

# 鳗鲡爱德华氏菌对美洲鳗鲡的致病性 与宿主抗感染相关基因的表达

王岳<sup>1,2</sup>, 翟少伟<sup>1,2</sup>, 万绮娟<sup>1,2</sup>, 许明<sup>1,2</sup>, 陈敏霞<sup>1,2</sup>, 郭松林<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 采用  $1.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^8$  cfu/mL 的鳗鲡爱德华氏菌感染美洲鳗鲡以确定其半数致死量 ( $LD_{50}$ ), 然后采用略低于  $LD_{50}$  的菌浓度 ( $3.3 \times 10^6$  cfu/尾) 感染鳗鲡, 并于感染后 12、24、36、48、60、72 h 等 6 个时间点检测鳗鲡肝脏、肾脏和血液的载菌量, 同时观察感染后 36、60 h 鳗鲡肝脏、肾脏和脾脏的病理变化。此外, 采用 qRT-PCR 方法探究感染前和感染后 12、36、60 h 等 4 个时间点细菌外膜蛋白 A (*OmpA*) 和宿主抗鳗鲡爱德华氏菌感染的 16 个免疫相关基因表达。结果表明: 感染鳗鲡爱德华氏菌后, 美洲鳗鲡的  $LD_{50}$  为  $2.5 \times 10^5$  cfu/g ( $5.0 \times 10^6$  cfu/尾); 美洲鳗鲡肾脏的载菌量于感染后 36、48、60 h 均显著高于在肝脏和血液中的载菌量, 且感染后 36 h 菌浓度在肾脏和血液中均达到峰值, 而在肝脏中的峰值则为感染后 72 h。感染后 36 h 鳗鲡肝脏血管充血, 肾小球萎缩且肾小管上皮细胞脱落, 脾脏血管内形成血栓; 感染后 60 h 肝血管出现血栓且部分肝细胞坏死, 肾小管上皮细胞空泡变性并脱落入肾小管管腔, 脾脏出现大量因细菌感染而导致的坏死性结节。与感染前相比, 感染后 12 h 细菌 *OmpA* 基因在肝脏的表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 升高; 感染后 *OmpA* 基因在脾脏的表达量先下降后急剧上升, 在肾脏的表达量则先上升后下降再上升。鳗鲡抗爱德华氏菌感染的 5 个免疫球蛋白相关的基因, 在肝脏和肾脏不同时间点的表达量均无明显差异, 而感染后早期在脾脏的表达量显著高于晚期; 感染后 3 个肿瘤坏死因子相关基因在早期的表达量相对较高; 此外, 感染后 12 h 多个免疫相关基因表达量显著上升。

**[关键词]** 美洲鳗鲡; 鳗鲡爱德华氏菌; 半数致死量 ( $LD_{50}$ ); 载菌量; 病理变化

**[中图分类号]** S 942.5

## Pathogenicity of *Edwardsiella anguillarum* to American Eels (*Anguilla rostrata*) and the Expression of Host Anti-*E. anguillarum* Infection Related Genes

WANG Yue<sup>1,2</sup>, ZHAI Shaowei<sup>1,2</sup>, WAN Qijuan<sup>1,2</sup>, XU Ming<sup>1,2</sup>, CHEN Minxia<sup>1,2</sup>, GUO Songlin<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Engineering Research Centre of Eel Modern Technical Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In this study, American eels were infected with  $1.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^8$  cfu/mL of *E. anguillarum* to determine the  $LD_{50}$  of *E. anguillarum* to American eels. Additionally, American eels with an average body weight of 20 g were injected with  $3.3 \times 10^6$  cfu/fish of *E. anguillarum* to assess the bacterial load in the liver, kidney and blood at 6 time points of 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours post infection. Furthermore, the pathological changes of liver, kidney and spleen of eels were observed 36 h and 60 h after the infection.

**[收稿日期]** 2022-11-30

**[基金项目]** 福建省自然科学基金项目 (2022J01326); 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-46)

**[作者简介]** 第一作者: 王岳, 从事水产动物医学研究。通信作者: 郭松林, 教授, 从事鱼类病害与免疫防治研究。E-mail: gsl@jmu.edu.cn

The mRNA expression of the outer membrane protein A (*OmpA*) of the pathogen and 16 anti-infection related proteins of the host was also detected at 4 time points: before infection, and at 12, 36 and 60 h post-infection, using the qRT-PCR method. The results showed that the LD<sub>50</sub> of *E. anguillarum* to American eels was  $2.5 \times 10^5$  cfu/g body weight (equivalent to  $5.0 \times 10^6$  cfu/fish). The plate colony count results demonstrated that the bacterial load in the kidney of American eel was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that in the liver and blood at 36, 48 and 60 h post-infection. The bacterial load in the kidney and blood peaked at 36 h, while in the liver, it peaked at 72 h post-infection. Pathological observations revealed congestion in liver vessels and atrophy of glomeruli at 36 hours post-infection. Exfoliation of the epithelial cells in renal tubules and thrombosis formation in spleen vessels were also observed. At 60 hours post-infection, hepatic blood vessels showed thrombosis and necrosis of hepatocytes, while the epithelial cells of renal tubules became vacuolar, degenerated, and fell into the lumen of the tubules. Moreover, a significant number of necrotic nodules caused by bacterial infection were seen in the spleen. Comparison of gene expression levels at different time points revealed that the expression of the *OmpA* gene in the liver increased significantly ( $P < 0.05$ ) at 12 hours post-infection. In the spleen, *OmpA* expression decreased initially and then sharply increased, while in the kidney, it displayed an initial increase, followed by a decrease, and eventually another increase. The expression of 16 immune-related genes in response to *E. anguillarum* infection demonstrated that the expression levels of 5 immunoglobulin-related genes in the spleen were significantly higher ( $P < 0.05$ ) at the early stage of infection compared to the later stage. However, no significant differences were found in the liver and kidney at different time points. Additionally, the expression of 3 tumor necrosis factor-related genes was relatively high at the early stage of infection. Some immune-related genes also exhibited higher expression levels at 12 hours post-infection compared to other time points.

**Keywords:** *Anguilla rostrata*; *Edwardsiella anguillarum*; median lethal dose (LD<sub>50</sub>); bacterial load; pathological changes

## 0 引言

爱德华氏菌病是鱼类养殖中最常见的细菌性疾病之一<sup>[1]</sup>, 该疾病是由爱德华氏菌属细菌引起的<sup>[2]</sup>。爱德华氏菌为革兰氏阴性、杆状的兼性厌氧菌, 属肠杆菌科<sup>[3]</sup>。该菌在水生环境中大量存在, 可在应激鱼类中导致严重感染<sup>[4]</sup>, 在高温和恶劣水生条件下的水产养殖中则更为常见<sup>[5]</sup>。该菌感染后可通过急性或慢性途径发生系统性感染, 其发病原因涉及多种毒力机制, 包括生物膜形成, 对吞噬细胞介导杀伤的抵抗, 以及溶血素、蛋白酶、过氧化氢酶、皮肤毒素和多种类型的毒力分泌系统<sup>[6-7]</sup>。该菌感染后可在包括巨噬细胞<sup>[8-9]</sup>的宿主细胞内存活并繁殖。受感染的鱼常表现为出血性败血症、异常游泳行为、突眼、溃疡和腹水<sup>[10]</sup>。

感染鳊鱼的爱德华氏菌病由一种新命名的鳊鱼爱德华氏菌 (*Edwardsiella anguillarum*) 引起, 易感动物为日本鳊鱼 (*Anguilla japonica*) 和欧洲鳊鱼 (*Anguilla anguilla*), 鳊鱼疫情主要发生于炎热的夏季<sup>[11]</sup>。患鳊鱼爱德华氏菌病的鳊鱼死亡率历来高居不下。该病的主要表现是肝脏肿大、发蓝、发暗, 严重的病例会出现溃疡性肝脏受累, 可导致大量死亡<sup>[12]</sup>。在幼年和成年患该病的鳊鱼中, 可以观察到肝脏和肾脏增大, 胸鳍、腹鳍和背鳍增大, 后期肝脏溃疡, 消化道充满粘液, 肛门红肿和突起。近 10 年来, 由于日本鳊苗和欧洲鳊苗价格不断上升, 美洲鳊鱼的集约化养殖面积不断提高, 据报道, 鳊鱼爱德华氏菌主要感染日本鳊鱼和欧洲鳊鱼, 但其对美洲鳊鱼的致病性尚不清楚。

本研究拟采用鳊鱼爱德华氏菌感染美洲鳊鱼以测定鳊鱼半数致死量和主要组织脏器的载菌量, 同时检测鳊鱼肝脏、肾脏和脾脏的主要病理变化和宿主的抗感染相关基因表达, 从而为该菌对美洲鳊鱼的致病性和美洲鳊鱼抗细菌感染的病原-宿主相互作用研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细菌与美洲鳎

鳎爱德华氏菌分离自日本鳎的肝脏, 由本实验室鉴定。从福建福清某养殖场购买 152 尾健康美洲鳎, 平均体重 20 g, 暂养于实验室的水族箱 (25 尾/箱) 中, 暂养 14 d 后进行试验。养殖条件: 水温 26 ~ 28 ℃, 氧气泵保持连续充气, 每天投喂并换水 1 次, 感染前 1 天及感染后禁食。52 尾鳎用于半数致死量的测定, 100 尾鳎用于感染试验。

1.2 鳎爱德华氏菌半数致死量的测定

鳎爱德华氏菌置于 LB 培养基中增殖 (28 ℃, 160 r/min, 18 h), 用 50 mL 离心管收集增殖后的菌液; 灭菌 PBS (pH = 7.4) 重悬菌体 (4℃, 5000 r/min 离心 5 min), 重复 2 次, 菌液调至 600 nm 下的 OD 值 ( $A_{600}$ ) 约为 0.7 (平板菌落计数的菌体浓度约为  $1.0 \times 10^9$  cfu/mL)。经预试验初步确定鳎爱德华氏菌对美洲鳎的毒力后, 采用梯度稀释法制备  $2.0 \times 10^8$ 、 $3.3 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^7$  cfu/mL 的鳎爱德华氏菌悬液。每个梯度的菌悬液腹腔注射 13 尾鳎 (0.1 mL/尾), 对照组鳎注射 0.1 mL 的 PBS。连续 14 d 观察鱼的发病与死亡结果, 采用 Reed-Muench 方法计算鳎半数致死量 LD<sub>50</sub> 的值。

1.3 鳎感染与样品采集

感染组和 PBS 对照组各取 50 尾鳎。感染组每尾鳎腹腔注射  $6.6 \times 10^7$  cfu/mL 菌液 0.1 mL, 对照组每尾注射 PBS 0.1 mL。感染后第 12、24、36、48、60、72 小时采样, 每次采集 5 尾鳎的肝脏、肾脏、脾脏组织和抗凝血。每尾鳎取 0.1 mL 抗凝血、0.1 g 肝脏和 0.1 g 肾脏 (脾脏因小于 0.1 g 而未采用)。抗凝血经 PBS 稀释后取 0.1 mL 涂布平板; 肝脏和肾脏组织加入 10 倍的 PBS 后于研磨仪中匀浆 5 min, 匀浆液经不同梯度稀释后涂布平板, 感染后 18 ~ 24 h 计数平板菌落结果。剩余的肝脏、肾脏和整个脾脏均分为两半, 一半固定于 10% 的中性福尔马林液, 另一半经 PBS 缓冲液润洗后置于 RNA 保护液中, -70℃ 保存备用。

1.4 病理切片的制作与观察

将经 10% 的中性福尔马林固定的肝脏、肾脏和脾脏组织, 先用梯度酒精脱水后, 再用二甲苯透蜡后包埋 5 ~ 7  $\mu$ L, 切片后用 H&E 染色, 染色良好的切片经脱水透明后封片。采用莱卡显微镜观察, 拍照并注明 3 个组织的主要病理变化。

1.5 总 RNA 的提取与 cDNA 样本的制备

采用 Promega RNA 试剂盒方法提取美洲鳎感染早 (感染后 12 h)、中 (感染后 36 h)、晚期 (感染后 60 h) 的肝脏、肾脏和脾脏样品, 参考试剂盒方法提取其总 RNA。RNA 样品用 Nanodrop 2000 型分光光度计检测其浓度及纯度 ( $A_{260}/A_{280}$  值在 1.9 ~ 2.1 之间), 用琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的完整性后进行逆转录合成 cDNA, cDNA 保存于 -70℃。

1.6 qRT-PCR 定量分析

采用 Primer3 Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>) 设计 18 个基因的引物 (见表 1), 以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 以 qRT-PCR 荧光定量分析方法检测鳎爱德华氏菌的 *OmpA* 基因和 16 个宿主免疫相关基因的表达水平。qRT-PCR 样本检测步骤如下: 将 cDNA 样品用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 100 倍, 分别配置 qRT-PCR 反应体系 (2  $\times$  M5 HiPer SYBR Premix Es Taq, 5  $\mu$ L; 10 mmol/L Primer F, 0.25  $\mu$ L; 10 mmol/L Primer R, 0.25  $\mu$ L; cDNA, 4.5  $\mu$ L); 轻弹管底混合溶液, 短暂离心后按上述体系将混合液加至 384 孔的 PCR 板, 每个样品 2 孔平行, 轻轻粘上 Sealing Film 封口膜并短暂离心混合; 将上述 384-PCR 板置于 RealTime PCR 仪上进行 PCR 反应。

1.7 统计学分析

菌落数  $D$  (cfu/mg) 采用常用对数 ( $\lg D$ ) 处理后进行统计学分析。用 SPSS Statistics 22.0 中的独立二样本  $t$  检验比较脏器间载菌量的差异显著性, 以数据的平均值  $\pm$  平均标准误差 (mean  $\pm$  SEM) 为依据, 利用软件 Origin 2017 作图, 各组别之间的差异显著性用不同的符号标注。荧光定量获得的

数据采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法处理后，用  $F$  检验和 LSD 法进行差异显著性分析，将 PBS 组在该时间点的 3 个脏器中的基因平均表达水平标准化为 1.0，从而确定感染后 3 个时间点待测基因在 3 个脏器中的相对表达水平。采用不同字母标记特定基因在同一时间点的不同脏器之间表达水平的差异显著性。

表 1 qRT-PCR 扩增的基因和所用引物  
Tab.1 qRT-PCR amplified genes and primers

基因名称	基因描述	引物序列 (5' -3')
$\beta$ -actin	内参基因	F-AATCCACGAGACCACCTTCAA R-GTTGGCGTACAGGTCCTTACG
<i>OmpA</i>	鳎鲷爱德华氏菌 outer membrane protein A	F-ACCAAGCGTTTCACCCGTGAA R-GTTGTACTGCTCGGAACCGA
<i>LOC118233506</i>	免疫球蛋白 K 链可变区 K29-213	F-CCAGCAGCTCAGTCAGTTCA R-ATCCCAGACTGGCGAGTAGT
<i>LOC118220471</i>	免疫球蛋白重链可变区 914 样区 e	F-TGTCAGGTTTCTGGGTACGC R-TGTTGCTGCTGTCTCTGGAG
<i>LOC118234190</i>	免疫球蛋白入链多肽 1	F-CCTGACTCAGGCTCCAACAG R-ATCCCAGACTGGCGAGTAGT
<i>LOC118233501</i>	免疫球蛋白 K 链可变区 III	F-CCAGCAGCTCAGTCAGTTCA R-ATCCCAGACTGGCGAGTAGT
<i>LOC118220473</i>	免疫球蛋白重链可变区 914	F-TGTCAGGTTTCTGGGTACGC R-AGATGGTGAACCGGCTCTTG
<i>tnfa</i>	肿瘤坏死因子 $\alpha$	F-CCAGACCAGAGCCAAGAAGG R-AGGTATGGCCCGTGTCTTTG
<i>traf1</i>	肿瘤坏死因子相关受体因子 1	F-TCTCCCAGTCCTACCTGCTC R-GCACTGCTGTCTTTTCGTGG
<i>LOC118221178</i>	肿瘤坏死因子受体超家族成员 5	F-ATGCCAGACCAAGACAGACG R-TTCCTTCTGGACACCGTTCCG
<i>tfpi2</i>	组织因子途径抑制因子 2	F-CCAGTTGCCTGCATGGAGTA R-ATCTGTGCAAGTTCCCTCTCG
<i>gk5</i>	糖激酶 5	F-ACTTCATCAGCTGGCAGGAC R-TAACGTGCTGGGTGGAGAAC
<i>LOC118219624</i>	粘附 G 蛋白伴侣受体 E5 (CD97)	F-GAGACCCCCAATATCTGCGG R-AAAACTCTCTGGCCGTTGCT
<i>f8</i>	凝血因子 VIII, 前凝血因子	F-TACTCTTCGCCTGGAGCTCT R-AGTTCAAACGGGCCAGAGAG
<i>tlr1</i>	Toll 样受体 1	F-CCAGTACCTCATCCCTCCA R-GCACTGCTGTCTTTTCGTGG
<i>c1qa</i>	补体成分 1, $\alpha$ 链 q 亚基	F-CCAGGATACATGCCGGGTAC R-ATCCCCTGTCTCCTCCATCC
<i>hp</i>	结合球蛋白	F-GCTCCTTGCCTTTTGTGTGG R-AACGCTGTCCGAATACTGCA
<i>ccn4a</i>	细胞信息网络因子 4 $\alpha$	F-TCTCCAACGACAACGACCAG R-GCAGCCTGAGATGGTGAAGT

2 结果

2.1 鳎鲷爱德华氏菌对美洲鳎鲷的半数致死量

观察 14 d 内鳎鲷的累计死亡率，发现：对照组未见鳎鲷死亡；高浓度菌液可导致鳎鲷的急性死亡；而处较低浓度菌液中的鳎鲷死亡时间延后（见图 1）。采用感染后不同浓度细菌导致的鳎鲷死亡情况计算其 LD<sub>50</sub>，结果表明在该菌影响下美洲鳎鲷的 LD<sub>50</sub> 为 2.5 × 10<sup>5</sup> cfu/g（见表 2）。



表2 鳎鲷爱德华氏菌人工感染试验  
Tab.2 Artificial infection test of *E. anguillarum*

注射菌液浓度/ (cfu · mL <sup>-1</sup> )	注射尾数	实验鱼死亡数量	死亡率/%	半数致死量 LD <sub>50</sub> /(cfu · g <sup>-1</sup> )
2.0 × 10 <sup>8</sup>	13	10	77	2.5 × 10 <sup>5</sup>
3.3 × 10 <sup>7</sup>	13	6	46	
1.0 × 10 <sup>7</sup>	13	2	15	

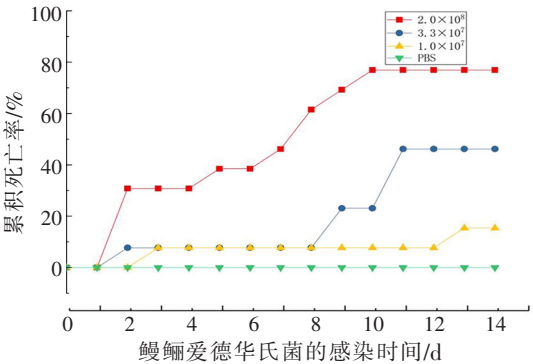
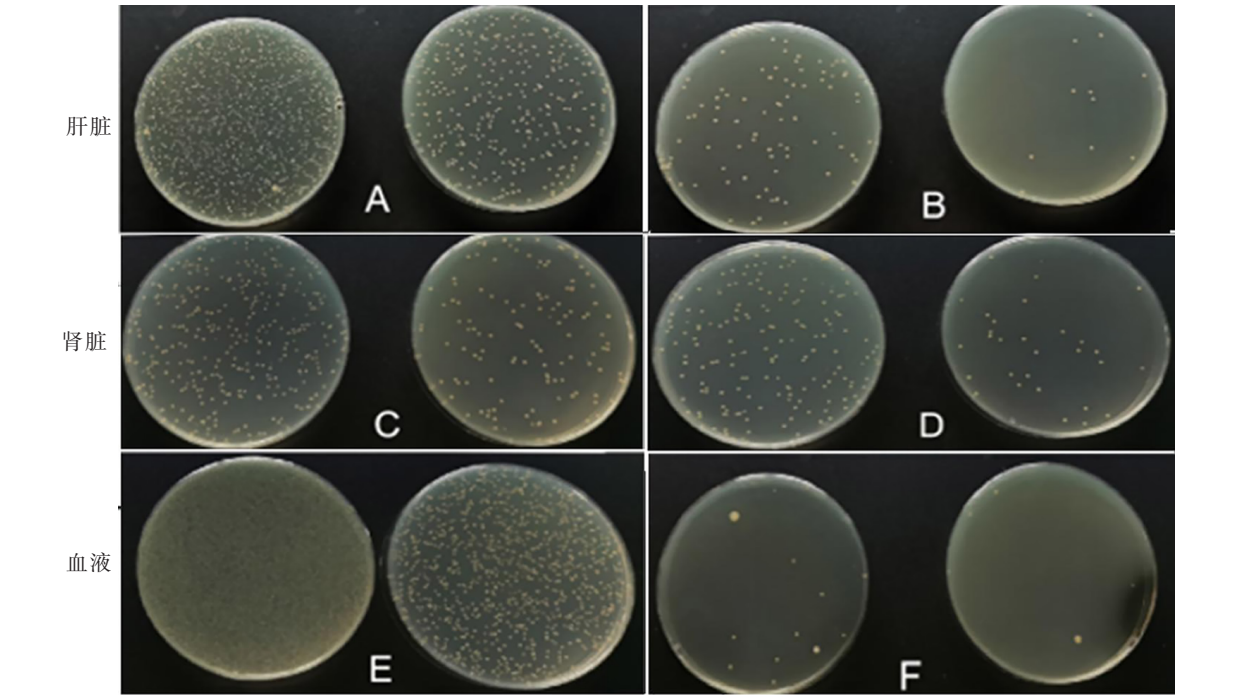


图1 人工感染鳎鲷爱德华氏菌后 14 d 内鳎鲷的累积死亡率

Fig.1 Cumulative mortality of eels in 14 days post the infection of *E. anguillarum*

2.2 感染鳎鲷爱德华氏菌后鳎鲷肝脏、肾脏和血液的载菌量

图2 是感染鳎鲷爱德华氏菌 72 h 后用部分样本涂布平板的细菌生长情况。从图 2 可知，鳎鲷爱德华氏菌在肝脏（图 2A，2B）和肾脏（图 2C，2D）的平均载菌量明显高于血液（图 2E，2F），但存在一定的个体差异；相比而言，4 个血液样本中的细菌含量差异很大。



A—样本 1 鳎鲷肝脏平板，左边 100 倍稀释，右边 1000 倍稀释；B—样本 2 鳎鲷肝脏平板，左边 100 倍稀释，右边 1000 倍稀释；C—样本 1 鳎鲷肾脏平板，左边 100 倍稀释，右边 1000 倍稀释；D—样本 2 鳎鲷肾脏平板，左边 100 倍稀释，右边 1000 倍稀释；E—稀释 100 倍后鳎鲷血液平板，左边样本 1，右边样本 2；F—稀释 100 倍后鳎鲷血液平板，左边样本 3，右边样本 4

图2 感染鳎鲷爱德华氏菌 72 h 后部分鳎鲷样本中肝、肾和血液中的细菌平板菌落计数结果

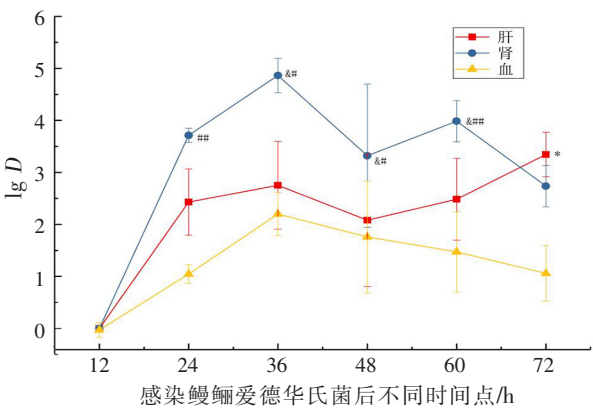
Fig. 2 The plate colony count in liver, kidney and blood of eels 72 hours post-infection of *E. anguillarum*

将平板菌落计数结果进行常用对数转化后，对感染鳎鲷爱德华氏菌后鳎鲷肝脏、肾脏和血液中 6 个时间点的载菌量进行了比较（见图 3）。由图 3 可见：肾脏中的载菌量普遍高于肝脏，且在感染后 36 ~ 60 h 这段时间达到显著差异（ $P < 0.05$ ）；血液中的平均载菌量在 6 个时间点内均低于肝脏和肾脏，且在感染后 24 ~ 60 h 这段时间均显著（ $P < 0.05$ ）或极显著（ $P < 0.01$ ）低于肾脏，而感染后

72 h则显著低于肝脏；肾脏和血液的载菌量于感染后 36 h 达到峰值，而感染后 72 h 则在肝脏达到峰值。

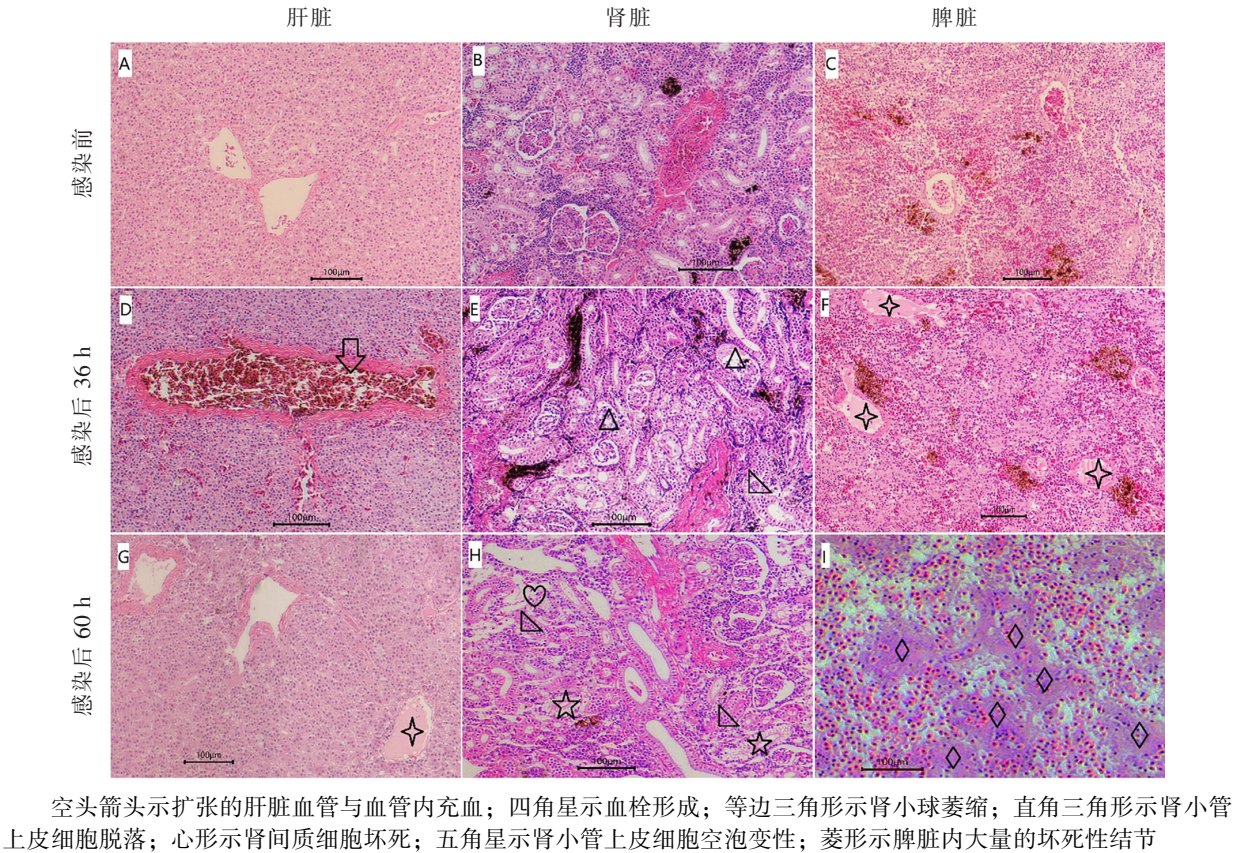
2.3 感染鳎爱德氏菌后鳎肝脏、肾脏和脾脏的组织病理变化

美洲鳎肝脏血管，感染前大小正常，血管内有少量的红细胞（见图 4A）；感染后 36 h，血管扩张，血管内充血，大量红细胞滞流于血管内，部分红细胞因血管通透性增加而流入肝细胞中（见图 4D）；感染后 60 h，可见血管内形成血栓，部分肝细胞坏死缺失（见图 4G）。美洲鳎肾小球和肾小管，感染前正常，偶见肾脏内红色血窦和深褐色坏死细胞或异物吞噬中心（见图 4B）；感染后 36 h，肾小球萎缩，肾小管上皮细胞脱落，深褐色坏死细胞或异物吞噬中心明显增多（见图 4E）；感染后 60 h，肾小管上皮细胞空泡变性、脱落且管腔消失，肾间质增宽，部分间质细胞坏死（见图 4H）。美洲鳎脾脏，感染前红白髓相间，脾脏血管内红细胞正常，可见褐色的淋巴细胞生发中心（见图 4C）；感染后 36 h，脾脏红髓增多，白髓减少，血管内形成血栓（见图 4F）；感染后 60 h，出现大量因细菌感染而导致的坏死性结节，结节之间充满红细胞（见图 4I）。



\*—肾脏与肝脏间载菌量差异显著( $P<0.05$ )；#、##—肾脏与血液间载菌量差异显著( $P<0.05$ )与极显著( $P<0.01$ )；&—肝脏与血液间载菌量差异显著( $P<0.05$ )

图 3 感染鳎爱德氏菌后不同时间点鳎肝脏、肾脏和血液的载菌量(mean ± SEM; n=5)  
Fig.3 Bacterial load in liver, kidney and blood at different time points post the infection of *E.anguillarum* to eels (mean±SEM; n=5)



空箭头示扩张的肝脏血管与血管内充血；四角星示血栓形成；等边三角形示肾小球萎缩；直角三角形示肾小管上皮细胞脱落；心形示肾间质细胞坏死；五角星示肾小管上皮细胞空泡变性；菱形示脾脏内大量的坏死性结节

图 4 鳎爱德氏菌感染前后的美洲鳎组织病理变化  
Fig.4 American eels pathological changes of pre-infection and post-infection of *E. anguillarum*



2.4 鳎爱德华氏菌外膜蛋白 A 基因在鳎肝脏、脾脏和肾脏的表达

感染鳎爱德华氏菌后, 通过其外膜蛋白 A (*OmpA*) 基因的 mRNA 表达水平可初步推断该菌在鳎体内的侵袭力。与感染前相比, 感染后 12 h *OmpA* 基因在肝脏的表达水平显著 ( $P < 0.05$ ) 上升, 但在 36 h 和 60 h 时间点略有下降; 尽管 *OmpA* 基因在脾脏和肾脏的平均表达水平在感染后不同时间点稳定升高, 但由于个体差异很大而未达到显著性 (见图 5a)。

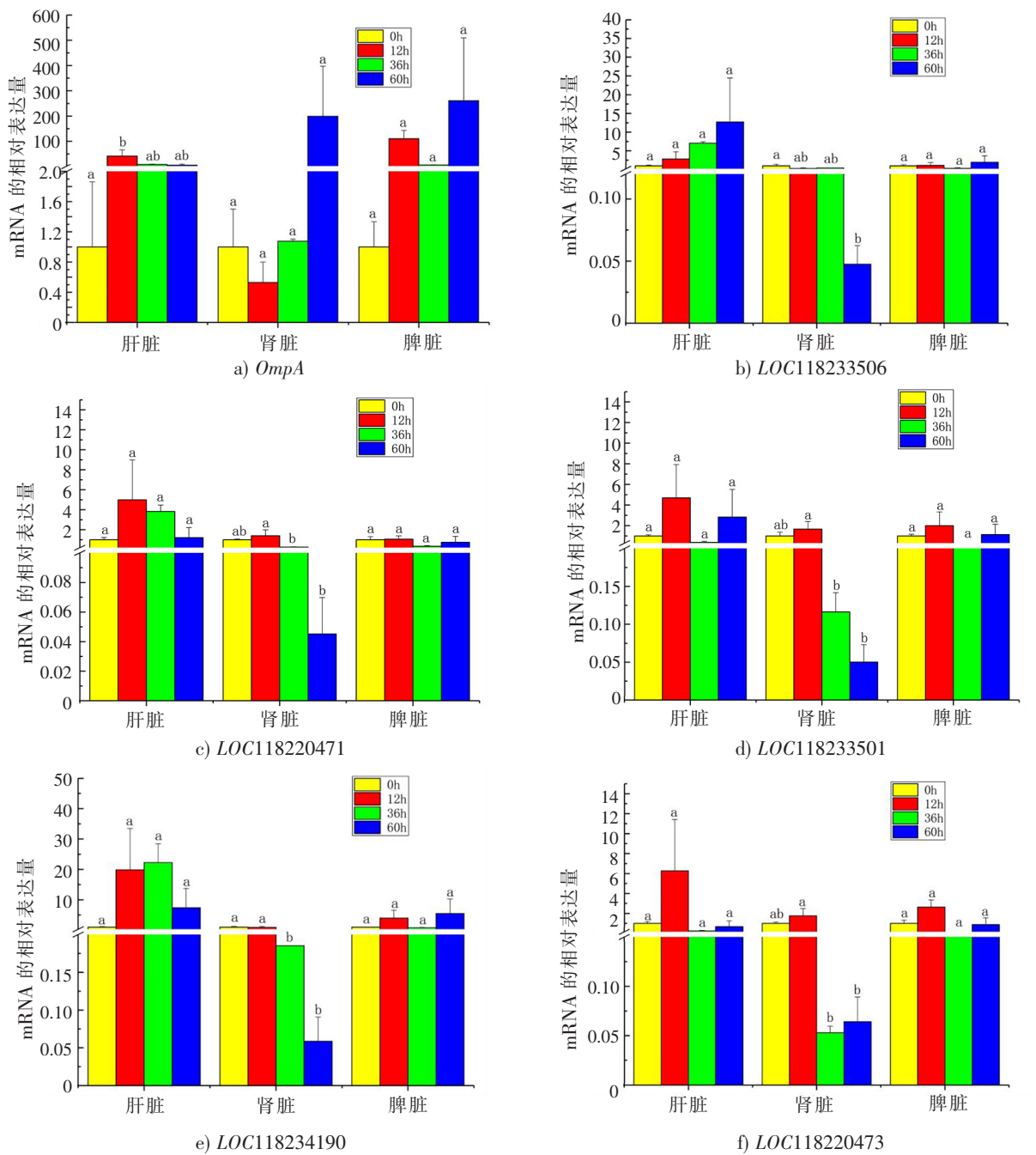


图5 感染鳎爱德华氏菌前后 *OmpA* 和宿主 5 种免疫球蛋白相关基因在鳎肝、脾、肾中的表达 (mean+SEM; n=3)  
Fig.5 Expression of *OmpA* and 5 immunoglobulin related genes in liver, spleen and kidney of eels pre and post the infection of *E. anguillarum* (mean+SEM; n=3)

2.5 感染鳎爱德华氏菌后鳎免疫球蛋白相关基因的表达

感染鳎爱德华氏菌后, *LOC118233506* 基因在肝脏的相对表达水平逐步上升, 在脾脏中表达水

平逐步下降,感染前表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 高于感染后 60 h 的表达量 (见图 5b); 感染后 *LOC118220471* 基因、*LOC118233501* 基因、*LOC118234190* 基因和 *LOC118220473* 基因在脾脏中 12 h 的表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 高于 36 h 和 60 h 的表达量 (见图 5c-f)。

2.6 感染鳎爱德华氏菌后鳎肿瘤坏死因子相关基因的表达

感染鳎爱德华氏菌后 12 h, *LOC118221178* 和 *traf1* 基因在的肝脏和脾脏相对表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 高于感染前, 且 *tnfa* 基因在肝脏、脾脏和肾脏的表达量均显著 ( $P < 0.05$ ) 高于其他 3 个时间点的表达量 (见图 6)。

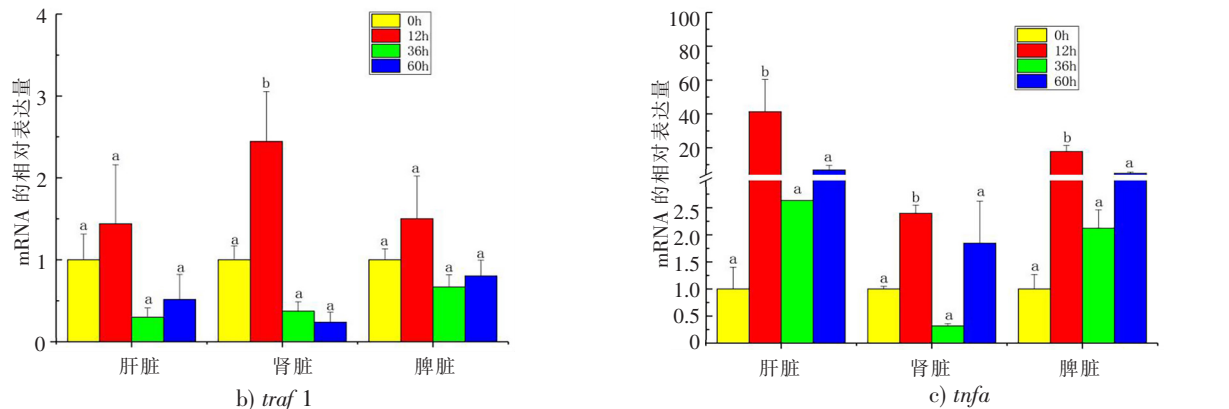
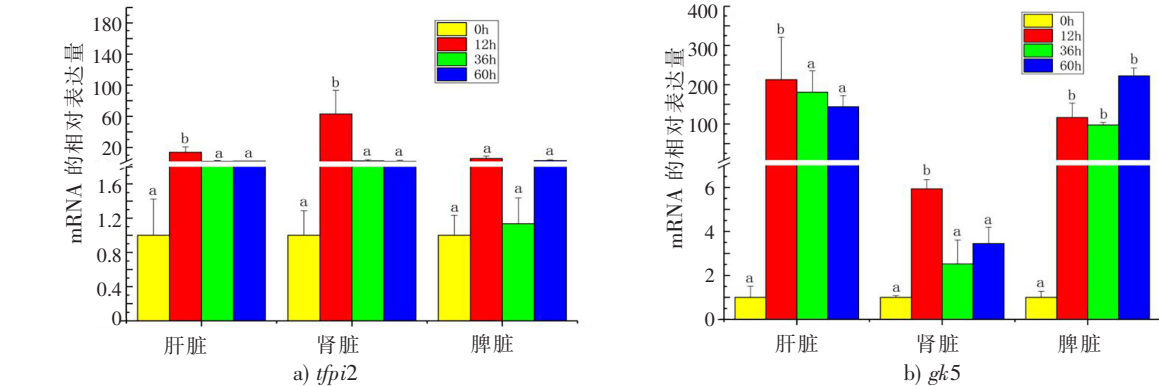


图 6 感染鳎爱德华氏菌后 3 种肿瘤坏死因子相关基因在肝、脾、肾中的表达量 (mean+SEM;  $n=3$ )

Fig.6 Expression of 3 tumor necrosis factor-related genes in liver, spleen and kidney of eels pre and post the infection of *E. anguillarum* (mean+SEM;  $n=3$ )

2.7 感染鳎爱德华氏菌后其他抗感染相关基因在鳎脏器的表达

鳎感染爱德华氏菌后 12 h, *tfpi2* 和 *gk5* 基因在肝脏和脾脏的表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 高于其他时间点, 且感染后各时间点 *gk5* 基因在肾脏中的表达量均显著 ( $P < 0.05$ ) 高于感染前; 感染后 12 h, *LOC118219624* 基因在脾脏和肾脏的表达量均显著 ( $P < 0.05$ ) 高于其他时间点, 且该时间点 *f8* 基因在 3 个脏器中的表达量也均显著 ( $P < 0.05$ ) 高于其他时间点; 感染前 *tlr1* 基因和 *c1qa* 基因在脾脏中的表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 高于感染后的 3 个时间点 (见图 7); 感染后 12 h 和 36 h 的肝脏和感染后 12 h 的肾脏中 *hp* 基因表达量均显著 ( $P < 0.05$ ) 高于感染前; 感染后 12 h, *ccn4a* 基因在肝脏的表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 高于感染前, 而在脾脏的表达量则显著 ( $P < 0.05$ ) 高于感染后 36 h 和 60 h, 感染后 12 h 和 60 h *ccn4a* 基因在肾脏的表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 高于感染后 24 h 和感染前。





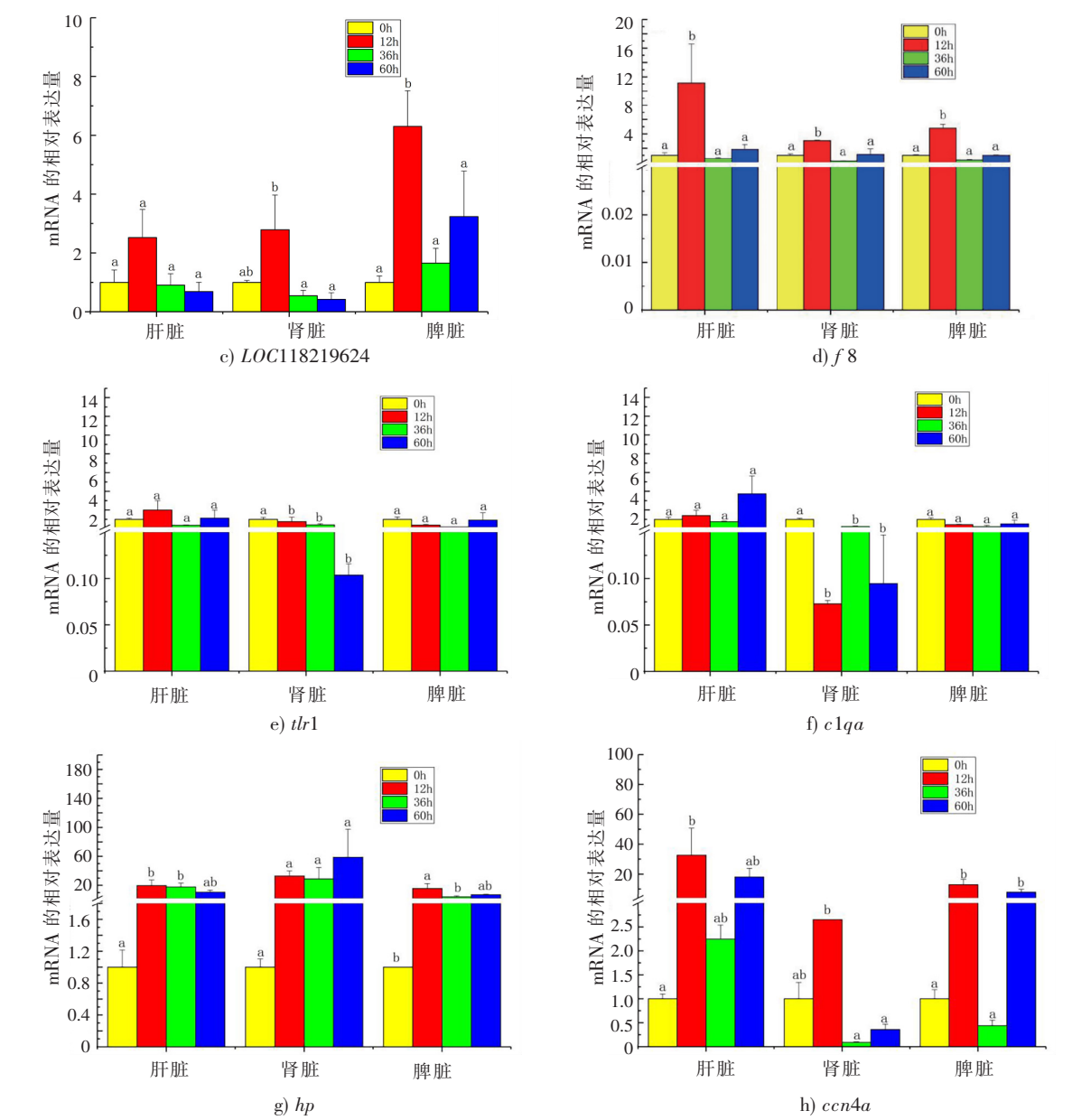


图 7 感染鳎鲷爱德华氏菌后 8 个抗感染相关基因在鳎鲷肝、脾、肾中的表达 (mean+SEM; n=3)  
Fig.7 Expression levels of 8 infection-related genes in liver, spleen and kidney of eels pre and post the infection of *E. anguillarum* (mean+SEM; n=3)

3 讨论

3.1 鳎鲷爱德华氏菌对美洲鳎鲷的半数致死量

通过 LD<sub>50</sub>的测定可初步推断病原菌对宿主的毒力大小。有研究表明，鳎鲷爱德华氏菌是日本鳎鲷和欧洲鳎鲷的主要致病菌<sup>[3,13-14]</sup>，其对日本鳎鲷和欧洲鳎鲷的半数致死量分别为 5.0 × 10<sup>4</sup> cfu/g 和 4.0 × 10<sup>5</sup> cfu/g<sup>[15]</sup>。本研究结果表明，该菌对美洲鳎鲷的半数致死量为 2.5 × 10<sup>5</sup> cfu/g，表明鳎鲷爱德华氏菌对美洲鳎鲷的毒力介于日本鳎鲷和欧洲鳎鲷之间。

3.2 美洲鳎鲷脏器的载菌量

本研究通过 3 个脏器的平板菌落计数，可直观检测细菌感染后不同时期，美洲鳎鲷主要脏器的载菌量。感染鳎鲷爱德华氏菌后 12 ~ 60 h，肾脏的载菌量高于肝脏，而血液中的载菌量最低，其中感染

后 36~60 h 肾脏中的载菌量显著高于肝脏 (见图 2、图 3)。文献 [16] 发现, 该菌感染欧洲鳎后 48 h 肝脏载菌量高于肾脏, 表明该菌感染美洲鳎与欧洲鳎后的菌量分布存在明显的差异。本研究通过 qRT-PCR 检测外膜蛋白基因的相对表达量, 以及比较平板菌落计数和 *OmpA* 的基因表达量可知, 尽管感染后 36 h 和 60 h 二者存在明显的相关性, 但感染后 12 h 细菌 *OmpA* 基因在鳎肝脏和肾脏中的表达量很高, 而菌落计数的结果却很低, 该结果有待于进一步研究阐明。

### 3.3 美洲鳎的组织病理变化

有研究表明, 鳎爱德华氏菌感染日本鳎后主要导致肝脏化脓性坏死<sup>[17]</sup>, 而感染欧洲鳎后则出现肝脏血栓和肝细胞坏死<sup>[18]</sup>。本研究发现, 鳎爱德华氏菌感染后 36 h, 鳎肝脏血管、肾小球、肾小管与脾脏血管均出现明显的病理变化, 且感染后 60 h 出现肝细胞、肾小管上皮细胞和脾脏组织的坏死 (见图 4)。文献 [25~26] 采集的是濒死或死亡鳎, 而本研究采集的是感染后外表尚未出现明显病理变化的鳎, 故本研究发现的病理变化主要是实质细胞的变化和坏死。

### 3.4 鳎抗菌相关基因的表达

免疫球蛋白是以 B 细胞分泌形式产生的抗体, 硬骨鱼免疫球蛋白存在 IgM、IgT 和 IgD 等 3 个类型, 每种蛋白均包含两个重链 (H 链) 和两个轻链 (L 链) 区, 免疫球蛋白序列的可变结构域由多个基因编码, 包括变量 (v) 基因、多样性 (d) 基因和连接 (J) 基因<sup>[19]</sup>。本研究选取了 5 个与免疫球蛋白功能紧密相关的多样性表达基因。例如, *LOC118234190* 为免疫球蛋白  $\lambda$  样多肽 1, 该肽由前 B 细胞表达并分泌<sup>[20]</sup>, 可将前 B 细胞转化为未成熟 B 淋巴细胞<sup>[21]</sup>。感染鳎爱德华氏菌后 12 h *LOC118234190* 基因在脾脏中的表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 高于 36 h 和 60 h 的表达量, 表明 *LOC118234190* 基因表达的蛋白可在鳎爱德华氏菌感染早期将前 B 细胞转化为未成熟 B 淋巴细胞, 从而为成熟 B 细胞和免疫球蛋白的产生创造条件<sup>[22]</sup>。

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 是一种具有多种生物学活性的细胞因子, 由病原菌激活的免疫细胞和巨噬细胞产生, 主要包括  $\text{TNF}\alpha$  和  $\text{TNF}\beta$ <sup>[23]</sup>。 $\text{TNF}\alpha$  在总 TNF 的生物学活性中占 70%~95%, 正常水平的  $\text{TNF}\alpha$  可以参与抵抗细菌、病毒和寄生虫的感染, 促进组织修复, 引起肿瘤细胞凋亡, 而  $\text{TNF}\alpha$  在体内的大量产生和释放会破坏机体的免疫平衡, 引发多种疾病<sup>[24]</sup>。本研究发现鳎爱德华氏菌感染后 12 h *tnfa* 基因在肝脏、脾脏和肾脏中的表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 高于其他时间点, 由此导致的  $\text{TNF}\alpha$  蛋白升高很可能协助鳎杀灭细菌并保护自身细胞免受感染。TRAF1 为肿瘤坏死因子受体 1, 可抑制  $\text{TNF}\alpha$  介导的细胞凋亡<sup>[25]</sup>。在本研究中, 鳎爱德华氏菌感染后 12 h *traf1* 在脾脏、肝脏和肾脏的表达量明显上调, 可抑制过高表达的  $\text{TNF}\alpha$  蛋白导致的自身细胞损伤。*LOC118221178* 是肿瘤坏死因子受体超家族成员 5, 主要参与炎症和免疫调节作用<sup>[26]</sup>, 鳎爱德华氏菌感染后 12 h, 肝脏和脾脏中该基因的表达量均显著上调, 且 3 个脏器感染后的表达量均高于感染前, 表明感染后鳎全身性免疫调节功能增强。

蛋白 TFPI2 为组织因子途径抑制物 2, 具有凝血、细胞迁移和抑制细胞凋亡等功能<sup>[27]</sup>。本研究发现, 鳎爱德华氏菌感染后 12 h, *tspi2* 基因在肝脏和脾脏的表达量显著升高, 表明该时期鳎的肝脏和脾脏很可能出现了凝血症状, 从而激发了 *tspi2* 的抗凝血作用, 推迟了血栓形成的过程。病理组织切片观察结果发现, 感染后 36 h 的脾脏和感染后 60 h 的肝脏中血管出现血栓 (见图 4), 即充分佐证了这一点。GK5 的全文为甘油激酶 5, 其功能包括抑制细胞凋亡与癌变<sup>[28]</sup>。本研究发现, 鳎爱德华氏菌感染后 12 h, *gk5* 基因的表达量在肝脏和脾脏中显著升高, 且感染后 3 个时间点在肾脏的表达量均显著高于感染前, 表明该蛋白在抑制细菌感染导致的宿主细胞自身损伤与凋亡中起重要作用。本研究发现感染后 60 h 部分肝细胞和大量脾细胞均出现明显坏死, 而肾脏细胞坏死却不明显, 这与感染后 60 h *gk5* 基因在肾脏中仍然高表达有密切的关系。基因 *LOC118219624* 表达的蛋白为粘附 G 蛋白偶联受体 E5, 也称为 CD97 分子, 主要参与脾脏等淋巴细胞的抗原捕获<sup>[29]</sup>。基因 *f8* 可表达凝血因子 VIII 参与血液凝固过程<sup>[30]</sup>。鳎爱德华氏菌感染后 12 h 基因 *LOC118219624* 和 *f8* 在肝脏、脾脏和肾

脏中的表达量均显著升高,其后均出现明显的下降,表明早期宿主可通过抗原捕获与凝血过程阻止鳗鲡爱德华氏菌的入侵,但这种抗感染防线在感染后期很可能被细菌突破,感染后 12 h 肝脏和肾脏平板菌落计数极低的结果充分说明了这一点。

基因 *tlr1* 表达的 Toll 样受体 1 是抗微生物感染的重要受体,可促进细胞因子的合成与释放,引发炎症反应,可启动机体先天免疫系统以协助机体清除病原体<sup>[31]</sup>。基因 *c1qa* 表达一种补体蛋白  $\alpha$  亚基,参与免疫应答和炎症反应<sup>[32]</sup>。本研究中,基因 *tlr1* 和 *c1qa* 感染前的表达量显著高于感染后的 3 个时间点,表明该菌感染后 60 h 内机体的先天性免疫以炎症反应为主,清除病原体的能力较弱,且感染后细菌平板菌落计数增加和脏器病理变化逐步加重也能说明这一点。基因 *hp* 表达一种结合珠蛋白,这是一种急性期应激蛋白,可通过抑制细菌活性减轻炎症反应和器官损伤,具有抑菌、免疫调节、减轻炎症反应等功能<sup>[33]</sup>。本研究的菌落计数结果显示感染后 12 h 肝脏和肾脏载菌量较低,而 qRT-PCR 检测结果表明该基因此时表达量较高,表明基因 *hp* 的表达产物有利于抵抗鳗鲡爱德华氏菌的侵袭。基因 *ccn4 $\alpha$*  表达一种细胞通讯因子 4 的  $\alpha$  亚基,该因子可抑制细胞生长以阻止细胞凋亡<sup>[34]</sup>。本研究中,感染后 12 h *ccn4 $\alpha$*  基因在 3 个脏器的表达量均显著高于感染前。鳗鲡爱德华氏菌感染初期可侵入巨噬细胞并抑制其凋亡<sup>[35]</sup>,这种抑制作用很可能与细胞通讯因子 4 的高表达量密切相关。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] JAYALAKSHMI S, VENUGOPALAN V K. Role of iron in the virulence of *Vibrio vulnificus* isolated from Cuddalore Coastal Waters (India) [J]. Indian J Med Res, 1992, 95: 294-296.
- [2] OH W T, JUN J W, KIM H J, et al. Characterization and pathological analysis of a virulent *Edwardsiella anguillarum* strain isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Korea [J]. Front Vet Sci, 2020, 7: 14.
- [3] SHAO S, LAI Q, LIU Q, et al. Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813(T) encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. [J]. Syst Appl Microbiol, 2015, 38(1): 36-47.
- [4] JANDA J M, ABBOTT S L, KROSKE-BYSTROM S, et al. Pathogenic properties of *Edwardsiella* species [J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(9): 1997-2001.
- [5] XU T, ZHANG X H. *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture [J]. Aquaculture, 2014, 431: 129-135.
- [6] MOHANTY B R, SAHOO P K. Edwardsiellosis in fish: a brief review [J]. J Biosci, 2007, 32(7): 1331-1344.
- [7] LEUNG K Y, SIAME B A, TENKINK B J, et al. *Edwardsiella tarda*-virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen [J]. Microbes Infect, 2012, 14(1): 26-34.
- [8] ZHANG M, SUN K, SUN L. Regulation of autoinducer 2 production and luxS expression in a pathogenic *Edwardsiella tarda* strain [J]. Microbiology (Reading), 2008, 154(7): 2060-2069.
- [9] LING S H, WANG X H, LIM T M, et al. Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 194(2): 239-243.
- [10] WANG B, YU T, DONG X, et al. *Edwardsiella tarda* invasion of fish cell lines and the activation of divergent cell death pathways [J]. Vet Microbiol, 2013, 163(3-4): 282-289.
- [11] 孔繁德, 陈琼, 王生育, 等. 福建家养淡水鱼暴发传染病的细菌分离鉴定与防治 [J]. 福建农业学报, 2004(4): 21-27.
- [12] 罗晓春, 李安兴, 谢明权. 斜带石斑鱼黏膜免疫系统结构的研究 [J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 193-198.
- [13] DUAN L H, FENG J J, LIN P, et al. Evaluation of an outer membrane protein as a vaccine against *Edwardsiella anguillarum* in Japanese eels (*Anguilla japonica*) [J]. Aquaculture, 2019, 498: 143-150.
- [14] BUJAN N, MOHAMMED H, BALBOA S, et al. Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species [J]. Syst Appl Microbiol, 2018, 41(1): 30-37.
- [15] XIAO Y, WU L, HE L, et al. Transcriptomic analysis using dual RNA sequencing revealed a pathogen-host interaction after *Edwardsiella anguillarum* infection in European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2022, 120: 745-757.
- [16] ZHAI S, XIAO Y, TANG Y, et al. Transcriptome of *Edwardsiella anguillarum* in vivo and in vitro revealed two-component system, ABC transporter and flagellar assembly are three pathways pathogenic to European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. Mi-



- crob Pathog,2021,153:104801.
- [17] 谢建洋,王荣华,刘小燕,等. 爱德华氏菌研究进展 [J]. 科学养鱼,2014,30(8):54-55.
- [18] HE L,WU L,TANG Y,et al. Immunization of a novel outer membrane protein from *Aeromonas hydrophila* simultaneously resisting *A. hydrophila* and *Edwardsiella anguillarum* infection in European eels (*Anguilla anguilla*) [J]. Fish Shellfish Immunol,2020,97(2):300-312.
- [19] 冯建军,关瑞章,林鹏,等. 鱼类免疫球蛋白分子生物学研究进展 [J]. 集美大学学报(自然科学版),2010,15(6):420-427.
- [20] YE J,MA N,MADDEN T L,et al. IgBLAST:an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool [J]. Nucleic Acids Res,2013,41:W34-40.
- [21] MRSCHTIK,MICHAELA R,KEVIN M. Another DRAM involved in autophagy and cell death [J]. Autophagy,2016,12(3):603-605.
- [22] HUTTER K,LINDNER S E,KURSCHAT C,et al. The miR-26 family regulates early B cell development and transformation [J]. Life Science Alliance,2022,5(8):e202101303.
- [23] 高世勇,李丹. 肿瘤坏死因子与癌症相关研究进展 [J]. 中国药理学通报,2020,36(9):1209-1213.
- [24] 谭兵,李瑜元,聂玉强. 抗肿瘤坏死因子- $\alpha$  治疗的研究进展 [J]. 国际内科学杂志,2007(3):143-147.
- [25] EDILOVA M I,ABAUL-SATER AA,WATTS T H. TRAF1 signaling in human health and disease [J]. Front Immunol,2018,9:2969.
- [26] 常凌雅,马冬,李鸥,等. Krüppel 样因子 5 和肿瘤坏死因子受体超家族成员 11a 在宫颈癌组织及细胞中的表达及其作用 [J]. 中国医学科学院学报,2017,39(2):196-205.
- [27] LI M,TANG Y,LI Q,et al. Mono-ADP-ribosylation of H3R117 traps 5mC hydroxylase TET1 to impair demethylation of tumor suppressor gene TFPI2 [J]. Oncogene,2019,38(18):3488-3503.
- [28] FUTOSI K,FODOR S,MÓCSAI A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways [J]. Int Immunopharmacol,2013,17(3):638-50.
- [29] LIU D,DUAN L,RODDA L B,et al. CD97 promotes spleen dendritic cell homeostasis through mechanosensing of red blood cells [J]. Science,2022,375(6581):eabi5965.
- [30] MAZURKIEWICZ-PISAREK A,PLUCIENNICZAK G,CIACH T,et al. The factor VIII protein and its function [J]. Acta Biochim Pol,2016,63(1):11-16.
- [31] MUKHERJEE S,HUDA S,SINHABABU S P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases;a review [J]. Scand J Immunol,2019,90(1):e12771.
- [32] REID K B M. Complement component C1q:historical perspective of a functionally versatile, and structurally unusual, serum protein [J]. Frontiers in Immunology,2018,9:764.
- [33] SHIN A W,MCFARLANE A,VERHOVSEK M. Haptoglobin testing in hemolysis:measurement and interpretation [J]. Am J Hematol,2014,89(4):443-7.
- [34] DENG W,FERNANDEZ A,MCLAUGHLIN S L,et al. Cell communication network factor 4 (CCN4/WISP1) shifts melanoma cells from a fragile proliferative state to a resilient metastatic state [J]. Cellular and Molecular Bioengineering,2019,13(1):45-60.
- [35] ZHOU Z J,SUN L. *Edwardsiella tarda*-induced inhibition of apoptosis:a strategy for intracellular survival [J]. Front Cell Infect Microbiol,2016,6:76.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)