

余文杰,陈观水. 红龙鱼源  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌 AH 的分离及其对机体铁代谢的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(7):162-166.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.07.040

# 红龙鱼源 $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌 AH 的分离及其对机体铁代谢的影响

余文杰<sup>1</sup>, 陈观水<sup>2</sup>

(1. 漳州职业技术学院食品与生物工程系, 福建漳州 363000; 2. 福建农林大学生命科学学院, 福建福州 350001)

**摘要:**对具有典型败血症病症的染病红龙鱼进行病原菌分离鉴定分析。从其肝脏中分离得到病原菌菌株 AH, 经 VITEK-32 全自动细菌分析仪鉴定为嗜水气单胞菌。通过多重 PCR 检测确认该嗜水气单胞菌 AH 属于  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌, 含有气溶素基因(*aerA*)和溶血素基因(*ahh1*)。此外研究嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后对其机体铁代谢的影响, 通过腹腔注射嗜水气单胞菌 AH, 在侵染后不同时间点收集红龙鱼的血液和肝脏组织, 分别采用分光光度计法和电感耦合等离子体原子发射光谱(inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, 简称 ICP-AES)法检测红龙鱼血清和肝脏中的铁含量, 同时采用实时荧光定量 PCR 法对铁调素基因(*hepc*)、白细胞介素基因(*il-6*)、JAK/STAT 信号通路的蛋白酪氨酸激酶 3 基因(*jak3*)、信号转导子和转录激活因子 3 基因(*stat3*)表达量进行检测。结果表明, 侵染嗜水气单胞菌 AH 后, 红龙鱼血清中铁浓度明显降低, 在 24、48h 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差异没有达到显著水平, 但仍有明显升高。肝脏中 *hepc* 基因的表达量在一定时间范围内显著上升; *il-6* *jak3* 和 *stat3* 基因表达量开始均有所上调, 随后有所下降, 但在各时间点的表达量均高于对照。由结果可知, 机体通过调节铁调素基因(*hepc*)等铁相关基因的表达, 进而降低自身游离铁含量, 并增加储存铁含量来应对细菌的侵染。

**关键词:**嗜水气单胞菌; 红龙鱼; *hepc* 基因; *jak3* 基因; *il-6* 基因; 铁代谢

**中图分类号:** S942.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)07-0162-05

红龙鱼是我国主要的观赏鱼品种之一, 许多养殖场和鱼

类爱好者均有饲养。目前福建省已形成相当规模的红龙鱼养殖产业。由于红龙鱼的高蛋白饵料投喂造成其生长水体恶化, 而大部分养殖场忽视了防病措施, 鱼体传染性病日趋严重, 发病率高达 75% 以上, 造成极大的经济损失。2016 年 5 月份福建省一些养殖场暴发红龙鱼疾病, 其体表出现溃疡, 严重者口鼻充血、流血, 解剖后内脏肝、脾、肾肿大。经过细菌分离鉴定发现, 主要原因是嗜水气单胞菌的大量感染。目前已经发现嗜水气单胞菌中存在 2 种  $\beta$ -溶血性毒素, 分别是毒力因子溶血素和气溶素<sup>[1]</sup>。嗜水气单胞菌中溶血性毒素会导致胞质内容物泄漏, 最终引发细胞死亡。前人研究表明,

收稿日期: 2016-11-08

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30900915); 福建省科技厅科学研究项目(编号: JK2012012)。

作者简介: 余文杰(1977—), 男, 福建漳州人, 硕士, 讲师, 主要从事基因工程的教学及科学研究。Tel: (0596) 2660011; E-mail: 1527076860@qq.com。

通信作者: 陈观水, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事基因克隆与功能相关研究以及水产动物繁育及病害防治研究。Tel: (0591) 83596438; E-mail: 2085404947@qq.com。

- [4] 王 峰, 王 武. 江黄颡鱼、黄颡鱼、粗唇鲃杂交繁育初报[J]. 水产科技情报, 2004, 31(1): 10-11.
- [5] 王 峰. 江黄颡鱼、黄颡鱼、粗唇鲃及其杂交  $F_1$  代形态差异分析[J]. 中国农学通报, 2013, 29(2): 36-43.
- [6] 唐忠林, 周国勤, 茆健强, 等. 黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼的规模化杂交繁殖[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 303-305.
- [7] 吴勤超, 梁宏伟, 李 忠, 等. 黄颡鱼微卫星标记的筛选及三个野生群体的遗传结构分析[J]. 生物技术通报, 2010(3): 154-159.
- [8] 赵哲霞, 蒋 珊, 王滨花, 等. 黄颡鱼属 SSR 分子鉴定及其遗传多样性[J]. 南昌大学学报(理科版), 2014, 38(5): 498-501.
- [9] 肖调义, 张学文, 章怀云, 等. 洞庭湖四种黄颡鱼基因组 DNA 遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(3): 84-89.
- [10] 赵文学, 杨 星, 彭 智, 等. 黄颡鱼属物种的 RAPD 分子鉴定及杂种遗传分析[J]. 水生生物学报, 2006, 30(1): 101-106.
- [11] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic

linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. The American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.

- [12] Briolay J, Galtier T, Brito R M, et al. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1998, 9(1): 100-108.
- [13] Caccone A, Allegrucci G, Fortunato C, et al. Genetic differentiation within the European sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays[J]. Journal of Heredity, 1997(88): 316-324.
- [14] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [15] Haymer D S, McInnis D O. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction [J]. Genome, 1994, 37(2): 244-248.

*aerA* 基因和 *ahh1* 基因分别负责翻译生产溶血素和气溶素。血液中铁元素在水产动物体内是免疫系统发挥作用的重要因子,可影响鱼体巨噬细胞的杀菌功能和免疫细胞的增殖与活性。同时,铁元素也是病原微生物和宿主相互竞争的对象,机体可以通过调节铁相关基因,从而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,具有抑菌活性,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,也称为铁调素<sup>[2]</sup>。白细胞介素 6 (简称 *il-6*) 炎症因子能强烈地刺激铁调素的表达。而 *il-6* 炎症因子是通过刺激蛋白酪氨酸激酶/信号转导子和转录激活子(简称 JAK/STAT)信号通路调节铁调素表达<sup>[3]</sup>。本试验拟通过红龙鱼源  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌 AH 的分离鉴定,然后检测受嗜水气单胞菌 AH 侵染后红龙鱼铁代谢水平和肝脏中 *hepc*、*il-6*、蛋白质酪氨酸激酶 3 基因(*jak3*)、信号转导子和转录激活因子 3 基因(*stat3*)表达量的变化,进而研究  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌 AH 侵染和鱼体铁代谢之间的相互作用,为进一步分析铁相关基因在受感染寄主应对细菌侵染

中的作用提供科学研究依据。

1 材料与方法

1.1 染病红龙鱼采集与病原菌的分离

染病红龙鱼典型患病特征为败血症,其主要症状为反应迟钝、摄食较少,严重者口鼻充血。解剖后可见鱼体肝脏肿大,有点状出血,肾脏、肠道充血。在无菌条件下从染病红龙鱼的肝、肾、皮肤和血液取样,用营养琼脂平板划线分离,30 ℃ 培养 24 h,挑取单菌落进行纯化培养,菌株低温保存备用。

1.2 细菌鉴定

通过细菌形状、革兰氏染色和氧化酶检测,采用法国梅里埃生物公司革兰氏阴性或阳性鉴定试剂条,用 VITEK-32 全自动细菌鉴定仪鉴定。

1.3 化学试剂和生物试剂盒

化学试剂购自上海一基实业有限公司,生物试剂盒购自深圳市长征生物科技有限公司。引物和反应条件参照前人描述的方法<sup>[4]</sup>。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成(表 1)。

表 1 引物序列和目标基因

引物名称	引物序列 (5'→3')	目标基因	基因定位点 (bp)	产物大小 (bp)
AH - <i>ahh1</i> F	GCCGAGCGCCCAAGGTGAGTT	<i>ahh1</i>	961 ~ 983	130
AH - <i>ahh1</i> R	GAGCGCGGCTGGATGCGGTTGT		1 090 ~ 1 071	
AH - <i>aerA</i> F	CAAGAACAAAGTTCAAGTGCCCA	<i>aerA</i>	1 323 ~ 1 344	309
AH - <i>aerA</i> R	ACGAAGGTGCTGTTTCCAGT		1 631 ~ 1 613	
AH - 16S F	GGGAGTGCCTTCGGGAATCAGA	16S rRNA	1 020 ~ 1 041	356
AH - 16S R	TCACCCGCAACATTCTGATTTC		1 375 ~ 1 355	

1.4 试验菌株 DNA 提取

细菌 DNA 制备依据相应的 DNA 提取试剂盒产品说明书(北京普洛麦格生物技术有限公司)。

1.5 PCR 条件

PCR 反应条件包括 3 对引物的 PCR 反应。PCR 反应溶液(25  $\mu$ L)包含 12.5  $\mu$ L *Taq* 酶,1.0  $\mu$ L *ahh1* 引物,1.0  $\mu$ L *aerA* 引物,0.2  $\mu$ L 16S rRNA 引物和 1  $\mu$ L DNA 样品,其余为双蒸水。PCR(仪器型号为 ABI-2720,美国贝登仪器公司)扩增采用下列条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。扩增的 DNA 片段的电泳检测条件:2% 琼脂糖凝胶水平电泳,1  $\times$  TAE 缓冲液(0.04 mol/L Tris,0.02 mol/L 醋酸,0.002 mol/L Na<sub>2</sub>EDTA),100 V,45 min,使用 8  $\mu$ L PCR 产物。凝胶使用 1  $\mu$ L/mL 溴化乙锭染色 30 min,在紫外线光照下观察。基因大小标准品采用 100 个碱基对的 DNA 梯度标记物(上海启发试验试剂有限公司)。

1.6 试验用鱼

试验用健康红龙鱼购自福建省农业科学院水产养殖基地,选择外观健康和大小相似的红龙鱼幼鱼,鱼体质量为(100  $\pm$  5)g,体长为(20  $\pm$  1)cm。将试验红龙鱼随机分为 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 50 尾,共 300 尾。

1.7 嗜水气单胞菌 AH 侵染和样品采集

根据前期试验结果,采用嗜水气单胞菌 AH 侵染的最适菌悬液浓度为 1.0  $\times 10^6$  CFU/mL。将培养的嗜水气单胞菌 AH 用 0.65% 无菌生理盐水洗脱,稀释成 1.0  $\times 10^6$  CFU/mL

的菌悬液,通过红龙鱼腹腔注射,注射前鱼体用 200 mg/L 丁香酚轻度麻醉,试验组每尾注射 0.1 mL 菌悬液,对照组注射等量无菌生理盐水。注射后 6、12、24、48、72、84、96 h 独立采集试验组、对照组鱼各 3 尾,将一次性注射器用肝素钠(1 000 IU/mL)润洗后从鱼体尾静脉取血 0.5 ~ 0.8 mL。采血后鱼体立即解剖,取出肝脏组织置于液氮中,于 -80 ℃ 保存,用于肝脏铁含量和基因表达测定。

1.8 血清铁浓度、总铁结合力的测定

血清样品制备:血液于 40 ℃ 静置 2 h 左右,于 4 000 r/min 离心 10 min 后收集上层血清,-20 ℃ 冰箱过夜,次日血清解冻后再次低速(4 000 r/min)离心 10 min,吸取上层液于 -80 ℃ 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(福州先亚生物工程有限公司)。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,铁离子的含量与色泽成正比。总铁结合力的检测原理<sup>[5]</sup>:在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,然后依据血清铁检测方法测定铁含量,即为总铁结合力。测定步骤具体参照试剂盒说明书,利用紫外分光光度计(TU-1900,北京普析通用仪器有限公司)测定,每个样品重复检测 3 次。

1.9 肝脏铁浓度的测定

采用电感耦合等离子体发射光谱法(简称 ICP-AES)检测

肝脏铁含量<sup>[5]</sup>:将肝脏样品解冻后,用低温 0.9% 生理盐水冲洗干净并用滤纸吸干水分,粉碎均匀后置于坩埚中,置于马弗炉内,于 600 ℃ 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 5 mL 体积比为 1 : 1 的硝酸、水溶液溶解,电炉上加热直至沸腾,过滤至 50 mL 容量瓶内,并用双蒸水反复洗涤坩埚和滤纸,将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。同时配制试剂空白液。采用电感耦合等离子体原子发射光谱(inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry,简称 ICP – AES)仪(ICP – 8000,北京达丰瑞仪器有限公司)测定,每个样品重复检测 3 次。

1.10 肝脏铁代谢相关基因表达特征分析

根据红龙鱼 *hepc* 基因 cDNA 序列(基因登录号:

JQ308543)、*il-6* 基因 cDNA 序列(基因登录号:KJ757688)、*jak3* 基因 cDNA 序列(基因登录号:AF148993)与草鱼 *stat3* 基因 cDNA 序列(基因登录号:JX976548)设计引物,详见表 2<sup>[6-8]</sup>。采用 RNAiso[宝生物工程(大连)有限公司]提取肝脏总 RNA,反转录成 cDNA,在实时定量 PCR 仪(T – 100,美国伯乐仪器有限公司)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 分对照法确定,选择红龙鱼 18S rRNA 基因作为内参(基因登录号:AB860236)<sup>[9]</sup>。实时荧光定量 PCR 反应体系:0.4 μL 上下游引物,2 μL cDNA 模板,7.2 μL ddH<sub>2</sub>O,总体积 20 μL。反应条件:95 ℃ 1 min;95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,35 个循环。溶解曲线温度为 52 ~ 99 ℃。每个样品重复检测 3 次。

表 2 红龙鱼铁代谢相关基因荧光定量 PCR 引物序列

基因名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)	预计扩增片段长度 (bp)
AH – <i>hepc</i>	F:CATACAGCCCGTTCCCTTATC;R:AGTAGTCGTAGTCGATGCAC	57	154
AH – <i>il-6</i>	F:ACAGCGTAGTGTCTGATGCAT;R:TTCAGTCTAGTCGTAGCATG	58	183
AH – <i>jak3</i>	F:CTTCATGCTGATGCTGCAAG;R:CCAGAGGGTTCTGTCTAG	59	176
AH – <i>stat3</i>	F:CGCATCACGCTAGTCGTGAA;R:GCAGCTACTAGTGTCTGATGA	58	141
AH – 18SrRNA	F:CGGAGGTTTCGAGACGATCA;R:GGGTCGGGCATCTTTAGATC	60	162

1.11 数据分析

所有数据均用 SPSS 18.0 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<sup>[10]</sup>。所有数值均表示为“平均值 ± 标准差”。

2 结果与分析

2.1 菌株特征

从染病红龙鱼肝脏中分离出 1 株菌株 AH,经 24 h 营养琼脂平板培养后呈黄色,湿润圆形略隆起,边缘整齐,直径为 2 mm 左右,见图 1。

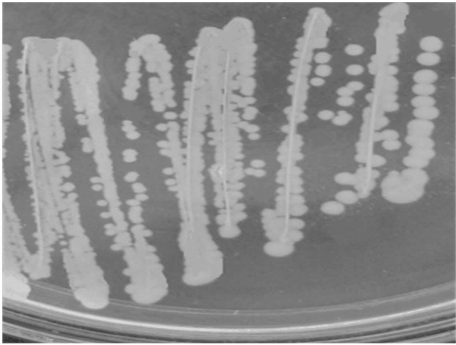


图1 染病红龙鱼肝脏中分离得到的细菌 AH 培养形态

2.2 生化反应及鉴定结果

菌株 AH 经过分离纯化后,用 VITEK – 32 全自动微生物分析仪鉴定为嗜水气单胞菌,其生理、生化特性见表 3。

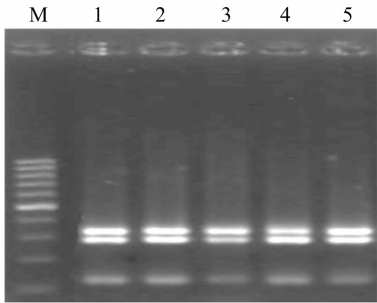
2.3 嗜水气单胞菌 AH β-溶血性毒素因子 *ahh1* 和 *aerA* 的基因分析

经过多重 PCR 证实,从染病红龙鱼中分离得到的嗜水气单胞菌 AH 携带 *ahh1* 和 *aerA* 基因。该细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物(356 个碱基对)、*ahh1* 基因扩增产物(130 个碱基对)、*aerA* 基因扩增产物(309 bp)见图 2。

表 3 菌株 AH 生理、生化特性

生理、生化反应	特性	生理、生化反应	特性
革兰染色	–	香豆酸(简称 COU)	+
细菌形态	短杆状	精氨酸(简称 Arg)	+
氧化酶(简称 OXI)	+	醋硫酸(简称 ACE)	–
二氯苯氧氯酚(简称 DP3)	+	色氨酸(简称 TDA)	–
尿素(简称 URE)	–	棉籽糖(简称 RAF)	–
麦芽糖(简称 MLT)	+	硫化氢(H <sub>2</sub> S)	–
肌醇(简称 INO)	+	赖氨酸(简称 Lys)	–
阿拉伯糖(简称 ARA)	+	七叶树素(简称 ESC)	+
葡萄糖氧化(简称 OFG)	+	多肽杆菌素(简称 PXB)	–
枸橼酸(简称 CIT)	–	山梨醇(简称 SOR)	–
甘露醇(简称 MAN)	+	半乳糖苷(简称 ONP)	–
福寿昔醇(简称 ADO)	–	鸟氨酸(简称 Orm)	–
葡萄糖发酵(简称 GLU)	+	吡啶-β-葡萄糖苷(简称 PLI)	+
阳性生长控制(简称 GC)	+	乳糖(简称 LAC)	–
丙二酸盐(简称 MAL)	–	蔗糖(简称 SUC)	+
木糖(简称 XYL)	–	鼠李糖(简称 RHA)	–

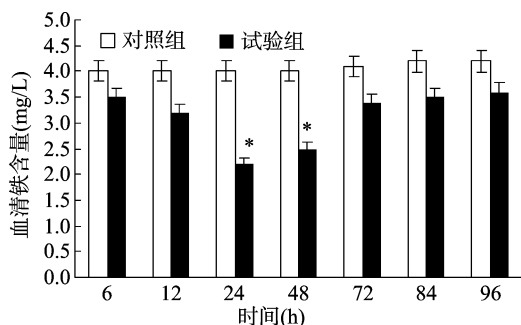
注:“+”“–”分别表示阳性、阴性。



M—DNA 标准品;1—嗜水气单胞菌 AH;2—肾脏感染菌;3—皮肤感染菌;4—血液感染菌;5—肝脏感染菌  
图2 染病红龙鱼分离得到的β-溶血性嗜水气单胞菌 AH 多重 PCR 检测结果

## 2.4 嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后其血清铁浓度的变化

嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后不同时间点血清中铁浓度的变化趋势如图 3 所示。由图 3 可以看出,侵染后不同时间点试验组和对照组比较,红龙鱼血清铁浓度均有不同程度的降低,侵染 24、48 h 后达到显著水平( $P < 0.05$ )。



“\*”表示与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。图4、图5同  
图3 嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后不同时间点血清铁浓度的变化

## 2.5 嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后其血清总铁结合力的变化

嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后不同时间点其血清中总铁结合力的变化趋势如图 4 所示。由图 4 可以看出,侵染后试验组红龙鱼血液中血清的总铁结合力和对照组比较略有不同程度的增加,但均未达到显著水平。

## 2.6 嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后其肝脏铁含量的变化

由图 5 可以看出,嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后不同时间点试验组肝脏铁含量均高于对照组,但并无显著差异。

## 2.7 嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后对其不同时间点 *hepc*、*il-6*、*jak3*、*stat3* 基因表达变化

在注射嗜水气单胞菌 AH 后,*hepc* 基因在不同时间点表达量相对于 0 h 明显上调,在 6、12、24 h 与 0 h 差异显著( $P <$

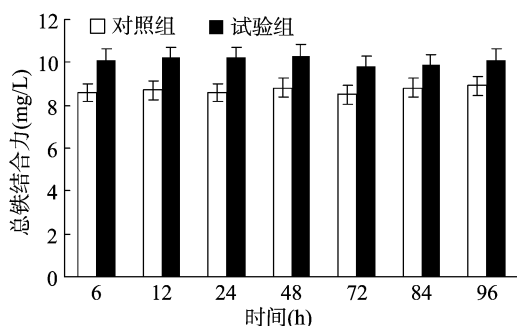


图4 嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后不同时间点血清总铁结合力的变化

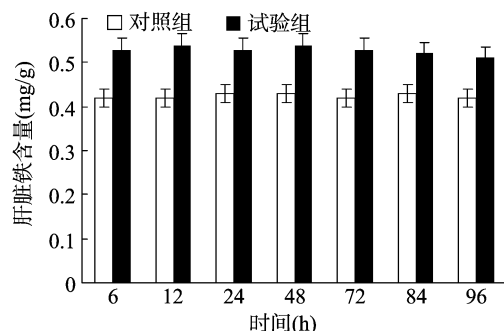
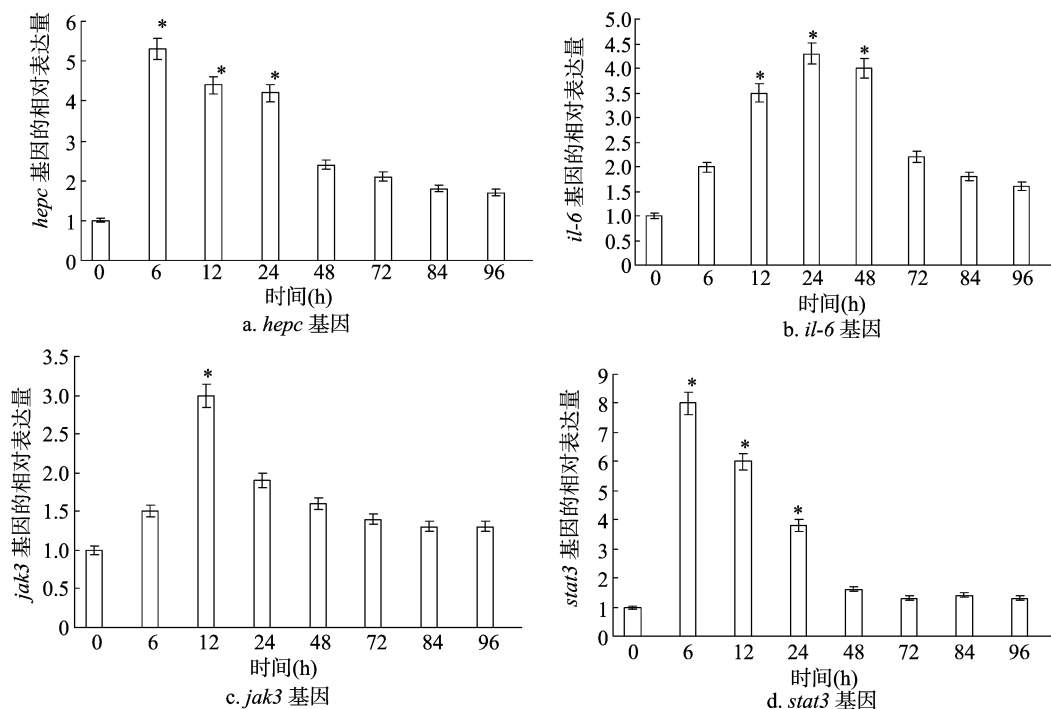


图5 嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后不同时间点肝脏铁含量的变化

0.05),在侵染后 6 h 达到最高值,随后逐渐下降。基因 *il-6* 在侵染后表达量明显上调,在 24 h 时表达量最高,随后有所下降,在 12、24、48 h 均与 0 h 差异显著( $P < 0.05$ );基因 *jak3*、*stat3* 的表达量亦均有所上调,*jak3* 基因在 12 h 时表达量达到最高值( $P < 0.05$ ),*stat3* 基因在 6 h 时的表达量达到最高值,随后逐步下降,但仍明显高于侵染前的表达水平,详见图 6。



“\*”表示与 0 h 相比差异显著( $P < 0.05$ )

图6 嗜水气单胞菌 AH 侵染红龙鱼后不同时间点 *hepc*、*il-6*、*jak3*、*stat3* 基因表达的变化

### 3 结论与讨论

对染病红龙鱼肝脏取样后进行细菌的划线分离纯化,在营养琼脂平板上获得形态一致的菌落,将该菌株编号为 AH,由全自动细菌分析仪鉴定其为嗜水气单胞菌。菌株 AH 人工感染红龙鱼试验表明,出现的症状与自然病例基本相同,鉴定的菌株与接种菌株完全一致,所观察到的菌落形态也基本相符。PCR 是一种检测病原体首选的方法,它具有显著的优点,如速度快、高敏感性和特异性等<sup>[5]</sup>。本研究使用特定的毒力因子引物来证实嗜水气单胞菌 AH 携带气溶素和溶血素基因。菌株 AH 具有  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌特征,能分泌具有溶血性、肠毒性和细胞毒性的外毒素,并能广泛地侵袭健康红龙鱼肾、脾、肺、肝、肌肉和血液等器官组织,且能大量增殖,造成广泛性出血、全身性组织损害,并使各器官组织出现肿胀、颗粒变性、玻璃样变、坏死崩解以及红细胞碎裂。解剖后观察均可见体表出现溃疡、疤痕,严重的产生口鼻充血、流血,内脏肝、脾、肾肿大,肠道充血,严重者有腹水。

红龙鱼血液中铁元素是机体内多种酶类合成的必要元素,参与细胞增殖、分化和电子转移等多种生命活动。铁也是需铁细菌增殖分化的必要元素,与致病病毒力的强弱有关。细菌入侵宿主机体吸收铁以满足其增殖和致病力的表达。宿主通过降低机体铁代谢水平,从而抑制细菌的增殖和降低其致病力。本试验发现,侵染嗜水气单胞菌 AH 后红龙鱼血清铁含量有所下降,24、48 h 与对照差异达到显著水平。肝脏铁含量在侵染嗜水气单胞菌 AH 后有所上升,但与对照的差异没有达到显著水平。这表明鱼体在侵染后通过一系列调节作用,降低机体的铁循环从而抑制细菌的侵害。侵染后红龙鱼血清总铁结合力相对于对照组有所上升,没有达到显著水平。结合细菌侵染后鱼体血清铁含量的变化和转铁蛋白含量的变化,认为血清铁和转铁蛋白的比例显著下降可以提高铁与转铁蛋白的结合效率,从而抑制嗜水气单胞菌 AH 从机体摄取铁的能力。

本试验检测发现,红龙鱼肝脏 *hepc*、*il-6*、*jak3* 和 *stat3* 基因在嗜水气单胞菌 AH 侵染后都有不同程度的上调,表明这些基因都参与了鱼体的非特异性免疫反应。*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相关基因水平。前人研究证实,大菱鲆在侵染细菌嗜水气单胞菌 AH 后,肝、脾、鳃等组织中 *hepc* 基因的表达量均显著增高。侵染链球菌后,鲈鱼肝细胞 *hepc* 的 mRNA 水平在数小时内明显上调。香鱼肝脏中 *hepc* 基因表达量在侵染曼利斯顿氏菌后显著上升<sup>[11-12]</sup>。本试验中,*hepc* 基因在侵染后不同时间点的表达量均有所上升,并在 12、24 h 与 0 h 相比达到了显著差异。机体受细菌侵害时,巨噬细胞等免疫细胞会合成和分泌大量的炎性因子,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,进而影响机体铁相关基因水平。*il-6* 和受体结合后可激活 *jak3* 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。在本试验中,在侵染嗜水气单胞菌 AH 后红龙鱼肝脏中 *il-6* 的表达量均有所上升,在 24 h 时达到最高值。基因 *jak3*、*stat3* 的表达量也均有所上调,分别在 6、12 h 时达到最高值。因此,当细菌入侵时,引起鱼体发生炎症反应,在 *il-6* 基因和 JAK/STAT 通路相关基因的共同作用下,*hepc* 基因的表达量上升,从而下调鱼体的循环铁浓度,以应对细菌的侵害。

### 参考文献:

- [1] Janda J M, Abbott S L. The genus aeromonas: taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23 (1): 35 - 73.
- [2] Korbssrisate S, Dumnin S, Chawengkirtikul R, et al. Distribution of aeromonas hydrophila serogroups in different clinical samples and the development of polyclonal antibodies for rapid identification of the genus aeromonas by direct agglutination [J]. Microbiology and Immunology, 2002, 46 (12): 875 - 879.
- [3] Grim C J, Kozlova E V, Sha J, et al. Characterization of aeromonas hydrophila wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes [J]. mBio, 2013, 4 (2): e00064 - 13.
- [4] Ansary A, Haneef R M, Torres J L, et al. Plasmids and antibiotic resistance in Aeromonas hydrophila isolated in Malaysia from healthy and diseased fish [J]. Journal of Fish Diseases, 1992, 15 (2): 191 - 196.
- [5] González - Serrano C J, Santos J A, García - López M L, et al. Virulence markers in Aeromonas hydrophila and Aeromonas veronii biovar sobria isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case [J]. J Appl Microbiol, 2002, 93 (3): 414 - 419.
- [6] Subashkumar R, Thayumanavan T, Vivekanandhan G A. Occurrence of Aeromonas hydrophila in acute gastroenteritis among children [J]. Indian Journal of Medical Research, 2006, 123 (1): 61 - 66.
- [7] 储卫华, 陆承平. PCR 扩增特异性 16S rDNA 和溶血素基因检测致病性嗜水气单胞菌 [J]. 水产学报, 2005, 29 (1): 79 - 82.
- [8] 王远微, 汤承, 于学辉, 等. 三重 PCR 检测鱼类致病性嗜水气单胞菌 [J]. 微生物学报, 2008, 48 (7): 947 - 951.
- [9] Chen Q, Yan Q, Wang K J, et al. The portal of entry for pathogenic Vibrio alginolyticus into large yellow croaker Pseudosciaena crocea and characteristic of the bacterial adhesion to the mucus [J]. Dis Aqu Organ, 2008, 80 (3): 181 - 188.
- [10] 郭松林, 关瑞章, 柳佩娟. 双重 PCR 法快速检测欧鳊嗜水气单胞菌 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2007, 12 (4): 294 - 300.
- [11] Shemesh M, Tam A, Steinberg D. Differential gene expression profiling of Streptococcus mutans cultured under biofilm and planktonic conditions [J]. Microbiology, 2007, 153 (Pt 5): 1307 - 1317.
- [12] 毛宁, 王志明, 郑莹. 嗜水气单胞菌与其拮抗菌 R-15 的生长曲线研究 [J]. 福建师范大学学报 (自然科学版), 2008, 24 (1): 82 - 85.