

DOI: 10.12264/JFSC2024-0319

鳙感染嗜水气单胞菌后 *pIgR* 基因的免疫响应及组织病理变化

夏虎^{1,2}, 丁成², 刘良国², 杨心月², 卜建超², 陈福艳³, 向光清⁴, 黄洁珍⁴, 杨品红¹

1. 湖南应用技术学院/农林科技学院, 特色水产重点实验室, 湖南 常德 415000;
2. 湖南文理学院/生命与环境科学学院, 湖南省水生生物资源沅江澧水监测站, 常德市湿地生物与环境生态重点创新团队, 湖南 常德 415000;
3. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西 南宁 530021;
4. 龙山县畜牧水产事务中心, 湖南 湘西土家族苗族自治州 416000

摘要: 多聚免疫球蛋白受体(polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)是一种重要的鱼类黏膜因子, 在介导多聚免疫球蛋白向黏膜免疫组织的黏液中分泌和转运中起着关键的作用。本研究利用 PCR 与 RACE 技术克隆获得鳙 (*Aristichthys nobilis*) *pIgR* 基因 cDNA 全长序列, 鳙 *pIgR* 基因 cDNA 序列全长 1885 bp, 其开放阅读框长 1008 bp, 编码 336 个氨基酸, 鳙 *pIgR* 具有 1 个信号肽序列, 之后为胞外区、跨膜区和胞内区, 胞外区包括 2 个免疫球蛋白样功能域(Ig-like domains, ILD), 其三级结构呈扭曲的“L”型。系统进化树分析发现鳙 *pIgR* 基因与同属鲤形目鱼类的 *pIgR* 聚为一支。实时荧光定量 PCR 检测结果显示鳙 *pIgR* 基因的表达量在肝脏中最高, 其次为脾、肠、头肾、鳃及皮肤, 在中肾、心及脑中具有较低的表达量, 其表达水平最低的组织是肌肉。鳙被嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染 5 d, 通过组织切片与 HE 染色观察 *pIgR* 基因表达水平高的免疫相关组织病理变化, 发现肠绒毛宽度增宽, 黏液细胞增多, 肠壁增厚, 表现出明显的肠道炎症症状; 头肾与脾脏组织出现大量的炎症细胞, 脾脏中观察到大量的空泡细胞; 肝脏肝窦增宽; 鳃丝变形缩短, 鳃丝细胞凋落。鳙被嗜水气单胞菌感染, 头肾、脾脏、鳃、肠和肝中 *pIgR* 基因的表达量在感染 28 d 内呈先上升后降低的趋势, 鳃和肠中 *pIgR* 基因的相对表达量在感染 5 d 达到峰值, 头肾、脾脏与肝中分别在感染 7 d 和 14 d 达到最大值, 且鳙 *pIgR* 基因在肠(18.63 倍)和鳃(16.53 倍)中达到峰值时的相对表达量高于其在头肾(9.38 倍)、脾脏(15.98 倍)和肝(12.28 倍)中在峰值时的相对表达量。实验结果表明嗜水气单胞菌感染鳙不仅导致其免疫相关组织发生病变, 诱导产生炎症反应, 且对呼吸系统和消化系统也具有影响, 在鳙抵御细菌感染的免疫反应中 *pIgR* 可能在黏膜免疫系统中起着关键的作用。

关键词: 多聚免疫球蛋白受体; 鳙; 免疫应答; 嗜水气单胞菌; 组织病理

中图分类号: S947

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)03-0286-13

多聚免疫球蛋白受体(polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)是免疫球蛋白超家族的组成成员之一, 在先天性免疫与获得性免疫中均起着重要作用^[1-2]。目前, 已在多种硬骨鱼类, 如团头鲂(*Megalobrama amblycephala*), 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*), 泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*), 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*), 鳜(*Siniperca chuatsi*), 青鲫(*Carassius auratus indigentiaus*), 中华鳖

(*Pelodiscus sinensis*)中克隆获得 *pIgR* 基因^[3-9]。哺乳动物 *pIgR* 能与四聚体 IgM 或二聚体 IgA 相结合, 具有 5 个免疫球蛋白样功能域(Ig-like domains, ILD), 鸟类和两栖动物 *pIgR* 存在 4 个 ILDs, 分别与哺乳动物的第 1 个、第 3 个、第 4 个和第 5 个 ILD 结构域具有高度的相似性^[10-11]。硬骨鱼类 *pIgR* 只具有 2 个 ILDs, 其与哺乳动物第 1 个和第 5 个 ILD 具有高度的同源性。

收稿日期: 2024-10-29; 修订日期: 2024-12-05.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32360922); 广西省科技厅自然科学基金项目(2022JJA130338).

作者简介: 夏虎(1986-), 博士, 副教授, 研究方向为鱼类抗病育种与免疫学. E-mail: 867242290@qq.com

通信作者: 杨品红, 教授, 研究方向为水产养殖. E-mail: yph588@163.com

鱼类的黏膜免疫系统是抵御外界病原感染的第一道防线, 是鱼类免疫系统的重要组成部分。*pIgR* 是鱼类黏膜免疫系统中一个重要因子, 其在介导多聚免疫球蛋白抵御病原感染的免疫反应中起着关键作用^[12-14]。在哺乳动物中, 经蛋白酶水解, *pIgR* 的分泌成分(secretory component, SC)与其配体一起从顶膜释放, 导致 sIgAs 或游离 SC 释放到顶腔中^[15]。硬骨鱼类 *pIgR* 在分子结构和免疫功能上与哺乳动物 *pIgR* 具有高度的相似性, 在转运 IgM 和 IgT 的过程中起着重要的作用^[16]。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) *pIgR* 能促进 IgM-抗原复合物经免疫排泄进入肠道黏膜, 经鳗弧菌疫苗接种后, 其胆汁和黏液中能诱导产生 *pIgR*-IgM 复合物, 此外, 在牙鲆的黏液中发现存在 *pIgR* 的分泌成分, 而血清没有^[17-19]。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) *pIgR* 能转运肠黏液中的四聚体 IgT 进入肠腔, 可抑制肠腔被细菌感染, 其在虹鳟肠黏膜中发挥关键的免疫功能^[20]。然而, 目前鱼类被嗜水气单胞菌感染, *pIgR* 在免疫系统中的作用机制尚不清楚。

鳙(*Aristichthys nobilis*), 俗称雄鱼、大头鱼、胖头、花鲢, 其与白鲢、草鱼及青鱼并称为我国的四大家鱼。近年来, 鳙养殖业发展速度极其迅猛, 虽带来了显著的经济效益和社会效益, 但高密度精养和环境恶化使鳙遭受的胁迫日益严重。嗜水气单胞菌感染引起的细菌性出血病对鳙的危害最为严重, 具有季节性、爆发性、死亡率高等特点。目前, 关于鳙感染嗜水气单胞菌后的组织病理变化及 *pIgR* 基因免疫响应的研究尚未见报道。本研究以鳙为研究对象, 通过组织切片与苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE) 检测鳙感染嗜水气单胞菌后不同组织的病理变化; 利用 PCR 与 RACE 技术克隆鳙 *pIgR* 基因, 分析其序列特征, 并检测 *pIgR* 基因在鳙不同组织中的表达及对嗜水气单胞菌的免疫响应, 以期阐明鳙 *pIgR* 在抵御嗜水气单胞菌感染过程中的免疫应答规律, 为鳙健康养殖与利用鱼类的免疫系统进行病害防控提供指导依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼暂养与组织采集

实验鳙(100±2) g 取自湖南文理学院鱼类繁育

与健康养殖基地。在取样前, 实验鱼在暂养池中暂养 14 d, 在此期间 24 h 充氧曝气, 控制溶氧量为(6.0±0.2) μg/mL, 保持水中溶氧充足, 同时控制水温在(26±2) °C, 并每天投喂两次适量的鳙膨化颗粒料。将正常健康的鳙通过鱼用麻醉剂三卡因(MS-222)麻醉, 利用 1 mL 无菌注射器进行尾静脉取血, 然后分别取肌肉、皮肤、鳃、肝脏、脾脏、肠、中肾、心脏、头肾等组织约 100 mg。经液氮速冻后, 保存于-80 °C 冰箱, 用于 RNA 的提取。

1.2 嗜水气单胞菌感染以及样品采集

取 300 尾体重(100±2) g 的鳙, 暂养于室内循环水暂养池中, 控制水温为(26±2) °C, 每天 9:00 和 17:00 定时投喂适量的鳙成鱼颗粒膨化料一次, 使实验鳙达到饱食状态。实验过程保持充足氧气。从患出血病的鳙体内分离鉴定获得嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 挑选单克隆菌株接种到 LB 液体培养基中进行扩大培养, 在 28 °C 的恒温摇床中震荡培养 24 h。通过预实验探索, 嗜水气单胞菌对鳙的半致死浓度约为 1×10⁷ CFU/mL。对鳙进行腹腔注射感染嗜水气单胞菌, 实验组注射 0.1 mL (1×10⁷ CFU/mL) 嗜水气单胞菌的悬液, 对照组注射 0.1 mL PBS, 观察鳙的发病情况, 在感染嗜水气单胞菌 5 d 取有典型病症的鳙, 经 MS-222 麻醉, 用注射器尾静脉取血后, 进行解剖观察, 并取头肾、脾脏、肝脏、肠和鳃组织 3~5 mm³ 于 4% 的中性甲醛固定, 根据于永耀等人报道的泥鳅感染嗜水气单胞菌后组织病理变化的研究方法^[5], 对鳙头肾、脾脏、肝脏、肠和鳃组织进行 HE 染色与观察, 并进行比较分析。

在嗜水气单胞菌感染后 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d, 从实验组和对照组分别取 5 条鳙, 通过 MS-222 麻醉后, 进行尾静脉取血, 然后取肠、鳃、肝脏、脾、头肾组织 100 mg, 经液氮速冻后, 保存于-80 °C 冰箱, 用于后续提取不同时间点各组织中的 RNA。

1.3 RNA 提取和反转录

利用动物组织总 RNA 提取试剂盒(Simgen, 中国), 根据其说明书的操作方法, 提取鳙头肾总 RNA, 利用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 20 min, 在凝胶成像仪中进行观察与拍照, 检测头肾 RNA 的完整性, 利用微量核酸测定仪检测 RNA 的浓度与纯

度。选择经凝胶电泳后完整性好的 RNA 作为模板, 利用反转录试剂盒(Simgen), 根据其说明书的操作方法, 反转录获得鳙头肾 cDNA, 保存于-20 °C 冰箱备用。

1.4 *pIgR* 基因全长 cDNA 的扩增

利用 Primer 6.0 软件, 根据 NCBI 中已公布的鲤科鱼类 *pIgR* 基因序列, 设计鳙 *pIgR* 基因中间序列扩增引物(表 1), 以头肾 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 35 min, 将目的条带进行胶回收与纯化, 然后与 PMD19-T 载体连接, 经转化与蓝白斑筛选后, 挑选阳性克隆进行菌液 PCR 检测与测序。

根据测序获得的鳙 *pIgR* 基因中间序列, 设计

3' 和 5'RACE 引物, 以鳙头肾 RNA 为模板, 利用 SMARTer RACE 5'/3'Kit 试剂盒(TaKaRa, 日本), 根据试剂盒说明书的操作方法, 扩增鳙 *pIgR* 基因 cDNA 的 3' 和 5' 端序列。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 通过胶回收与纯化, 将纯化的 PCR 产物链接到 lineraried pRACE 载体, 转化到 DH5 α 感受态细胞, 经选择培养基筛选, 挑选阳性克隆进行测序。将测序获得的 3' 和 5' 两端序列与中间序列进行拼接, 获得鳙 *pIgR* 基因全长 cDNA 序列, 再根据拼接获得的序列, 利用 Primer 6.0 软件在起始密码子上游和终止密码子下游, 设计一对特异性引物, 对鳙 *pIgR* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF) 序列进行扩增与验证。

表 1 鳙 *pIgR* 基因扩增所用引物

Tab. 1 Primers used to amplify the *Aristichthys nobilis* *pIgR* gene

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
中间序列扩增引物 primers for partial cDNA fragments	
<i>pIgR</i> -F	CACGGCAGGATGATAGAC
<i>pIgR</i> -R	CACACCACAAGAGGAGAC
RACE 引物 Primer for RACE	
primer for 3' RACE (3' GSP)	GATTACGCCAAGCTTGCACGGATTCTGAAGGAG
primer for 5' RACE (5' GSP)	GATTACGCCAAGCTTGATGAGCACACTTCTAC
long primer	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
short primer	CTAACATCGACTCACTATAGGGC
ORF 引物 Primers for ORF	
ORF-F	CCGATGGTTTATCACACTCG
ORF-R	TGGCAACACTATCAACACTA
实时荧光定量 PCR 引物 primers for quantitative Real-time PCR	
qRT-F	AAGGAGCATTTCAGCAGTAG
qRT-R	CACACCACAAGAGGAGAC
β -actin-F	CTCTGCTATGTGGCTTGTGAC
β -actin-R	GAGTATTACGCTCAGGTGGG

1.5 序列分析

利用 DNAstar 软件对测序获得的中间序列, 3' 和 5' 两端序列进行拼接获得鳙 *pIgR* 基因 cDNA 全长序列。通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 中的 open reading frame finder 在线软件寻找鳙 *pIgR* 基因完整的 ORF 并对其氨基酸序列进行预测, 利用 Blastn 在线软件在 GenBank 中对 *pIgR* 基因进行同源序列检索。通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 和 UniProt (<http://www.uniprot.org/>) 在线软件对鳙 *pIgR* 氨基酸结构域进行分析与标注。使用 SWISS-MODEL

(<https://swissmodel.expasy.org>) 在线软件预测鳙 *pIgR* 的三级结构。利用 Clustal X 1.83 软件进行 *pIgR* 氨基酸多重序列比对分析。根据 *pIgR* 氨基酸序列, 通过 MEGA 5.0 软件构建遗传系统进化树(NJ 法, 1000 次)。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测鳙 *pIgR* 基因的表达

通过动物组织总 RNA 提取试剂盒(Simgen), 根据其说明书的操作方法, 提取鳙不同组织的 RNA, 并利用 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa) 反转录获得鳙不同组织的 cDNA 模板。根据已获得的鳙 *pIgR* 基因

cDNA 序列, 利用 Primer 6.0 软件设计 qRT-PCR 引物, 利用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (TaKaRa, 日本), 以 β -actin 基因为内参基因, 通过 qRT-PCR 检测 *pIgR* 基因在鮓各组织中的表达水平, 采用 $\Delta\Delta C_t$ 法计算 *pIgR* 基因在不同组织中的相对表达量。

1.7 数据分析

pIgR 基因的相对表达量通过平均值±标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 利用 Excel 软件和 SPSS 18.0 软件进行实验数据分析。 $P > 0.05$ 表示没有显著性差异, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 鲔 *pIgR* 基因的序列分析

鮓 *pIgR* 基因 cDNA 序全长 1885 bp (GeneBank

登录号: PQ227070), 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 长 57 bp, 3' UTR 长 820 bp, 在 3' 非编码区中包含一个终止密码子 (TAA) 和 Poly A 尾。鮓 *pIgR* 基因 ORF 长 1008 bp, 编码 336 氨基酸, 其分子式为 $C_{1631}H_{2568}N_{448}O_{497}S_{24}$, 理论分子量为 37.17 kD, 理论等电点为 7.51。*pIgR* 氨基酸序列中包含 2 个 N-糖基化位点, 4 个保守的半胱氨酸。鮓 *pIgR* 蛋白结构分析发现, 信号肽序列 (signal peptide, SP) 位于 1~20 氨基酸之间, 其后依次为胞外区、跨膜区 (transmembrane region, TM) 以及胞内区, 分别由 243、23 和 50 个氨基酸组成。胞外区中存在 2 个 ILD, ILD1 位于第 21 个氨基酸至第 115 氨基酸之间, ILD2 位于第 134 氨基酸至第 227 个氨基酸之间 (图 1)。鮓 *pIgR* 蛋白整体呈扭曲的“L”型, 主要由反向平行 β 折叠和无规卷曲组成 (图 2)。

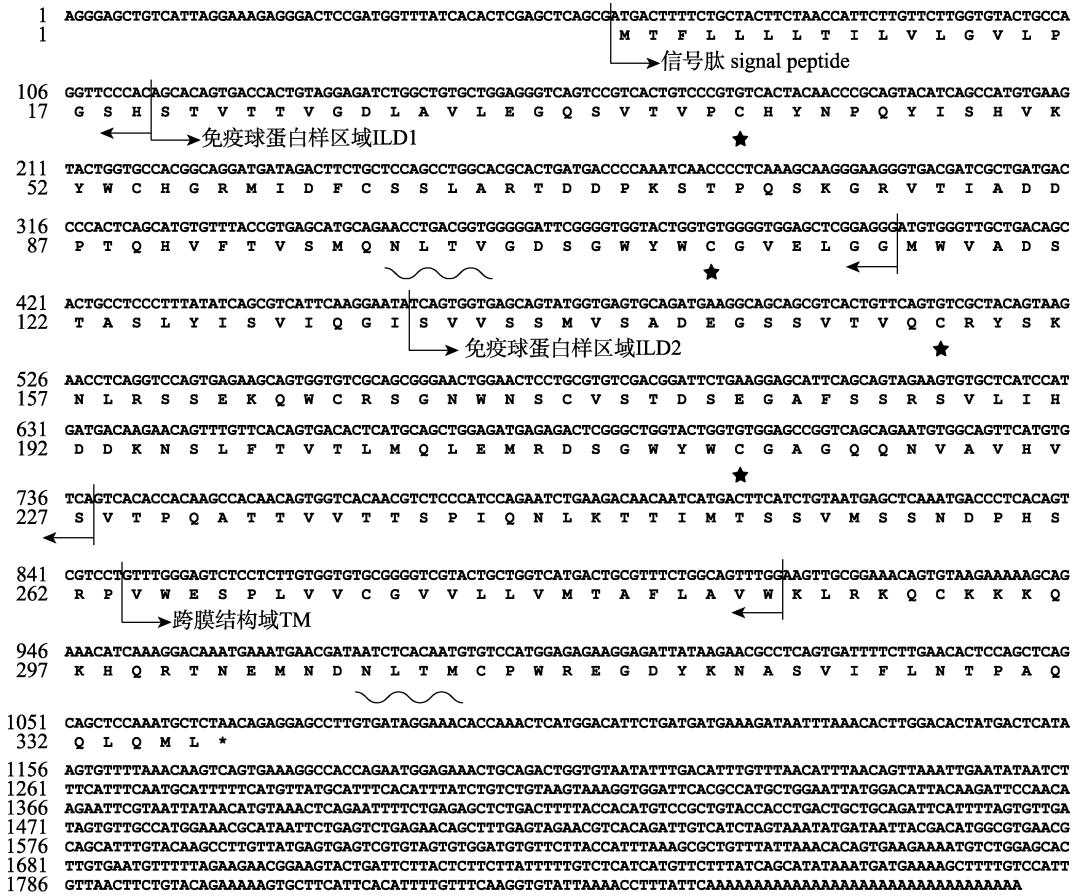


图 1 鲔 *pIgR* 基因全长 cDNA 序列及推測的氨基酸序列分析

* 表示终止密码子; 双下划线表示 poly A 序列; 氨基酸分区用箭头表示,

黑五角星表示可能形成二硫键的半胱氨酸, 波浪号表示糖基化位点。

Fig. 1 Sequencing results and amino acid sequence analysis of *pIgR* in *Aristichthys nobilis*

* denotes a stop codon. A double underline indicates a poly A sequence. Arrows indicated amino acid partitions. The black pentagram indicates the cysteine that may form disulfide bonds. Tildes represent the glycosylation sites.

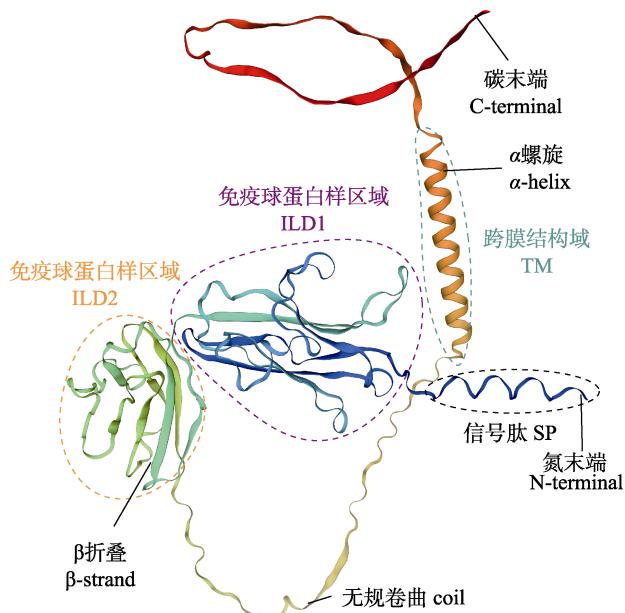


图 2 鲔 pIgR 蛋白预测的三级结构

Fig. 2 Predicted tertiary structure of *Aristichthys nobilis* pIgR protein

2.2 鲔 pIgR 氨基酸序列多重比对分析

多重序列比对结果显示(图 3), 鲔 pIgR 的胞外区缺失 ILD2、ILD3 和 ILD4, 只有两个 ILD, 鲔 pIgR 的两个 ILD 分别与哺乳动物的 ILD1 和 ILD5 具有高度的相似性。在鸟类与哺乳类动物的 ILD1 中均包含 3 个互补决定区(complementary determining region, CDR), 而鎧 pIgR 的 ILD1 中没有 CDR。在硬骨鱼类、鸟类与哺乳类动物 pIgR 的 ILD1 结构域中均存在 KYWC 和 DSGWYWC 独特且保守的氨基酸序列, 在 ILD2 结构域中具有 Kx WC 和 DxGWYWC (x 表示其他氨基酸) 保守的序列, 在 ILD1 与 ILD2 中均具有 2 个保守且位置相同的半胱氨酸残基。

2.3 鲔 pIgR 基因与其他生物的同源性分析及系统进化树构建

利用 Blastp 在线软件将鎧 pIgR 基因预测的氨基酸序列在基因库中进行同源序列检索, 鲔 pIgR 氨基酸序列与其他鱼类 pIgR 的相似性依次为团头鲂(*Megalobrama amblycephala* 92.56%)、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva* 84.88%)、鲤(*Cyprinus carpio* 76.87%)、斑马鱼(*Danio rerio* 75.81%)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus* 69.82%)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss* 51.38%)。通过 MEGA 5.0 软件, 利

用邻接法(Neighbor-joining method, NJ)构建遗传系统进化树, 发现鎧 pIgR 与同属鲤形目鱼类的 pIgR 聚为一簇, 且鎧 pIgR 与团头鲂 pIgR 聚为一个分支, 表明鎧与团头鲂亲缘关系最近(图 4)。

2.4 pIgR 基因在鎧不同组织的表达

pIgR 基因在正常健康鎧的不同组织中均有表达, 其在肝脏中的表达量最高, 其次为脾、肠、头肾、鳃及皮肤, 在中肾、心及脑组织中具有较低的表达量, 在鎧肌肉中 *pIgR* 基因的相对表达量最低(图 5)。

2.5 鲔感染嗜水气单胞菌后 *pIgR* 基因的表达变化

鎧感染嗜水气单胞菌后, 肠、鳃、肝、脾脏及头肾中 *pIgR* 基因的表达量在感染的 28 d 内, 呈先升高后降低的趋势(图 6)。鎧头肾中 *pIgR* 基因的表达水平在感染后 3 d 显著性升高, 在感染 7 d 达到最高水平(9.38 倍, $P<0.01$), 然后在感染 28 d 降至 2.46 倍, 显著性高于对照组($P<0.01$)。在脾脏中, *pIgR* 基因的表达水平在感染后逐渐升高, 在 14 d 达到峰值(15.98 倍, $P<0.01$), 然后逐渐降低, 在感染 28 d 降至 2.61 倍, 但仍然显著性高于对照组($P<0.01$)。在肠与鳃, *pIgR* 基因的表达水平均在感染 5 d 达到峰值, 分别是对照组的 18.63 倍及 16.53 倍($P<0.01$), 然后逐渐下降, 在 28 d 与对照组比较没有显著性差异($P>0.05$)。在肝中, *pIgR* 基因表达水平在感染 1 d 显著性升高, 在 14 d 达到峰值(12.28 倍, $P<0.01$), 然后逐渐降低, 在 28 d 下降至 1.35 倍, 与对照组比较, 没有显著性差异, ($P<0.05$)。

2.6 鲔感染嗜水气单胞菌后的组织病理变化

鎧被嗜水气单胞菌感染 5 d, 通过组织切片与 HE 染色观察发现, 肠道绒毛黏液细胞增多, 肠绒毛宽度增大, 肠壁肌肉层厚度增加(图 7); 头肾与脾脏组织出现炎症细胞侵染, 脾脏中出现大量的空泡细胞; 肝脏肝窦增宽; 鳃丝变形缩短, 鳃丝细胞凋落(图 8)。

3 讨论

3.1 *pIgR* 基因序列特征

本研究克隆获得了鎧 pIgR 基因 cDNA 全长序列, 鮨 pIgR 氨基酸序列与其他鱼类的相似性从高

图 3 鲢 pIgR 氨基酸序列与其他鱼类 pIgR 多重序列比对分析

黑色五角星表示保守的半胱氨酸位点；红色字符表示独特且保守的氨基酸序列。

Fig. 3 Multiple sequence alignment analysis of *Aristichthys nobilis* pIgR amino acid

The black pentagrams indicates conserved cysteine sites. Red characters represent sequence with pIgR of other species

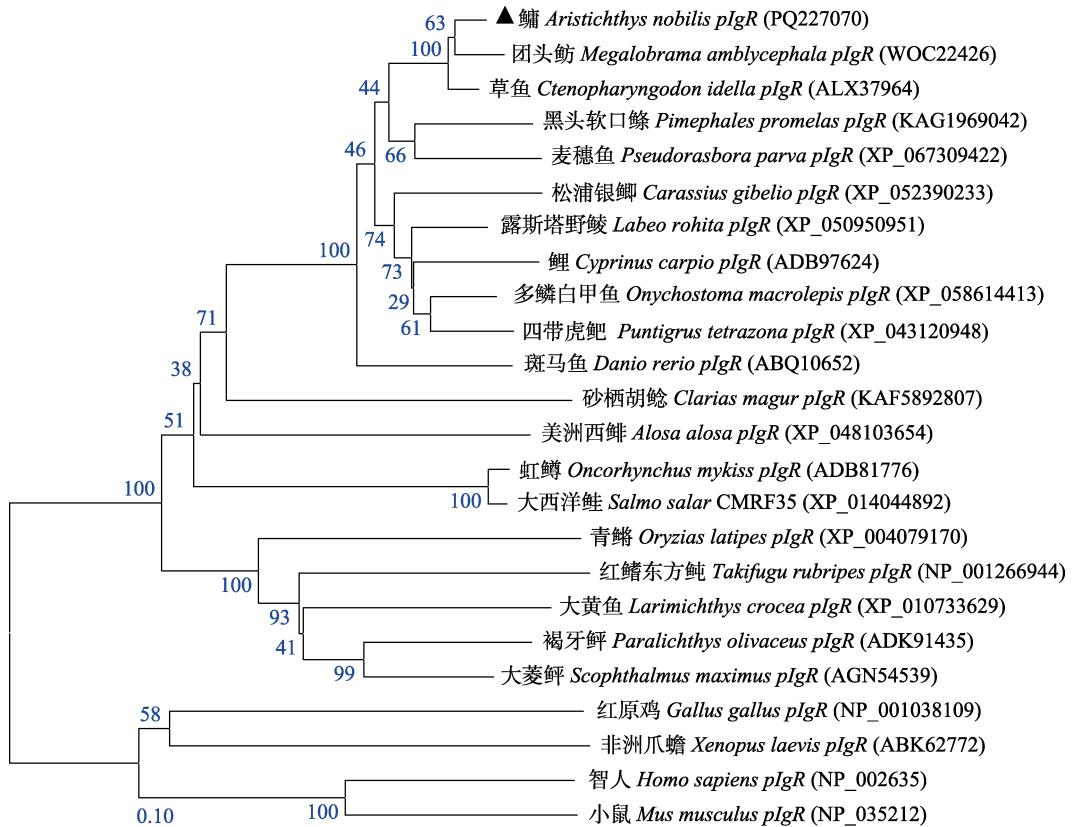
图 4 *pIgR* 基因遗传系统进化树黑色三角形表示**鮳**。

Fig. 4 Genetic phylogenetic tree of *pIgR* gene
The black triangle represents *Aristichthys nobilis*.

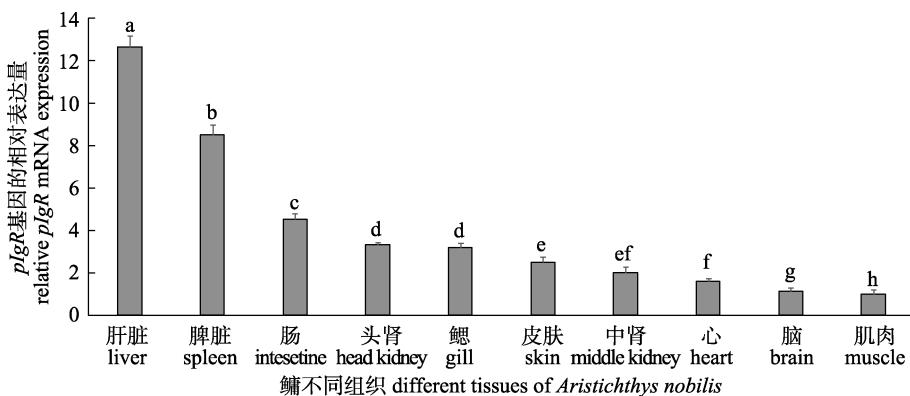
图 5 鮳 *pIgR* 基因在不同组织的相对表达量不同字母表示组织间 *pIgR* 表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Relative expression of *pIgR* gene in different tissues of *Aristichthys nobilis*
Different letters indicate significant difference in *pIgR* expression between different tissue ($P < 0.05$).

到低依次是草鱼(95.68%)、团头鲂(92.56%)、麦穗鱼(84.88%)、鲤(76.87%)、鲫(76.09%)、斑马鱼(75.81%)、泥鳅(69.82%)、虹鳟(51.38%)。鮳 *pIgR* 氨基酸序列与其他鱼类，尤其是鲤科鱼类的 *pIgR* 氨基酸序列具有高度的相似性。通过系统进化树

分析，发现鮳 *pIgR* 与同属鲤科鱼类的 *pIgR* 聚为一支，其原因可能是鮳属于鲤形目鱼类，其与鲤科鱼类具有较近的亲缘关系，其中鮳与团头鲂聚为一个分支，表明鮳与团头鲂亲缘关系最近。

pIgR 氨基酸多重序列比对结果显示，鮳 *pIgR*

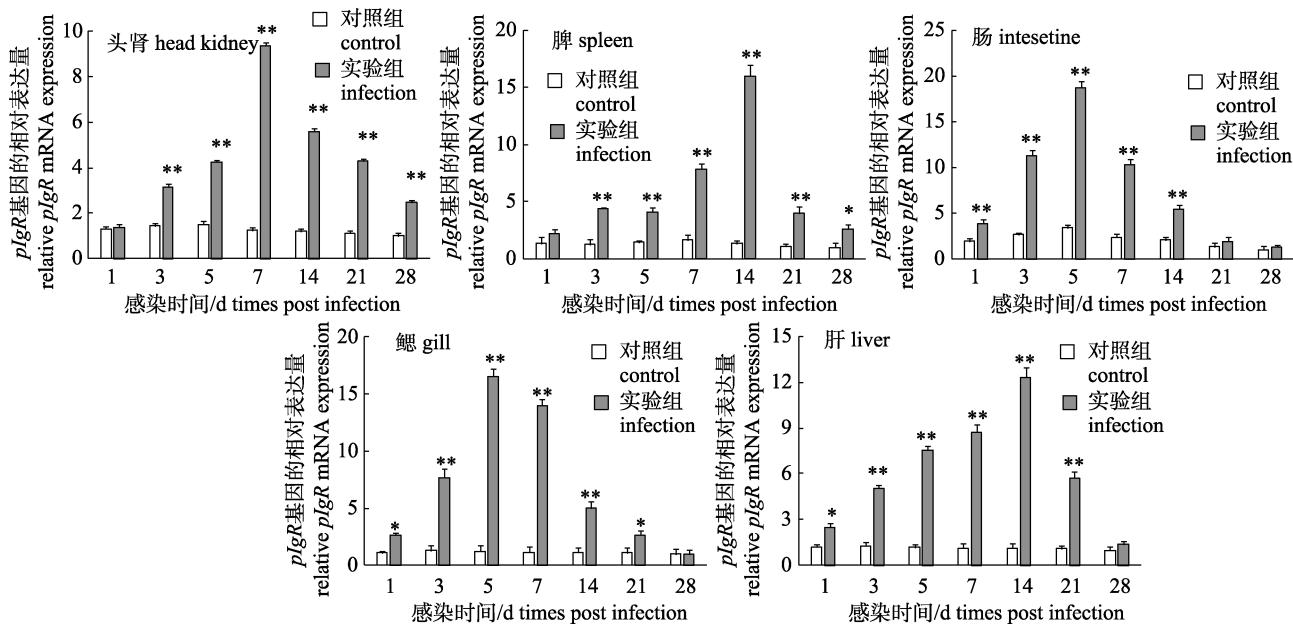
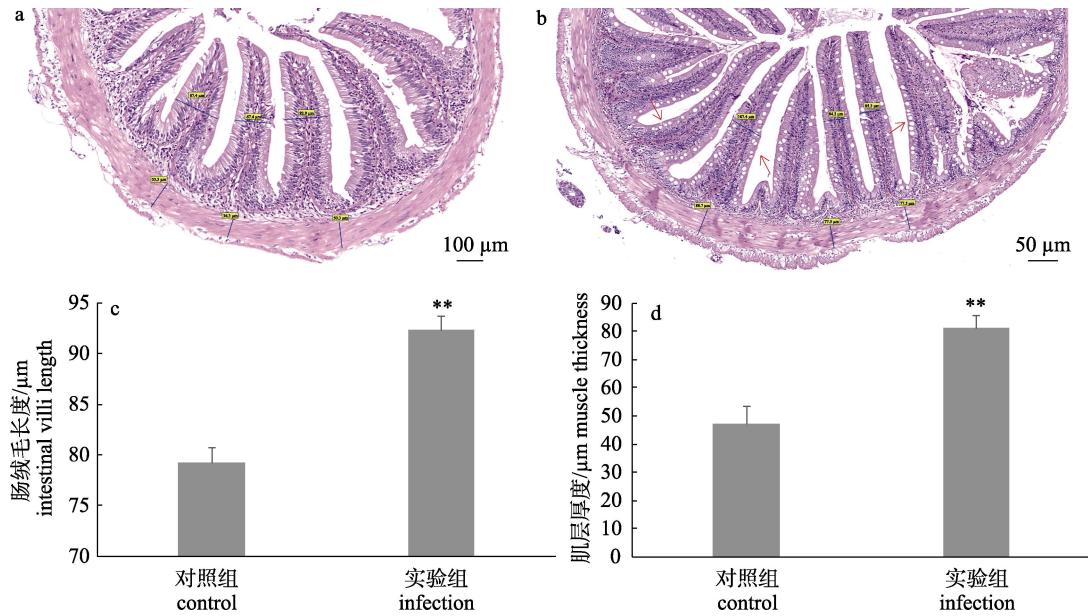
图 6 嗜水气单胞菌感染后鲤 *pIgR* 基因在不同组织的表达变化*表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)。Fig. 6 Changes of *pIgR* gene expression in different tissues of *Aristichthys nobilis* after *Aeromonas hydrophila* infection
* indicates significant difference ($P<0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

图 7 感染嗜水气单胞菌 5 d 后鲤肠组织病理变化

a. 对照组肠; b. 实验组肠; c. 肠绒毛长度; d. 肌层厚度。红色箭头表示黏液细胞; **表示差异极显著($P<0.01$)。Fig. 7 Pathological changes of intestinal tissue of *Aristichthys nobilis* at the 5th day after infection with *Aeromonas hydrophila*
a. Intestines of control group; b. Intestines of experimental group; c. Intestinal villi length; d. Muscle thickness. The red arrows represent the mucus cells. ** is considered an extremely significant difference ($P<0.01$).

和其他硬骨鱼类的 *pIgR* 一样, 其胞外区缺失 ILD2、ILD3 和 ILD4, 只有两个 ILD (ILD1 和 ILD2)^[3]。鲤 *pIgR* 的 ILD1 和 ILD2 中均具有 Kx WC 和 Dx Gx Yx C 的保守序列, 与哺乳动物 *pIgR* 的

ILD1 和 ILD5 具有高度的相似性^[16]。哺乳动物的多聚免疫球蛋白能与 *pIgR* 的 ILD1 与 ILD5 结合, 其在多聚免疫球蛋白的转运过程中起着重要的作用^[15]。鲤 *pIgR* 的 ILD1 和 ILD2 对应哺乳动物 *pIgR*

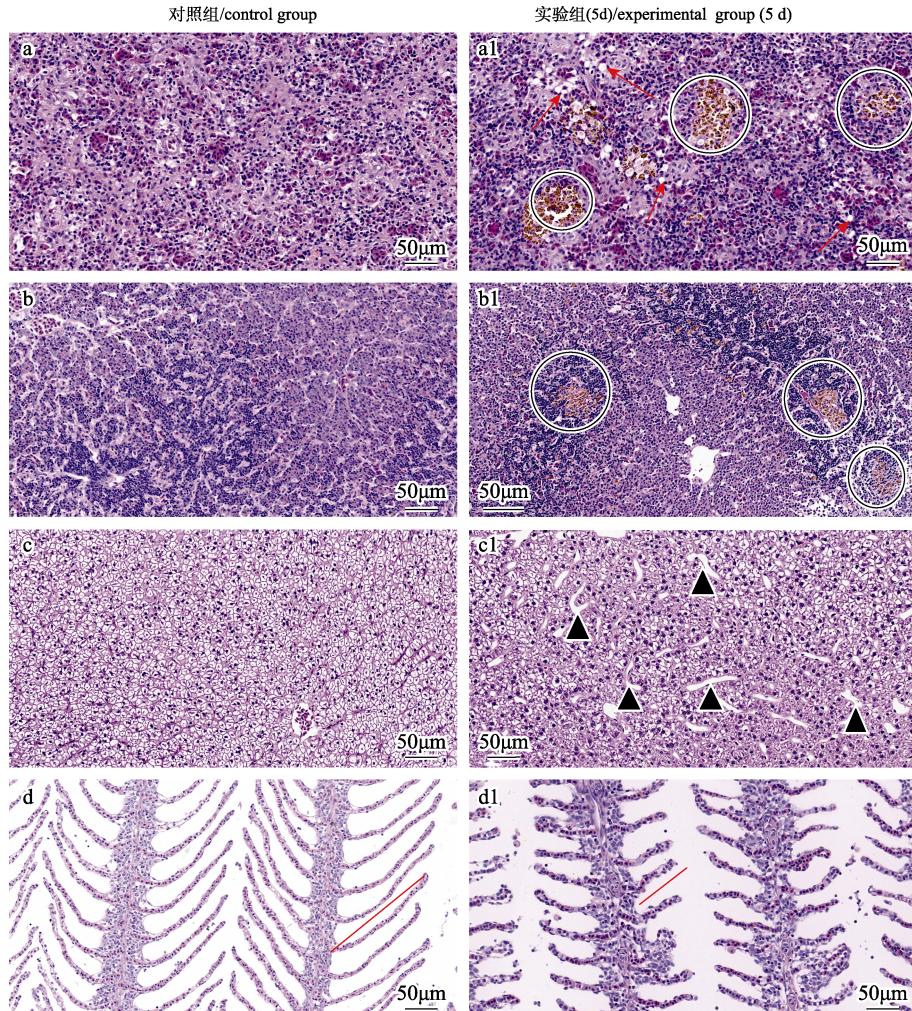


图8 感染嗜水气单胞菌5d鳙头肾、脾脏、肝脏和鳃组织病理变化

a. 对照组脾脏; a1. 实验组脾脏; b. 对照组头肾; b1. 实验组头肾; c. 对照组肝脏; c1. 实验组肝脏; d. 对照组鳃; d1. 实验组鳃。
红色箭头表示空泡细胞, 黑色圈表示炎症细胞, 黑色三角形表示肝窦增宽, 红色直线表示鳃丝长度。

Fig. 8 Pathological changes of head kidney, spleen, liver and gill of *Aristichthys nobilis* at the 5th day after infection with *Aeromonas hydrophila*

a. Spleen of control group; a1. Spleen of experimental group; b. Head kidney of control group; b1. Head kidney of experimental group; c. Liver of control group; c1. Liver of experimental group; d. Gill of control group; d1. Gill of experimental group;
The red arrows indicate vacuolar cells, the black circles indicate inflammatory cells, the black triangles indicate the width of hepatic sinuses, and the red straight line indicates the length of gill filaments.

的ILD1和ILD5,据此推测鳙pIgR的2个ILD也能与多聚免疫球蛋白结合并介导其转运。不同鱼类pIgR的ILD1与ILD2中都包含4个保守且位置相同的半胱氨酸(Cys),哺乳动物pIgR的ILD1与ILD5的这4个保守Cys,可形成2个二硫键,参与β折叠的形成,从而与多聚免疫球蛋白结合。与哺乳动物pIgR的ILD5相比,鳙pIgR的ILD2少2个Cys,哺乳动物ILD5的这2个Cys能与IgA共价结合,表明鳙ILD2和免疫球蛋白结合不需要这2个Cys,推测鳙ILD2与黏液免疫球蛋白

的结合方式和哺乳类动物pIgR的ILD5结合免疫球蛋白的方式不同^[16]。在pIgR与免疫球蛋白结合的过程中,环状互补决定区(complementary determining region, CDR)起着关键的作用^[21]。然而,鳙ILD1中不具有鸟类与哺乳类动物ILD1中所存在的CDR,因此,鳙pIgR与免疫球蛋白的结合方式还有待进一步深入研究。

3.2 pIgR基因的组织表达

pIgR基因在不同鱼类的各种组织中广泛表达(如肠、皮肤、鳃、肝、脾和头肾)^[3-6, 8, 13, 16, 22-24]。

在本研究中, *pIgR* 基因在正常健康鳙的不同组织中均有表达, 其在肝脏中的表达量最高, 在脾、肠、头肾、鳃及皮肤的表达量次之, 在中肾、心及脑组织中具有较低的表达量, *pIgR* 基因在鳙肌肉中的表达水平最低。*pIgR* 基因在鳙各组织中的表达规律与其在团头鲂^[3]、青卿^[8]、鲤^[22]、牙鲆^[13]和海鲋^[25]中的研究结果相似, 其在肝脏中表达量最高。肝脏是重要的解毒与免疫应答器官, 在鱼类肝脏中可以刺激大量免疫相关基因的表达来提高免疫防御, 此外, 在鱼的胆管和毛细血管中检测到黏膜 IgM^[26-27]。肝脏中的 *pIgR* 在介导黏液 IgM 从肝脏经胞吞入胆汁, 继而进入肠道中, 发挥了重要作用^[27]。牙鲆 *pIgR* 基因的相对表达量在皮肤、鳃、肠和肝脏中较高, 在前肾和脾脏中次之, 在肌肉和胃中表达量最低^[19]。青卿与大鳞副泥鳅 *pIgR* 基因在黏膜免疫相关组织中具有较高的表达量^[5,8]。通过原位杂交检测发现 *pIgR* 主要分布于鲤与红鳍东方鲀的黏膜免疫相关组织(肠上皮细胞和皮肤)^[16,22]。在本研究中, 鳙 *pIgR* 基因在皮肤、鳃和肠道等黏膜免疫组织中均有较高的表达, 表明 *pIgR* 可能在鳙黏膜免疫系统中发挥重要的作用。

3.3 *pIgR* 基因的免疫响应

不同的病原刺激, *pIgR* 基因的免疫应答规律不同。大菱鲆在灭活鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激 72 h 内, 皮肤、鳃、胃、肠、脾脏、肝和头肾中 *pIgR* 基因的转录水平先升高后降低^[6]。泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)感染小瓜虫, *pIgR* 基因在鳃、皮肤、肾脏和脾脏中的表达量均在感染后 14 d 达到峰值^[5]。本研究对鳙进行腹腔注射感染嗜水气单胞菌, 鳡头肾、脾脏、肝、肠和鳃中 *pIgR* 基因的转录水平在感染的 28 d 内呈先升高后降低的趋势, 表明嗜水气单胞菌能诱导鳙 *pIgR* 基因的表达, 在健康鳙各组织中 *pIgR* 基因均有不同水平的表达, 因此, *pIgR* 基因在鳙体内的表达模式是诱导型和组成型同时存在。大菱鲆经灭活鳗弧菌浸泡刺激后, *pIgR* 基因的转录水平在鳃中 8 h 出现峰值, 在胃中 12 h 出现峰值, 在肝、肠和皮肤中 24 h 达到峰值, 而在头肾和脾中 48 h 出现峰值^[6]。鳙感染嗜水气单胞菌后, *pIgR* 基因的表达量

在肠和鳃中在感染 5 d 达到最大值, 头肾中 *pIgR* 基因的表达水平在 7 d 达到峰值, 脾和肝脏中 *pIgR* 基因在 14 d 达到峰值, *pIgR* 基因在黏膜免疫相关组织(鳃和肠)达到峰值的时间要早于系统免疫相关组织(头肾和脾脏), 且在黏膜免疫组织中达到峰值的相对表达量高于其在系统免疫组织的相对表达量, 表明在鳙抵御嗜水气单胞菌感染过程中, *pIgR* 可能在黏膜免疫系统起到重要作用。

3.4 嗜水气单胞菌感染后组织病理变化

嗜水气单胞菌可引发鱼类的败血症和内脏出血。鱼类的肝脏不仅具有解毒的功能, 同时能分泌大量的抗应激与免疫相关因子参与免疫防御^[27]。青卿感染嗜水气单胞菌后, 肝脏有明显的出血症状, 且细胞出现空泡^[8]。团头鲂经肛门灌注感染嗜水气单胞菌, 肝脏组织出血, 肝窦增宽^[3]。在本研究中, 鳡经腹腔注射感染嗜水气单胞菌, 肝脏出现肝窦增宽, 结构紊乱的现象, 表明嗜水气单胞菌感染鳙, 导致肝脏组织受损, 其解毒与免疫防御功能降低。

肠与鳃是鱼类重要的黏膜免疫组织, 在抵御病原感染过程中起着关键的作用。青卿被嗜水气单胞菌感染, 鳃丝萎缩变短, 肠绒毛缩短, 杯状细胞增多^[8]。香鱼感染嗜水气单胞菌, 病鱼鳃表面纤毛破损, 鳃小片结构崩解形成空泡, 造成病鱼严重的呼吸系统障碍, 肠道黏膜表面的隐窝和上皮内出现大量杯状细胞, 这些杯状细胞主要功能是分泌黏液蛋白, 这些蛋白覆盖在黏膜表面不仅可以保护其不被细菌侵染, 而且可以分泌溶菌酶起到杀菌的作用^[28]。团头鲂经肛门灌注感染嗜水气单胞菌, 肠道充血, 肠绒毛变形, 宽度增宽, 肠壁增厚, 鳃丝细胞萎缩, 鳃丝缩短变形^[3]。鳙经腹腔注射感染嗜水气单胞菌, 肠道绒毛黏液细胞增多, 肠绒毛增宽, 肠壁肌肉层增厚, 表现出明显的肠道炎症症状。鳙在感染嗜水气单胞菌 5 d, 鳃丝缩短变形, 鳃丝细胞凋落, 表明嗜水气单胞菌感染不仅导致鳙的黏膜免疫系统遭到破坏, 也影响其呼吸系统和消化系统功能。

头肾与脾脏是鱼类重要的系统免疫组织, 香鱼感染嗜水气单胞菌后, 脾脏组织出血, 脾脏中出现大量的淋巴细胞、浆细胞, 发生炎症反应^[28]。

青卿被嗜水气单胞菌感染，脾脏出现炎症细胞感染，导致青卿的造血和免疫功能下降^[8]。嗜水气单胞菌分泌的组织毒素、气胞毒素、溶血素等毒性蛋白，可破坏细胞膜结构，导致细胞出现空泡和凋亡现象，造成组织损伤^[29-30]。团头鲂感染嗜水气单胞菌，头肾组织间隙增宽，结构紊乱，脾肿大，脾脏体指数显著高于对照组，脾脏与头肾组织出现大量的炎症细胞^[3]。鳙被嗜水气单胞菌感染5 d，头肾与脾脏组织均出现炎症细胞感染，且脾脏中出现大量的空泡细胞，表明嗜水气单胞菌感染导致鳙头肾与脾脏组织损伤，结构坏死，鱼体免疫系统被破坏，这可能是鳙患败血症在短期内大量死亡的主要原因之一。

参考文献：

- [1] Stosik M, Tokarz-Deptula B, Deptula W. Polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in ray-finned fish (*Actinopterygii*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 138: 108814.
- [2] Etayo A, Bjørgen H, Hordvik I, et al. Possible transport routes of IgM to the gut of teleost fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2024, 149: 109583.
- [3] Xia H, Liu L G, Zhou W, et al. Immune response to *Aeromonas hydrophila* and molecular characterization of polymeric immunoglobulin receptor in juvenile *Megalobrama amblycephala*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2024, 153: 109821.
- [4] Pei C, Sun X Y, Zhang Y, et al. Molecular cloning, expression analyses of polymeric immunoglobulin receptor gene and its variants in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and binding assay of the recombinant immunoglobulin-like domains[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 88: 472-479.
- [5] Yu Y Y, Liu Y Z, Li H L, et al. Polymeric immunoglobulin receptor in dojo loach (*Misgurnus anguillicaudatus*): Molecular characterization and expression analysis in response to bacterial and parasitic challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 73: 175-184.
- [6] Ding B J, Sheng X Z, Tang X Q, et al. Molecular cloning and expression analysis of the pIgR gene in *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(4): 792-801. [丁冰洁, 绳秀珍, 唐小千, 等. 大菱鲆多聚免疫球蛋白受体基因的克隆及表达分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 792-801.]
- [7] Ji J X, Zhang L, Li L, et al. Molecular cloning and functional analysis of polymeric immunoglobulin receptor, pIgR, gene in mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 137: 108732.
- [8] Xia H, Yang P H, Chen Z Y, et al. Polymeric immunoglobulin receptor in dongtingking crucian carp (*Carassius auratus indigenitus*): Molecular characterization and expression analysis in response to *Aeromonas hydrophila* challenge[J]. Aquaculture Research, 2022, 53(10): 3818-3827.
- [9] Xu J H, Wu Y, Xu C, et al. Characterization of the *Pelodiscus sinensis* polymeric immunoglobulin receptor (*P. sinensis* pIgR) and its response to LPS and *Aeromonas sobria*[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2021, 121: 104072.
- [10] Ametrano A, Picchietti S, Guerra L, et al. Comparative analysis of the pIgR gene from the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii* reveals distinctive features of cold-adapted notothenioidei[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14): 7783.
- [11] Etayo A, Bjørgen H, Koppang E O, et al. The teleost polymeric Ig receptor counterpart in ballan wrasse (*Labrus bergylta*) differs from pIgR in higher vertebrates[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2022, 249: 110440.
- [12] Xu G, J Zhang J L, Ma R F, et al. The immune response of pIgR and Ig to *Flavobacterium columnare* in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 117: 320-327.
- [13] Kim K H, Park S, Park J W, et al. Analysis of polymeric immunoglobulin receptor expression in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against viral hemorrhagic septicemia virus[J]. Development & Reproduction, 2023, 27(2): 67-75.
- [14] Yang S, Yuan X Y, Kang T, et al. Molecular cloning and binding analysis of polymeric immunoglobulin receptor in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Molecular Immunology, 2021, 133: 14-22.
- [15] Neves F, De Sousa-Pereira P, Melo-Ferreira J, et al. Evolutionary analyses of polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in the mammals reveals an outstanding mutation rate in the lagomorphs[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 1009387.
- [16] Hamuro K, Suetake H, Saha N R, et al. A teleost polymeric Ig receptor exhibiting two Ig-like domains transports tetrameric IgM into the skin[J]. Journal of Immunology, 2007, 178(9): 5682-5689.
- [17] Sheng X Z, Qian X Y, Tang X Q, et al. Polymeric

- immunoglobulin receptor mediates immune excretion of mucosal IgM-antigen complexes across intestinal epithelium in flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1562.
- [18] Sheng X Z, Chai B H, Wang Z F, et al. Polymeric immunoglobulin receptor and mucosal IgM responses elicited by immersion and injection vaccination with inactivated *Vibrio anguillarum* in flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 505: 1-11.
- [19] Xu G J, Zhan W B, Ding B J, et al. Molecular cloning and expression analysis of polymeric immunoglobulin receptor in flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 653-660.
- [20] Kong W G, Cao J F, Cheng G F, et al. Research progress and prospects of mucosal B cells and immunoglobulins of teleost fish[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2023, 68: 1869-1883. [孔维光, 曹佳烽, 程高峰, 等. 硬骨鱼类黏膜 B 细胞和免疫球蛋白研究进展[J]. 科学通报, 2023, 68: 1869-1883]
- [21] Wei H, Wang J Y. Role of polymeric immunoglobulin receptor in IgA and IgM transcytosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(5): 2284.
- [22] Rombout J H W M, Van Der Tuin S J L, Yang G, et al. Expression of the polymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR) in mucosal tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 620-628.
- [23] Feng L N, Lu D Q, Bei J X, et al. Molecular cloning and functional analysis of polymeric immunoglobulin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2009, 154(3): 282-289.
- [24] Kortum A N, Rodriguez-Nunez I, Yang J B, et al. Differential expression and ligand binding indicate alternative functions for zebrafish polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) and a family of pIgR-like (PIGRL) proteins[J]. *Immunogenetics*, 2014, 66(4): 267-279.
- [25] Yang S S, Liu S S, Qu B, et al. Identification of sea bass pIgR shows its interaction with vitellogenin inducing antibody-like activities in HEK 293T cells[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 63: 394-404.
- [26] Popović N T, Čižmek L, Babić S, et al. Fish liver damage related to the wastewater treatment plant effluents[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2023, 30(17): 48739-48768.
- [27] Abelli L, Coscia M R, De Santis A, et al. Evidence for hepato-biliary transport of immunoglobulin in the Antarctic teleost fish *Trematomus bernacchii*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2005, 29(5): 431-442.
- [28] Li M Y, Zhang C N, Miao L, et al. Histopathological changes in main target organs of AYU (*Plecoglossus altivelis*) infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2011, 24(3): 1-4. [李明云, 张呈念, 苗亮, 等. 香鱼嗜水气单胞菌染病后主要靶器官组织病理学观察[J]. 宁波大学学报(理工版), 2011, 24(3): 1-4.]
- [29] Chen J H, Wei W Y, Liang C, et al. Protective effect of cinnamaldehyde on channel catfish infected by drug-resistant *Aeromonas hydrophila*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 167: 105572.
- [30] Srivastava A, Mistri A, Mittal S, et al. Alterations in the epidermis of the carp, *Labeo rohita* (Cyprinidae: Cypriniformes), infected by the bacteria, *Aeromonas hydrophila*: A scanning electron microscopic, histopathological and immunohistochemical investigation[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2020, 43(8): 941-953.

Immune responses of *pIgR* gene and histopathological changes in *Aristichthys nobilis* after being infected with *Aeromonas hydrophila*

Xia Hu^{1,2}, Ding Cheng², Liu Liangguo², YANG Xinyue², BU Jianchao², Chen Fuyan³, XIANG Guangqing⁴, HUANG Jiezheng⁴, YANG Pinhong¹

1. Key Laboratory of Featured Aquaculture, College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Hunan Applied and Technology University, Changde 415000 China;
2. Hunan Province Aquatic Biological Resources Yuanjiang Lishui Monitoring Station; Changde Key Innovation Team for wetland biology and Environmental Ecology; College of life and environmental sciences, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China;
3. Key Laboratory of Aquaculture genetic and breeding and Healthy Aquaculture of Guangxi; Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China;
4. Longshan County Animal Husbandry Aquatic Affairs Center, Xiangxi Tujia and Miao Autonomous Prefecture 416000, China

Abstract: Polymeric immunoglobulin receptor (*pIgR*) is an important fish mucosal immune factor, which plays a key role in mediating the secretion and transport of polyimmunoglobulin into the mucus of mucosal immune tissue. In this study, the full-length cDNA sequence of *Aristichthys nobilis pIgR* gene was cloned using PCR and RACE technology. The full-length cDNA sequence of *Aristichthys nobilis pIgR* gene was 1885 bp, and its open reading frame (ORF) was 1008 bp, encoding 336 amino acids. *Aristichthys nobilis pIgR* had a signal peptide sequence, followed by the extracellular region, transmembrane region, and intracellular region. The extracellular region included two immunoglobulin-like domains (ILD), and its tertiary structure was twisted “L”. The phylogenetic tree was constructed using the NJ method. The results showed that the *pIgR* gene of *Aristichthys nobilis* was clustered with the *pIgR* of cypriniformes. The expression level of the *pIgR* gene in different tissues of *Aristichthys nobilis* was detected using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The highest expression level of *pIgR* gene was found in the liver, followed by the spleen, intestine, head kidney, gill, and skin. A low expression level was found in the middle kidney, heart, and brain, and the lowest expression level was found in the muscle. *Aristichthys nobilis* was infected with *Aeromonas hydrophila* at 5 d. The pathological changes in immune-related tissues with a high expression level of the *pIgR* gene were observed using tissue sections and HE staining. It was found that the intestinal villus mucous cells increased, the width of the intestinal villi widened, and the intestinal wall thickened, showing prominent symptoms of intestinal inflammation. Many inflammatory cells appeared in the head kidney and spleen, and many vacuolar cells were observed in the spleen. The width of the hepatic sinuses increased. The gill filament was deformed and shortened, and the gill cell withered. The expression level of *Aristichthys nobilis pIgR* gene in the gill, intestine, spleen, liver, and head kidney increased first and then decreased within 28 d after being infected with *Aeromonas hydrophila*. The relative expression of *pIgR* gene reached the peak at 5 d in the intestine and gill, and reached the maximum at 7 d in the head kidney and 14 d in the spleen and liver after infection, respectively. The relative expression level of the *pIgR* gene at the peak in the intestine (18.63 fold) and gill (16.53 fold) of *Aristichthys nobilis* was higher than that in the head kidney (9.38 fold), spleen (15.98 fold), and liver (12.28 fold). The experimental results showed that *Aeromonas hydrophila* infection not only caused immune-related tissue lesions and triggered the inflammation responses but also affected the respiratory system and digestive system of *Aristichthys nobilis*. *pIgR* may play a key role in the mucosal immune system of *Aristichthys nobilis* against bacterial infection.

Key words: polymeric immunoglobulin receptor; *Aristichthys nobilis*; immune response; *Aeromonas hydrophila*; histopathology

Corresponding author: YANG Pinhong. E-mail: yph588@163.com