Huising等<sup>[16]</sup>报道了鲤的cxc趋化因子介导嗜中性粒细胞的趋化现象,以及CXC受体(cxcr)参与鱼体上所寄生的日本鲺(*Argulus japonicus*)的急性感染。基因表达研究表明,一些免疫调节因子参与鱼类的先天与适应性免疫应答,包括细胞因子白介素(*il-1*、*il-8*)、干扰素(*ifn*)、肿瘤坏死因子(*tnf*)、趋化因子(*cxc*、*cc*)、Toll样受体(*tlrs*)以及氧化酶环氧化酶*cox-2*、诱导型NO合酶(*inos*)等,*il-1 $\beta$* 和*tnf $\alpha$* 可通过激活NF- $\kappa$ B信号通路诱导一氧化氮(NO)的产生<sup>[17,21]</sup>。除补体活性外,其它体液免疫因子如急性时相蛋白(APP)、过氧化物酶(*po*)、溶菌酶等也参与免疫调控。本研究在斑马鱼皮肤抗弗氏柠檬酸杆菌感染免疫应答中,发现补体、APP、*mhc*、*ifn*和*tnf*以及趋化因子等参与皮肤免疫应答,这为深入研究鱼类皮肤免疫系统(fish skin immune system,FSIS)的转录组学提供了参考依据。

最近,Wu等<sup>[18]</sup>采用基因芯片方法研究猪链球菌(*Streptococcus suis*)感染的斑马鱼,获得189个差异表达基因,涉及免疫应答、炎症反应、补体激活和防御应答相关基因等。Peatman等<sup>[22]</sup>采用

基因芯片方法研究鲷爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)感染鲷后肝脏基因表达谱,结果表明,可诱导MHC I类分子相关通路早期激活,涉及主要组织相容性复合体(MHC) I类基因、转铁蛋白基因(*tfa*)、细胞色素氧化酶基因(*cyp1a*)、肿瘤坏死因子(*tnf*)、补体(*C*)、半乳糖凝集素(*Igals9*)等免疫相关基因。Rojo等<sup>[23]</sup>采用RT-PCR方法对鳗利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)腹腔注射感染的斑马鱼研究表明,感染22 h后转铁蛋白基因(*tfa*)、肿瘤坏死因子基因(*tnfa*)等均上调表达。Ordas等<sup>[24]</sup>以鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)感染斑马鱼胚胎,其基因表达谱涉及转录因子、细胞因子和趋化因子、补体以及参与凋亡、抗菌活性蛋白等。进一步测序分析发现,这与Hegedus等<sup>[25]</sup>以海分枝杆菌感染成体斑马鱼的基因表达谱,存在共同抗感染应答。由此可见,本次实验与已报道的鱼类免疫相关因子有许多相同之处,提示无论鱼类系统免疫或皮肤黏膜免疫,很可能存在一些相似的分子保护机制。此外,Sar等<sup>[26]</sup>采用基因芯片研究海分枝杆菌感染成体斑马鱼的基因表达谱,结果表明影响多个信号级联反应,主要包括Wnt通路和TLR通路。

#### 参考文献:

- [1] Zhao X, Findly R C, Dickerson H W. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish [J]. *Development Comparative Immunology*, 2008, 32(5):500-508.
- [2] Xu D H, Klesius P H, Shelby R A. Cutaneous antibodies in excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), immune to *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Journal of Fish Disease*, 2002, 25(1):45-52.
- [3] Luo X C, Xie M Q, Zhu X Q, et al. Protective immunity in grouper (*Epinephelus coioides*) following exposure to or injection with *Cryptocaryon irritans* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(4):427-432.
- [4] Shoemaker C A, Xu D H, Shelby R A, et al. Detection of cutaneous antibodies against *Flavobacterium columnare* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) [J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36(8):813-818.
- [5] Moore J D, Ototake M, Nakanishi T. Particulate antigen uptake during immersion immunization of

- fish; the effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8(6) : 393 - 407.
- [ 6 ] Nestle F O, Nickoloff B J. Deepening our understanding of immune sentinels in the skin [ J ]. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117 ( 9 ) : 2382 - 2385.
- [ 7 ] Bos J D, Kapsenberg M L. The skin immune system SIS its cellular constituents and their interactions [ J ]. *Immunology Today*, 1986, 7(7-8) : 235 - 236.
- [ 8 ] Evans A. Intra-dermal vaccination series. Part 3. Skin immune system [ J ]. *Pig Progress*, 2006, 22 : 24 - 25.
- [ 9 ] Gonzalez S F, Huising M O, Stakauskas R, *et al.* Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin; inflammatory responses to injury mimicking infection with ectoparasites [ J ]. *Development Comparative Immunology*, 2007, 31 (3) : 244 - 254.
- [ 10 ] Sato N, Yamane N, Kawamura T. Systemic *Citrobacter freundii* infection among sunfish *Mola mola* in Matsushima aquarium [ J ]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1982, 48 (11) : 1551 - 1557.
- [ 11 ] Svetlana J, Dobrila J D, Lj V. *Citrobacter freundii* as a cause of disease in fish [ J ]. *Acta Veterinaria*, 2003, 53(5-6) : 399 - 410.
- [ 12 ] 陈翠珍, 张晓君, 房海, 等. 中华绒螯蟹病原弗氏柠檬酸杆菌的鉴定 [ J ]. *中国人兽共患病杂志*, 2006, 22(2) : 136 - 141.
- [ 13 ] 舒新华, 金燮理, 肖克宁, 等. 乌鳢腹水病原的分离和鉴定 [ J ]. *湖南农业大学学报*, 1998, 24(4) : 286 - 290.
- [ 14 ] Sullivan C, Kim C H. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(4) : 341 - 350.
- [ 15 ] 陈伟兴, 范兆廷, 方静杰, 等. 硝基苯对斑马鱼细胞 DNA 的损伤 [ J ]. *水产学报*, 2009, 34(5) : 865 - 870.
- [ 16 ] Huising M O, Stolte E, Flik G, *et al.* CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [ J ]. *Development & Comparative Immunology*, 2003, 27(10) : 875 - 888.
- [ 17 ] Kurobe M, Yasuike T, Kimura I, *et al.* Expression profiling of immune-related genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells using cDNA microarrays [ J ]. *Development & Comparative Immunology*, 2005, 29(6) : 515 - 523.
- [ 18 ] Wu Z, Zhang W, Lu Y, *et al.* Transcriptome profiling of zebrafish infected with *Streptococcus suis* [ J ]. *Microbial Pathogenesis*, 2010, 48(5) : 178 - 187.
- [ 19 ] Meijer A H, Verbeek F J, Salas-Vidal E, *et al.* Transcriptome profiling of adult zebrafish at the late stage of chronic tuberculosis due to *Mycobacterium marinum* infection [ J ]. *Molecular Immunology*, 2005, 42(10) : 1185 - 1203.
- [ 20 ] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [ M ]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [ 21 ] Saeij J P, van Muiswinkel W B, Groeneveld A, *et al.* Immune modulation by fish kinetoplastid parasites; a role for nitric oxide [ J ]. *Parasitology*, 2002, 124(1) : 77 - 86.
- [ 22 ] Peatman E, Terhune J, Baoprasertkul P, *et al.* Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri* [ J ]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(2) : 553 - 566.
- [ 23 ] Rojo I, de Iarduya O M, Estonba A, *et al.* Innate immune gene expression in individual zebrafish after *Listonella anguillarum* inoculation [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(6) : 1285 - 1293.
- [ 24 ] Ordas A, Hegedus Z, Henkel C V, *et al.* Deep sequencing of the innate immune transcriptomic response of zebrafish embryos to *Salmonella* infection [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(5) : 716 - 724.
- [ 25 ] Hegedus Z, Zakrzewska A, Agoston V C, *et al.* Deep sequencing of the zebrafish transcriptome response to mycobacterium infection [ J ]. *Molecular Immunology*, 2009, 46(15) : 2918 - 2930.
- [ 26 ] Sar A M, Spaink H P, Zakrzewska A, *et al.* Specificity of the zebrafish host transcriptome response to acute and chronic mycobacterial infection and the role of innate and adaptive immune components [ J ]. *Molecular Immunology*, 2009, 46(11-12) : 2317 - 2332.

## Differential expression of immune-related genes from skin of zebrafish induced by the infection of *Citrobacter freundii*

LÜ Ai-jun<sup>1\*</sup>, HU Xiu-cai<sup>2</sup>, ZHU Jing-rong<sup>1</sup>, XUE Jun<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>1</sup>, CHENG Chao<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China;

2. Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plants, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116 China)

**Abstract:** With water pollution aggravated and intensive aquaculture spread, the occurrence of opportunistic infections has become a significant health problem in farmed fish. *Citrobacter freundii* is an enterobacterium commonly isolated from diseased and healthy animals, including human, mammals and fish, which is considered to be an opportunistic pathogen. Skin is an essential protective barrier for fish and functions as a first line of defense against invading pathogens, but its molecular mechanism remains unclear. The objective of this study is to screen the differential gene expression in response to pathogen infection in skin of fish, and provide a basis for understanding the fish skin immune mechanism to the pathogen at the molecular level. Here, a strain of bacteria was isolated from intestine in *Ctenopharyngodon idellus*, which was identified by using the morphological observation, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA sequence analysis. The results showed that the isolated strain was identified species levels as *Citrobacter freundii*, and animal tests showed that the strain was lethal to zebrafish. Immune response in skin of fish analyzed by using *Citrobacter freundii* induced zebrafish as a model, which applied the Affymetrix zebrafish cDNA microarray hybridized to the skin tissues. Total RNAs were isolated from the skin tissues of the zebrafish and labeled with biotin, and hybridized to zebrafish cDNA gene chips. The expression profiles from the hybridization to 15617 genes in zebrafish cDNA array were analyzed by the GeneChip Operating Software (GCOS 1.4). Out of 15617 genes in zebrafish cDNA chips, total of 88 immune-related genes were identified to be significantly expressed in the skin tissues, of which 74 genes are up-regulated and 14 are down-regulated in the zebrafish skin tissues. Furthermore, the differential expression genes could be categorized into eight functional groups by using the Gene Ontology (GO) method, including complement activation, acute phase response, defense immune response, platelet activation, coagulation factors, response to stress and stimulus, apoptosis, antigen processing and presentation, cell adhesion and migration, etc. In addition, the analysis of the pathways showed that the MAPK (*hsp70*, *daxx*, *nfkbiab*), JAK/STAT (*ifn1*), and TGF- $\beta$  (*thbs1*) signaling pathways may be involved in the immune responses of skin in fish. The Affymetrix zebrafish cDNA microarray is useful for identifying the functional genes involved in the skin immune defense of fish, and future functional analysis of these genes may contribute to understanding the mechanisms of skin immune responses and offer a scientific reference for the *Citrobacter*-zebrafish model of bacterial pathogenesis.

**Key words:** *Citrobacter freundii*; zebrafish; skin; immune-related gene expression; cDNA microarray

**Corresponding author:** LÜ Ai-jun. E-mail: lajand@126.com