

doi: 10.7541/2019.041

嗜水气单胞菌感染青鱼肝脏的蛋白质组学分析

刘 问

(湖州师范学院生命科学学院, 浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室, 湖州 313000)

摘要: 采用同重同位素标记相对与绝对定量(iTRAQ)结合液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)技术, 分析嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)后青鱼肝脏组织的差异表达蛋白。以致病性嗜水气单胞菌菌株BCK0712注射感染健康青鱼, 24h后采集感染组和对照组青鱼肝脏, 开展蛋白质组学分析。通过数据库检索, 共鉴定到4475个肝脏组织蛋白, 从中筛选到188个差异表达蛋白, 其中表达上调的蛋白70个, 表达下调的蛋白118个。经生物信息学分析, 表明这些差异表达蛋白主要参与了补体和凝血级联反应、剪接体、细胞内吞作用、氧化磷酸化、碳代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、色氨酸代谢等通路。组织病理分析表明, 青鱼感染嗜水气单胞菌后肝脏出现了明显的病理变化, 主要表现为肝细胞边界不分明、细胞核固缩、肝板排列紊乱、有出血现象等。研究结果为进一步深入探究嗜水气单胞菌的致病机制提供了理论基础。

关键词: 青鱼; 嗜水气单胞菌; 肝脏; iTRAQ

中图分类号: S945.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2019)02-0330-10

青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)是我国传统淡水养殖的“四大家鱼”之一, 具有生长快、产量高、肉味鲜美等特点, 深受广大消费者的喜爱。据统计, 2017年我国养殖青鱼年产量达 6.32×10^8 kg, 主产区为江苏、安徽、江西、浙江、湖北等省^[1]。随着青鱼养殖业的快速发展, 养殖面积不断扩大, 集约化程度不断提高, 养殖水质易恶化, 在养殖过程中青鱼病害频发, 其中以嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染引起的病害最为严重, 造成了较大的经济损失^[2-6]。嗜水气单胞菌广泛存在于淡水、污水及土壤中, 是淡水养殖鱼类的主要致病菌。在嗜水气单胞菌侵入鱼体后, 先在肠道内增殖, 再经门动脉循环进入肝脏、肾脏及其他组织, 引起肝脏、肾脏等器官以及血液病变, 继而出现全身症状。在我国, 嗜水气单胞菌是危害养殖鱼种类最多、影响区域最广、流行季节最长、发病率和死亡率高、造成经济损失最严重的细菌性病原^[7-13], 对我国水产养殖业构成了严重威胁。

鱼类肝脏具有分泌胆汁、排毒、储存糖元等功能, 是机体维持生理机能最核心的器官之一。在鱼体受嗜水气单胞菌侵染后, 肝脏表现出不同程度

的病理变化, 如肿大、充血或失血等, 显微镜检可见血源性色素沉着、肝细胞肿胀、变性、坏死、崩解等症状。目前, 鲜见应用蛋白质组学方法研究嗜水气单胞菌对鱼体肝脏的分子致病机制方面的报道。本研究采用iTRAQ蛋白质组学技术, 通过分析嗜水气单胞菌感染青鱼前后青鱼肝脏组织蛋白表达的变化, 及差异表达蛋白主要参与的生物过程及信号通路等, 探讨嗜水气单胞菌对青鱼的致病机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康青鱼购自浙江湖州市某养殖场, 平均体重为186 g, 养殖水温为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

1.2 主要仪器

Easy nLC色谱系统(Thermo Scientific)、Q Exactive质谱仪(Thermo Scientific)、AKTA Purifier 100纯化仪(GE Healthcare)、Multiskan FC酶标仪(Thermo Scientific)、低温高速离心机(Eppendorf 5430R)、真空离心浓缩仪(Eppendorf Concentrator Plus)、MP Fastprep-24匀浆仪(MP Biomedicals)、

收稿日期: 2018-04-24; 修订日期: 2018-10-21

基金项目: 国家自然科学基金(31502203)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31502203)]

通信作者: 刘问(1978—), 女, 浙江金华人; 博士, 副研究员; 研究方向为水产动物病害。E-mail: zjwy-lw@163.com

超声破碎仪(宁波新芝JY92-II)、Votex振荡器(上海琪特QT-1)。

1.3 青鱼感染试验

采用致病性嗜水气单胞菌菌株BCK0712(由本实验室分离自发病青鱼),腹腔注射感染健康青鱼,注射剂量为 7.60×10^5 cfu/g组织,每组注射5尾青鱼,对照组注射生理盐水,实验水温为 26°C 。在注射24h后,采集感染组和对照组青鱼肝脏,分装后 -80°C 冻存。同时对感染组和对照组的青鱼进行细菌分离和鉴定,对其是否感染嗜水气单胞菌进行确认。

1.4 蛋白质提取及酶解

取50—100 mg肝脏组织加入1 mL SDT裂解液(4% SDS, 100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L DTT, pH 7.6),匀浆后超声破碎,沸水浴15min, $14000 \times g$ 离心40min,取上清。采用BCA法进行蛋白质定量。分装样品, -80°C 冻存。

取30 μL 蛋白质溶液,分别加入DTT至终浓度为100 mmol/L,沸水浴5min,冷却至室温。加入200 μL UA缓冲液(8 mmol/L尿素, 150 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)混匀, $14000 \times g$ 离心15min,弃上清。加入100 μL IAA缓冲液(100 mmol/L IAA于UA),振荡混匀,室温避光反应30min,离心,弃上清。加入100 μL UA缓冲液, $14000 \times g$ 离心15min(重复2次)。加入100 μL 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液, $14000 \times g$ 离心15min(重复2次)。加入40 μL Trypsin溶液(40 μg Trypsin于40 μL 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液),振荡1min, 37°C 放置16—18h。离心取上清,测定 OD_{280} 。

1.5 iTRAQ试剂标记

各样品分别取100 μg 肽段,按照AB SCIEX公司iTRAQ标记试剂盒说明书进行标记。

1.6 强阳离子交换色谱分离

将每组标记后的肽段混合,采用AKTA Purifier 100进行分级(A液: 10 mmol/L KH_2PO_4 , 25% ACN, pH 3.0; B液: 10 mmol/L KH_2PO_4 , 500 mmol/L KCl, 25% ACN, pH 3.0)。进柱后以1 mL/min的速率进行梯度洗脱,梯度洗脱如下: 0—22min, B液线性梯度从0—8%; 22—47min, B液线性梯度从8%—52%; 47—50min, B液线性梯度从52%—100%; 50—58min, B液维持在100%; 58min以后, B液重置为0。洗脱过程中监测214 nm的吸光度值,将每个组分脱盐并冻干。

1.7 质谱分析

高效液相色谱 采用纳升流速的HPLC液相系统Easy nLC进行分离(A液: 0.1%甲酸水溶液; B液: 0.1%甲酸乙腈水溶液,其中乙腈为84%)。色

谱柱以95%的A液平衡,样品上样到上样柱(Thermo Scientific Acclaim PepMap100, $100 \mu\text{m} \times 2 \text{cm}$, nano-Viper C18),经过分析柱(Thermo scientific EASY column, $75 \mu\text{m} \times 10 \text{cm}$, $3 \mu\text{m}$, C18-A2)分离,流速为300 nL/min。梯度洗脱如下: 0—50min, B液线性梯度从0—35%; 50—55min, B液线性梯度从35—100%; 55—60min, B液维持在100%。

质谱鉴定 样品经色谱分离后用Q-Exactive质谱仪进行质谱分析。分析时长为60min,检测方式为正离子,母离子扫描范围是300—1800 m/z。一级质谱分辨率: m/z为200时70000, AGC target为 3×10^6 ,一级最大(Maximum) IT为10ms,扫描范围数(number of scan ranges)为1,动态排除(Dynamic exclusion)为40.0s。多肽和多肽碎片的质量电荷比按以下方法采集:每次全扫描(full scan)后采集10个碎片图谱,二级质谱激活类型(MS2 Activation Type)为HCD,隔离窗(Isolation window)为2 m/z。二级质谱分辨率: m/z为200时17500,微碎片图谱数(microscans)为1,二级Maximum IT为60ms,规一化碰撞能量(Normalized collision energy)为30eV,填充率(Underfill ratio)为0.1%。

1.8 数据分析

用软件Mascot 2.2和Proteome Discoverer 1.4进行查库鉴定及定量分析。本实验使用的数据库为NCBI_Cyprinidae_420850_20161102.fasta(序列总数: 420850)。搜索参数设置如下:胰蛋白酶消化;胰酶消化最多允许2个漏切点;一级离子质量容差为0.002%;二级离子质量容差为0.1 Da;固定修饰分别为Carbamidomethyl (C)、iTRAQ8plex (K)和TRAQ8plex (N-term);可变修饰为Oxidation (M)和iTRAQ8plex (Y)。依据蛋白质丰度水平,当差异倍数 ≥ 1.2 (上调)或 ≤ 0.83 (下调),且经统计检验其 $P < 0.05$ 时,视为差异表达蛋白质。

1.9 生物信息学分析

采用数据库中的注释信息,分析筛选出来的差异表达蛋白,通过GO (Gene Ontology)分析数据库(<http://www.geneontology.org/>)进行GO分析,从参与的生物过程(Biological process, BP)、分子功能(Molecular function, MF)及细胞组分(Cellular Component, CC)三个方面进行显著性分析。通过KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库(<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)分析差异表达蛋白主要参与的生化代谢途径和信号转导途径。

1.10 感染青鱼的组织病理分析

取注射感染嗜水气单胞菌BCK0712菌株24h后的青鱼和对照组青鱼,解剖后取其肝脏组织,用

4%多聚甲醛固定,石蜡包埋后进行切片,以苏木精-伊红染色法染色,中性树脂包埋,显微镜观察和拍照。

2 结果

2.1 感染青鱼的发病症状

健康青鱼在注射感染嗜水气单胞菌24h后,出现了体色发黑、鳃盖充血、鳍基充血、内脏充

血、肛门红肿、肠腔内有气体、腹腔内积有红色腹水等症状(图1)。

2.2 差异表达蛋白统计

本实验共鉴定到肽段14905个,鉴定到蛋白数量为4475个。通过分析,筛选到青鱼肝脏组织的差异表达蛋白共计188个,其中表达上调的差异蛋白70个(表1按差异显著性列出前21个),表达下调的差异蛋白118个(表2按差异显著性列出前55个)。

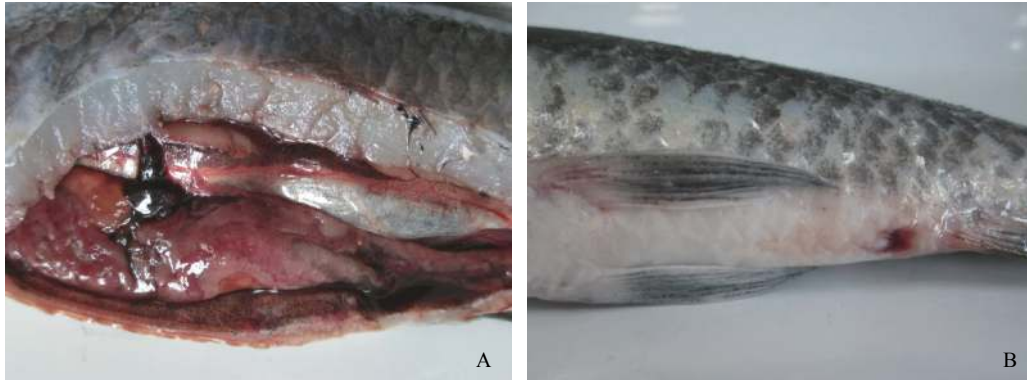


图1 感染嗜水气单胞菌的青鱼症状

Fig. 1 The signs of black carp infected with *A. hydrophila*

A. 感染青鱼的内脏充血; B. 感染青鱼的肛门红肿

A. Strong congestion in the internal organs of black carp; B. Hemorrhages in the anal area of black carp

表1 在嗜水气单胞菌感染青鱼后青鱼肝脏组织表达上调的差异蛋白

Tab. 1 Up-regulated proteins in liver of *A. hydrophila* infected black carp

序号 No.	登录号 Accession	蛋白质名称 Protein Name	分子量 MW [kD]	等电点 pI	比值 Ratio
1	XP_016098250.1	Protein THEMIS2-like	75.75	5.05	2.36
2	KTF75272.1	Hypothetical protein cypCar_00037217	104.16	8.32	2.12
3	BAB39390.1	Matrix metalloproteinase 9	75.79	5.72	1.99
4	XP_016122066.1	Probable proline dehydrogenase 2	13.84	9.50	1.91
5	ADK27719.1	Catalase	59.53	7.44	1.86
6	KTF76084.1	Hypothetical protein cypCar_00042005	53.29	9.11	1.85
7	NP_998083.1	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2A	32.03	5.55	1.84
8	KTG44407.1	Hypothetical protein cypCar_00026988	224.45	6.39	1.79
9	NP_001002461.1	Thioredoxin	11.87	5.50	1.71
10	BAA20510.1	Alpha-globin	15.42	8.85	1.71
11	XP_009300690.1	Selenocysteine lyase isoform X3	35.68	7.50	1.70
12	NP_001018529.1	Cytosolic beta-glucosidase	53.40	5.71	1.66
13	XP_016334193.1	Sodium- and chloride-dependent creatine transporter 1-like	10.89	4.28	1.61
14	ACG63706.2	Heat shock protein 70	70.47	5.52	1.58
15	XP_016132731.1	Polyubiquitin-C	94.08	7.39	1.54
16	AAI17661.1	LOC556764 protein	59.18	8.92	1.54
17	KTG01183.1	Hypothetical protein cypCar_00013788	52.72	6.76	1.52
18	XP_016346000.1	Nucleolysin TIA-1-like	38.35	8.32	1.52
19	XP_009299911.1	Lysosome membrane protein 2	58.40	7.55	1.51
20	XP_016426599.1	Acetyl-coenzyme A synthetase	61.66	6.86	1.51
21	XP_016356492.1	60S ribosomal protein L6-like	29.48	10.87	1.50

表 2 在嗜水气单胞菌感染青鱼后青鱼肝脏组织表达下调的差异蛋白
Tab. 2 Down-regulated proteins in liver of *A. hydrophila* infected black carp

序号 No.	登录号 Accession	蛋白质名称 Protein Name	分子质量 MW [kD]	等电点 pI	比值 Ratio
1	ACO51154.1	Alpha-2-HS-glycoprotein	25.62	5.67	0.13
2	KTF72616.1	Hypothetical protein cypCar_00043615	13.05	10.29	0.21
3	BAD83654.1	Glutamate dehydrogenase	54.28	8.47	0.31
4	XP_016142847.1	Eukaryotic elongation factor 2 kinase-like	47.34	6.52	0.31
5	XP_001334640.2	Complement C4-B	192.60	6.98	0.34
6	AIU34721.1	Retinol binding protein 4	22.11	5.27	0.38
7	XP_016117970.1	Solute carrier family 25 member 38-B-like	25.64	9.92	0.40
8	XP_016340901.1	Cathepsin Z-like	21.72	8.53	0.44
9	XP_016324837.1	Death-associated protein-like 1-B isoform X2	10.07	10.33	0.46
10	XP_016143154.1	Hemoglobin subunit beta-like	16.24	7.37	0.47
11	XP_016150394.1	COP9 signalosome complex subunit 3-like	41.21	7.08	0.50
12	XP_016103361.1	Tripartite motif-containing protein 16-like	62.15	7.84	0.51
13	KTF85521.1	Hypothetical protein cypCar_00043812	16.98	5.31	0.51
14	ALO79151.1	Alpha-globin	10.05	7.64	0.52
15	NP_861429.1	Annexin A4	35.61	6.46	0.53
16	KTG44622.1	Hypothetical protein cypCar_00002861	35.29	8.28	0.54
17	XP_016086549.1	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B-like isoform X1	19.89	4.70	0.56
18	Q6PEH5.1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	16.31	8.09	0.57
19	AMK52075.1	Calpastatin	93.67	6.19	0.57
20	NP_001243141.1	Phospholemman precursor	9.85	8.21	0.57
21	KTG46365.1	Hypothetical protein cypCar_00033880	29.09	6.11	0.58
22	XP_016314456.1	Histone H1x-like	18.01	10.30	0.58
23	KTF86536.1	Hypothetical protein cypCar_00043986	22.64	8.09	0.58
24	AGJ03173.1	Metallothionein	5.22	8.13	0.58
25	XP_016355091.1	Uncharacterized protein LOC107698567 isoform X1	68.51	5.72	0.58
26	AAI52645.1	Brd3b protein	53.36	9.23	0.59
27	AAI34902.1	LOC566865 protein	43.58	6.99	0.59
28	XP_016431965.1	Dehydrogenase/reductase SDR family member 11-like	27.79	6.84	0.59
29	BAA36622.1	Complement C3-Q1	130.40	7.21	0.59
30	KTF91553.1	Hypothetical protein cypCar_00013104	15.68	6.37	0.61
31	NP_001166025.1	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	46.42	7.65	0.62
32	NP_001018580.1	Acyl-CoA thioesterase 9	48.23	8.12	0.62
33	AAB05406.1	Alpha globin	12.32	8.97	0.63
34	NP_001159825.2	Probable imidazolonepropionase	46.87	6.52	0.63
35	XP_693062.2	Integrator complex subunit 5	111.19	6.81	0.63
36	XP_016296100.1	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3G-like	31.07	5.86	0.64
37	XP_016355708.1	Coiled-coil domain-containing protein 124	20.09	6.81	0.64
38	KTG05967.1	Hypothetical protein cypCar_00014176	79.45	7.71	0.65
39	ABW37743.1	Alpha-1-microglobulin	38.82	6.70	0.65
40	KTG41025.1	Hypothetical protein cypCar_00013175	9.45	5.64	0.67
41	AHG98486.1	LSS	46.86	5.41	0.67
42	NP_956263.1	Malate dehydrogenase 1Ab	36.20	6.43	0.67
43	AAU25881.1	Zinc exporter 7	11.24	5.71	0.67
44	KTF74139.1	Hypothetical protein cypCar_00028449	20.02	6.79	0.68
45	XP_016319227.1	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	46.04	7.46	0.68

续表 2

序号 No.	登录号 Accession	蛋白质名称 Protein Name	分子质量 MW [kD]	等电点 pI	比值 Ratio
46	XP_016139830.1	Transportin-2-like	77.32	5.00	0.69
47	KTF71115.1	Hypothetical protein cypCar_00050247	10.23	4.81	0.69
48	ALD62531.1	Complement component 3	74.27	6.60	0.70
49	BAA34707.1	Complement factor B/C2B	93.61	6.87	0.70
50	XP_017207962.1	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a isoform X5	46.35	5.44	0.70
51	XP_016112570.1	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate-forming) A-like	28.25	6.18	0.70
52	XP_017207460.1	Complement component 1	23.57	6.00	0.70
53	ADC35577.1	Growth hormone receptor type 2b	63.69	4.97	0.70
54	KTF91480.1	Hypothetical protein cypCar_00012951	33.81	7.37	0.70
55	KTF73826.1	Hypothetical protein cypCar_00042693	88.83	5.55	0.70

上调表达蛋白包括选择性胸腺细胞相关蛋白2样蛋白(Protein THEMIS2-like)、基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase 9)、脯氨酸脱氢酶2(Proline dehydrogenase 2)、过氧化氢酶(Catalase)、延胡索酰乙酰乙酸水解酶(Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2A)、硫氧还蛋白(Thioredoxin)、 α -珠蛋白(Alpha-globin)、硒代半胱氨酸裂解酶X3亚型(Selenocysteine lyase isoform X3)、 β -葡萄糖苷酶(Cytosolic beta-glucosidase)、 Na^+/Cl^- 依赖性肌酸转运蛋白样蛋白1(Sodium- and chloride-dependent creatine transporter 1-like)、热休克蛋白70(Heat shock protein 70)、多聚泛素C(Polyubiquitin-C)、核溶素样蛋白TIA-1(Nucleolysin TIA-1-like)、溶酶体相关膜蛋白2(Lysosome membrane protein 2)、乙酰辅酶A合成酶(Acetyl-coenzyme A synthetase)、似60S核糖体蛋白L6(60S ribosomal protein L6-like)等。

下调表达蛋白包括 α 2热稳定性糖蛋白(Alpha-2-HS-glycoprotein)、谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase)、真核生物延长因子2激酶(Eukaryotic elongation factor 2 kinase-like)、补体C4-B(Complement C4-B)、视黄醇结合蛋白4(Retinol binding protein 4)、溶质载体家族25成员38样蛋白(Solute carrier family 25 member 38-B-like)、组织蛋白酶Z(Cathepsin Z-like)、死亡相关蛋白样蛋白1-B X2亚型(Death-associated protein-like 1-B isoform X2)、血红蛋白 β 亚单位样蛋白(Hemoglobin subunit beta-like)等。

2.3 生物信息学分析

为深入分析嗜水气单胞菌感染对青鱼肝脏组织蛋白表达的影响,对差异表达蛋白质进行GO功能分析,差异蛋白参与的“生物过程”主要集中在单组织过程(Single-organism process)、细胞内过程

(Cellular process)、代谢过程(Metabolic process)、生物学调控(Biological regulation)等;“分子功能”主要集中在结合活性(Binding)和催化活性(Catalytic activity)等;“细胞组分”主要集中在细胞(Cell)、细胞部分(Cell part)和细胞器(Organelle)等(图 2)。

KEGG通路分析表明,青鱼肝脏组织的差异表达蛋白主要参与补体和凝血级联反应(Complement and coagulation cascades)、剪接体(Spliceosome)、细胞内吞作用(Endocytosis)、氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation)、碳代谢(Carbon metabolism)、精氨酸和脯氨酸代谢(Arginine and proline metabolism)、色氨酸代谢(Tryptophan metabolism)等通路(图 3),其中补体和凝血级联反应通路富集最为显著(图 4)。

2.4 差异表达蛋白的qRT-PCR验证

选取差异表达蛋白补体C3和热休克蛋白70(HSP70),用qRT-PCR检测其在mRNA水平上的变化。结果显示,在嗜水气单胞菌感染青鱼后,青鱼肝脏组织中补体C3基因的mRNA表达水平下调,HSP70基因的mRNA表达水平上调(图 5),这与iTRAQ结果变化趋势一致。

2.5 感染青鱼的组织病理变化

感染嗜水气单胞菌的青鱼和健康青鱼的肝脏组织切片于显微镜下观察,可见病鱼肝脏组织发生了明显的病理变化,主要表现为肝细胞边界不分明、细胞核固缩、肝板排列紊乱、有出血现象等(图 6A);而健康青鱼肝脏切片显示肝细胞多角形、排列紧密、细胞边界明显(图 6B)。

3 讨论

iTRAQ联合液相色谱串联质谱技术是近年发展起来的功能强大的比较蛋白质组学技术之一,用于寻找差异表达蛋白,为生理病理机制研究提供线

索, 也可用于分子标志物的筛选研究^[14]。本实验应用iTRAQ蛋白质组学技术, 研究了青鱼感染嗜水气单胞菌前后肝脏组织蛋白质表达的变化, 结果共筛选到188个差异表达蛋白, 其中70个(占37%)差异蛋白表达上调, 118个(占63%)差异蛋白表达下调, 表达下调的蛋白占比较高。分析与免疫相关的差异蛋

白, 上调表达蛋白有选择性胸腺细胞相关蛋白样蛋白、基质金属蛋白酶-9、热休克蛋白70、过氧化氢酶、硫氧还蛋白等, 下调表达蛋白有补体C1、补体B/C2B、补体C3-Q1和补体C4-B等。

选择性胸腺细胞相关蛋白(THEMIS2)调控着巨噬细胞Toll样受体信号转导和细胞因子的产生,

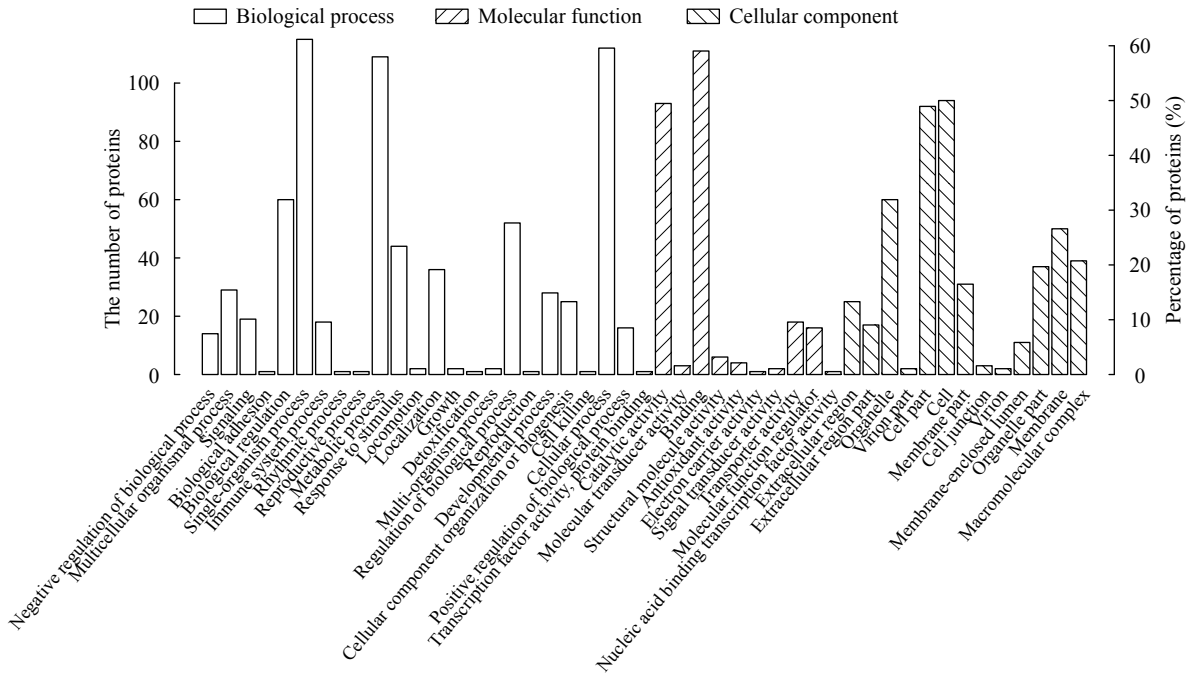


图 2 青鱼肝脏组织差异表达蛋白的GO功能分析

Fig. 2 GO analysis of differently expressed proteins in liver of black carp

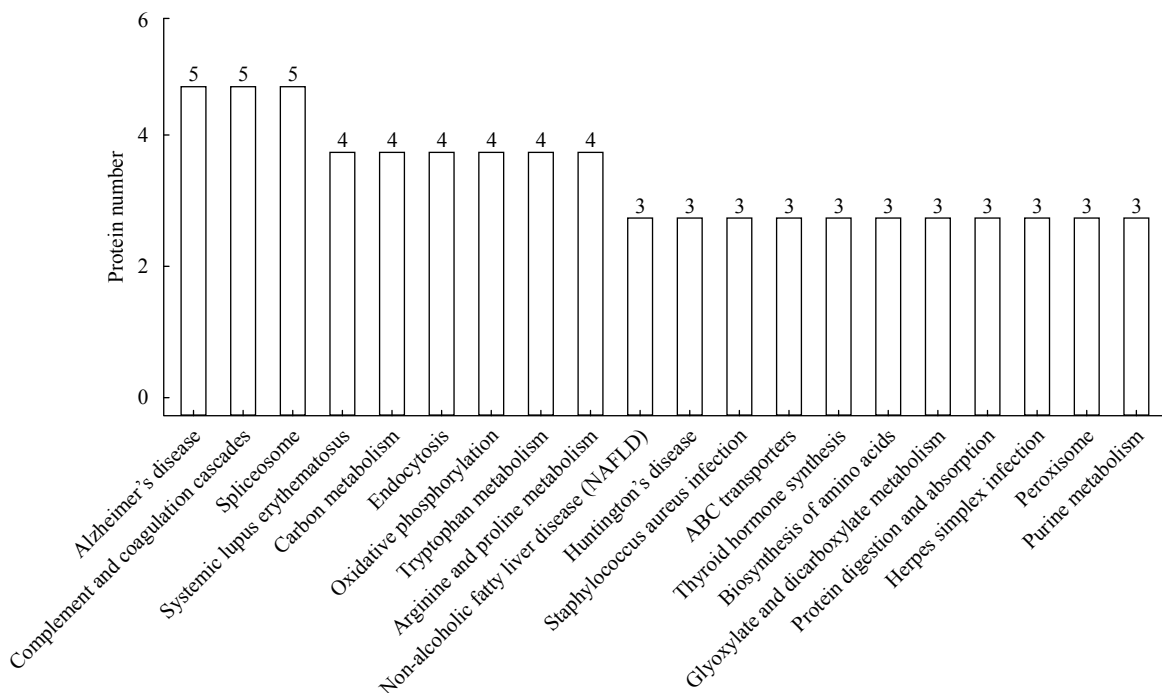


图 3 青鱼肝脏组织差异表达蛋白的KEGG通路分析(前20条)

Fig. 3 KEGG pathway analysis of differently expressed proteins in liver of black carp (top 20)

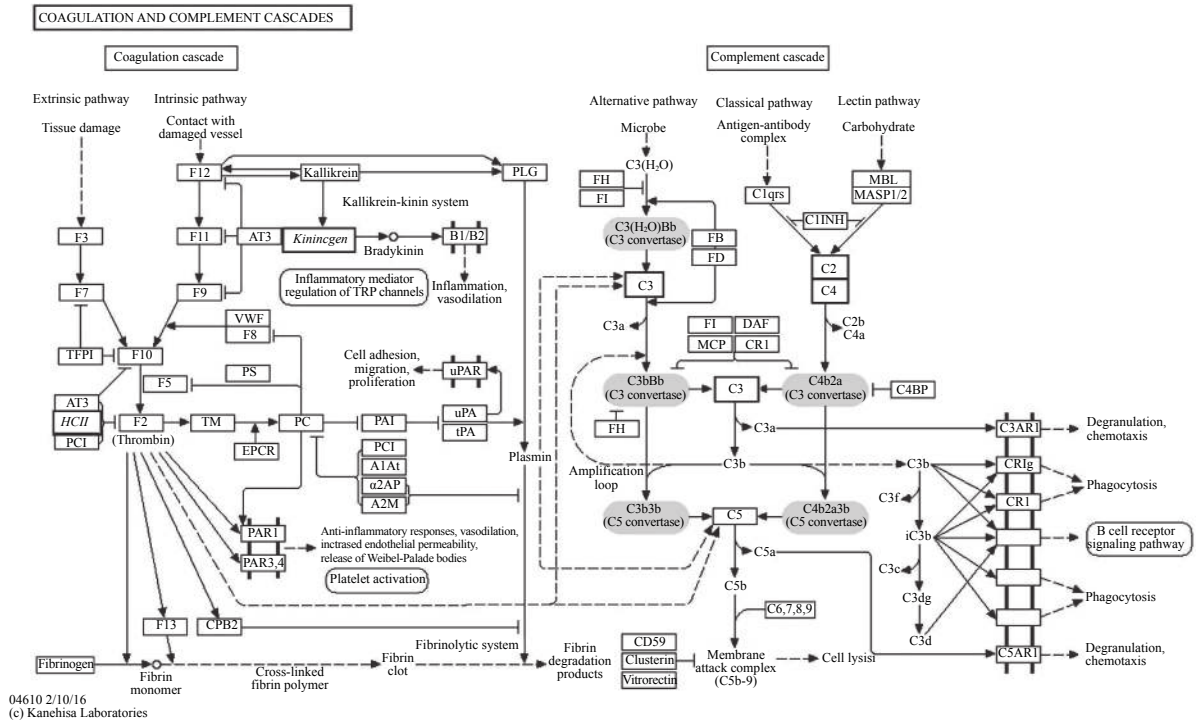


图 4 补体和凝血级联反应通路(差异表达蛋白以粗体标注)

Fig. 4 Schematic drawing of the pathway of coagulation and complement cascades (the bold fonts indicate differently expressed proteins)

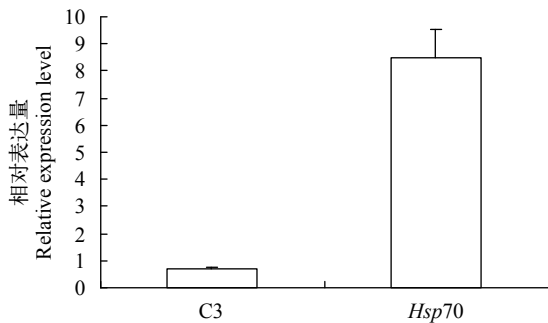


图 5 嗜水气单胞菌感染青鱼后青鱼肝脏补体C3和Hsp70 mRNA的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of C3 and Hsp70 genes in liver of *A. hydrophila* infected black carp

在巨噬细胞炎症反应中发挥着关键作用^[15]。青鱼在受到嗜水气单胞菌感染后, 肝脏组织THEMIS2的上调表达, 提示THEMIS2可能参与了调控巨噬细胞炎症反应, 从而增强机体免疫应答, 以应对病原体的感染。

基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)属于基质金属蛋白酶家族(MMPs), MMPs是一类蛋白水解酶, 可降解细胞外多种基质成分。近年来, 随着基础研究的不断深入, MMPs在炎症中的作用越来越受重视。MMPs能通过多种途径调节炎症性反应的进程, 通过改变化学因子的功能和重要的促炎症性细胞因子的生物可利用性, 从而促进炎症细胞募集^[16]。研

究表明, MMP-9主要由炎症细胞(如巨噬细胞)分泌^[17], 且MMP-9的过表达与炎症初期释放的某些炎症介质呈正相关^[18]。推测本实验嗜水气单胞菌感染导致鱼体炎症介质的释放增加, 肝脏MMP-9表达上调, 细胞外基质和基膜的降解进一步加重, 炎症细胞的浸润加剧, 从而加重了炎症反应。

热休克蛋白(HSPs)是一类存在于所有生物体比较保守的蛋白, 在遇到外界刺激时, 能诱导或增强表达, 以保护细胞免受损害^[19]。HSP70是HSPs家族中表达最广泛的蛋白, 具有促进蛋白质的合成、折叠、运输, 清除变性蛋白, 抗细胞凋亡和介导细胞免疫功能以及信号传导因子的作用^[20]。HSP70在正常细胞中水平较低, 在应激状态下可明显升高。吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)感染链球菌48h内, HSP70 mRNA在脾脏中表达升高, 感染24h后HSP70 mRNA表达量是正常脾脏组织的5.5倍多^[21]。万文菊等^[22]用溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)感染剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*), 结果在感染濒死鱼脾脏内检测到HSP70基因强烈表达。研究表明, HSP70还是重要的抗原提呈调节因子, 可促进T细胞介导的免疫反应, 产生细胞因子, 加强NK细胞的杀伤作用, 以及介导NF- κ B/I κ B/IKK信号通路。青鱼在感染嗜水气单胞菌后, 肝脏HSP70的表达出现上调, 提示青鱼处于病原菌感染、肝组织损伤等病理应激状态, 升高的HSP70可激活机体的免疫应答

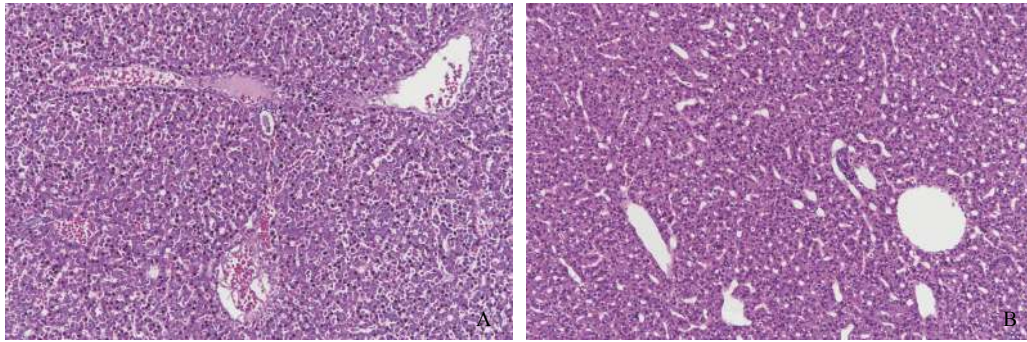


图6 感染嗜水气单胞菌的青鱼肝脏组织切片(200×)

Fig. 6 Histopathological characteristic of liver of black carp infected with *A. hydrophilia*

A. 感染青鱼肝脏的组织切片(示肝细胞坏死和肝内出血); B. 对照组青鱼肝脏的组织切片

A. liver tissue slice of diseased black carp showed necrosis and hemorrhage; B. liver tissue slice of control group

反应, 调控免疫细胞因子的活性。

过氧化氢酶(CAT)存在于所有已知动物的各组织中, 特别在肝脏中以高浓度存在。它能催化过氧化氢分解为分子氧和水, 清除体内的过氧化氢, 从而使细胞免于遭受过氧化氢的毒害, 是生物防御体系的关键酶之一。硫氧还蛋白(Trx)是一类氧化还原调节蛋白, 可通过对细胞内被氧化的二硫键的还原来修复机体的氧化损伤, 还可与其他氧化还原系统协调配合, 消除体内过多的活性氧^[23]。赵静等^[24]分析了齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)感染嗜水气单胞菌后血清CAT活力变化, 结果显示在感染初期, CAT活力明显增强, 48h时达到峰值。严林飞等^[25]研究表明, 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)感染鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)后肝组织中CAT基因的表达随着时间的推移而变化明显, 感染后12h达到最高(7.48倍)。本实验青鱼肝脏CAT和Trx的表达上调, 说明嗜水气单胞菌感染可能引起机体产生大量活性氧自由基和过氧化氢, CAT和Trx的上调表达可清除体内过量的活性氧, 进而防止它们对机体细胞造成损伤。

补体系统是存在于血清、组织液和细胞膜表面的一组不耐热的经活化后具有酶活性的蛋白质, 参与了机体的特异性和非特异性免疫, 在抗微生物防御反应、免疫调节及介导免疫病理的损伤性反应中发挥重要作用。补体系统各成分通常以非活性状态存在, 当其被激活物质活化之后, 才表现出生物学活性。目前已发现3条补体激活途径: 经典途径、替代途径和凝集素途径。3条途径起点各异, 但存在相互交叉, 并且有共同的末端通路, 即膜攻击复合物(MAC)的形成及其溶解细胞效应。由于鱼类进化地位的特殊性, 关于其补体系统的研究越来越受到众多学者的重视。研究表明硬骨鱼类存在补体激活的3条途径, 补体的溶菌活性是硬

骨鱼类清除细菌的一个重要机制。Li等^[26]的研究表明迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)通过抑制补体替代途径的活化逃避宿主的攻击。人类某些疾病可引起总的补体含量或单一成分含量发生变化, 因此对补体水平的测定, 对疾病的诊断具有一定意义。青鱼在感染嗜水气单胞菌后, 肝脏中的补体C1、补体B/C2B、补体C3-Q1和补体C4-B均呈下调表达, 这些补体成分参与了补体活化的3条激活途径。在通路分析中, 与青鱼补体和凝血级联反应通路相关的差异蛋白个数最多, 其中包含补体B/C2B、补体C3-Q1和补体C4-B等。以上结果提示在青鱼受细菌感染后, 肝脏中的补体系统的活化受到了抑制, 机体对病原菌的杀灭作用降低, 免疫功能下降。

此外, 方献平等^[27]研究发现三角鲂和团头鲂对嗜水气单胞菌的响应蛋白质多集中在糖类合成代谢、丙酮酸代谢、碳水化合物合成分解、转录翻译和氧化还原等生物过程中, 并且这些应答蛋白质参与了结构分子活性、核糖体结构组成、维生素连接、辅酶连接、血红素连接、氧气转运相关蛋白活性等分子功能。本实验筛选到的差异表达蛋白, 除与免疫相关的蛋白外, 其他蛋白种类与三角鲂和团头鲂的响应蛋白相似。

综上所述, 本研究应用iTRAQ蛋白质组学技术, 定量分析了青鱼感染嗜水气单胞菌前后肝脏蛋白质的表达变化, 并对差异表达蛋白在参与的生物学过程、分子功能、细胞定位以及参与的通路等进行归纳整理, 研究结果为深入揭示嗜水气单胞菌的分子致病机制奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] China Fisheries Yearbook 2017 [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2017, 25—35 [中国渔业年鉴2017. 北

- 京: 中国农业出版社. 2017, 25—35]
- [2] Qin G M, Zhang X J, Chen C Z, *et al.* Study on pathogens of bacterial septicemia in grass carp and black carp [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010, (1): 236—239 [秦国民, 张晓君, 陈翠珍, 等. 草鱼和青鱼细菌性败血症病原菌的研究. 江苏农业科学, 2010, (1): 236—239]
- [3] Zhang B, Zeng L B, Luo X S, *et al.* Isolation and identification of pathogen from enteric septicemia of black carp (*Mylopharyngodon piceus*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, **29**(5): 607—612 [张波, 曾令兵, 罗晓松, 等. 青鱼肠道出血症病原菌的分离与鉴定. 华中农业大学学报, 2010, **29**(5): 607—612]
- [4] Liang L G, Xie J. Isolation and identification, virulence factor detection, and susceptibility test of pathogen *Aeromonas hydrophila* isolated from *Mylopharyngodon piceus* [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, **32**(12): 3236—3242 [梁利国, 谢骏. 青鱼病原嗜水气单胞菌分离鉴定、毒力因子检测及药敏试验. 生态学杂志, 2013, **32**(12): 3236—3242]
- [5] Mou S X, Zhou X, Peng Y Z, *et al.* Effect of fibrous root of *Coptis chinensis* Franch and berberine on the non-specific immunity and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(2): 267—274 [牟绍霞, 周霞, 彭耀宗, 等. 黄连须和小檗碱对草鱼非特异性免疫系统的影响及对嗜水气单胞菌感染的抵抗作用. 水生生物学报, 2015, **39**(2): 267—274]
- [6] Zhang Y, Gao X J, Ye J M, *et al.* Molecular characterization and establishment of LAMP detection method of pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from *Siniperca chuatsi* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(6): 1225—1231 [张悦, 高晓建, 叶金明, 等. 翘嘴鲃病原嗜水气单胞菌分子特征及LAMP检测方法的建立. 水生生物学报, 2017, **41**(6): 1225—1231]
- [7] Wen Z Y, Liu X Y, Jin X L, *et al.* Study on pathology of *Hyriopsis cumingii* Lea disease caused by *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science)*, 2001, **27**(1): 56—59 [文祝友, 刘晓燕, 金燮理, 等. 三角帆蚌嗜水气单胞菌病的病理研究. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2001, **27**(1): 56—59]
- [8] Liu T S, Wang C Z, Chen C F. Isolation and identification of pathogenic bacteria from channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2006, **25**(5): 550—554 [刘堂水, 汪成竹, 陈昌福. 斑点叉尾鲷细菌性病原的分离与鉴定. 华中农业大学学报, 2006, **25**(5): 550—554]
- [9] Meng Y, Xiao H B, Zeng L B, *et al.* Isolation and identification of the hemorrhagic septicemia pathogen of Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* Brandt [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, **26**(6): 822—826 [孟彦, 肖汉兵, 曾令兵, 等. 施氏鲟出血性败血症病原菌的分离和鉴定. 华中农业大学学报, 2007, **26**(6): 822—826]
- [10] Zhang L, Ai X H, Yuan K P, *et al.* Biological characteristics of *Aeromonas hydrophila* on chinese softshell turtle *Trionyx sinensis* [J]. *Journal of Henan University of Science & Technology (Natural Science)*, 2009, **30**(6): 75—78 [张林, 艾晓辉, 袁科平, 等. 中华鳖嗜水气单胞菌的生物学特性. 河南科技大学学报(自然科学版), 2009, **30**(6): 75—78]
- [11] Zhou F, Liu J, Li D B. The isolation and identification of finless eel *Aeromonas hydrophila* and effects of traditional Chinese medicine on it in vitro [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, **37**(2): 135—137 [周飞, 刘娟, 黎德兵. 黄鳝嗜水气单胞菌的分离鉴定及中药体外抑菌效果研究. 中国畜牧兽医, 2010, **37**(2): 135—137]
- [12] Qin G M, Zhang X J, Chen C Z, *et al.* Characterization of pathogenic bacteria from grass carp *Ctenopharyngodon idellus* and black carp *Mylopharyngodon piceus* [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010, (1): 236—239 [秦国民, 张晓君, 陈翠珍, 等. 草鱼和青鱼细菌性败血症病原菌的研究. 江苏农业科学, 2010, (1): 236—239]
- [13] Zhang B. Isolation and identification of pathogen from black carp enteric hemorrhage and the preliminary study for vaccines [D]. Huazhong Agricultural University. 2011 [张波. 青鱼肠道出血病病原菌的分离鉴定与疫苗的初步研究. 华中农业大学. 2011]
- [14] Liu Y Z, Guo J R, Peng M L, *et al.* Screening differentially expressed plasma proteins in cold stress rats based on iTRAQ combined with mass spectrometry technology [J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2015, **31**(5): 392—395 [刘艳芝, 郭景茹, 彭梦玲, 等. 应用iTRAQ结合质谱技术筛选冷应激大鼠血浆差异表达蛋白. 中国应用生理学杂志, 2015, **31**(5): 392—395]
- [15] Peirce M J, Brook M, Morrice N, *et al.* Themis2/ICB1 is a signaling scaffold that selectively regulates macrophage Toll-like receptor signaling and cytokine production [J]. *PLoS One*, 2010, **5**(7): e11465
- [16] Liu W, Huber S A, Li S Q. Research progress on matrix metalloproteinases [J]. *Journal of Harbin Medical University*, 2011, **45**(5): 500—503 [刘巍, Huber SA, 李淑清. 基质金属蛋白酶研究进展. 哈尔滨医科大学学报, 2011, **45**(5): 500—503]
- [17] Goetzl E J, Balda M J, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity [J]. *Journal of Immunology*, 1996, **156**(1): 1—4
- [18] Wang H B, Yu W R. Advances in the research of MMP-2/MMP-9 in inflammation [J]. *Medical Recapitulate*, 2014, **20**(17): 3120—3122 [王海波, 俞为荣. MMP-2/MMP-9在炎症中的研究进展. 医学综述, 2014, **20**(17): 3120—3122]
- [19] Wan W J. Molecular Cloning of two members of HSP70 and their transcriptional regulation responding to *Vibrio alginolyticus* infection and immunization in *Xiphophorus helleri* [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University. 2006 [万文菊. 剑尾鱼HSP70家族两成员的分子克隆及溶藻弧菌感染与免疫对其基因的诱导表达. 泰安: 山东农业大学. 2006]

- [20] Zhong X, Wang T. Protective effects and immune regulation of Hsp70 on gastro-intestinal tract mucosa [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2014, **45**(4): 517—523 [钟翔, 王恬. Hsp70对胃肠道黏膜的保护及其免疫调控作用. 畜牧兽医学报, 2014, **45**(4): 517—523]
- [21] Wang L, Huang Y H, Chen M, *et al.* Analysis of *hsp70* mRNA expression of tilapia infected with *Streptococcus* [J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2010, **41**(4): 371—374 [王瑞, 黄艳华, 陈明, 等. 罗非鱼感染链球菌后 *hsp70* 基因表达研究. 广西农业科学, 2010, **41**(4): 371—374]
- [22] Wan W J, Wang J T, Shi C B, *et al.* Gene expression of HSP70 in green swordtail *Xiphophorus helleri* exposed to *Vibrio alginolyticus* [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2007, **22**(5): 330—334 [万文菊, 王纪亭, 石存斌, 等. 溶藻弧菌感染对剑尾鱼HSP70基因表达的影响. 大连海洋大学学报, 2007, **22**(5): 330—334]
- [23] Ma Y G, Yang F, Yang W J. The structure of thioredoxin and its role in the biological resistance of oxidation stress [J]. *Chemistry of Life*, 2011, **31**(3): 429—433 [马宇光, 杨帆, 杨卫军. 硫氧还蛋白的结构及在生物抗氧化中的功能. 生命的化学, 2011, **31**(3): 429—433]
- [24] Zhao J, Wang L. Changes in serum indices of *Schizothorax prenanti* challenged with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Fisheries Science*, 2015, **34**(3): 178—181 [赵静, 王利. 齐口裂腹鱼感染嗜水气单胞菌后血清指标的变化. 水产科学, 2015, **34**(3): 178—181]
- [25] Yan L F, An X, Bao M M, *et al.* Expression of catalase in *Larimichthys crocea* after infection of *Vibrio anguillarum* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, **41**(5): 641—648 [严林飞, 安昕, 包苗苗, 等. 大黄鱼过氧化氢酶基因的克隆及其对鳃弧菌感染的响应. 水产学报, 2017, **41**(5): 641—648]
- [26] Li M F, Sun L, Li J. *Edwardsiella tarda* evades serum killing by preventing complement activation via the alternative pathway [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, **43**(2): 325—329
- [27] Fang X P, Zhu L M, Liu K, *et al.* Differential *Aeromonas hydrophila* resistance mechanisms of *Megalobrama terminalis* and *Megalobrama amblycephala* revealed by quantification proteomics [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2015, **41**(5): 602—615 [方献平, 朱丽敏, 刘凯, 等. 定量蛋白质组学揭示三角鲂和团头鲂响应嗜水气单胞菌感染机制变化. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2015, **41**(5): 602—615]

QUANTITATIVE PROTEOMICS ANALYSIS OF LIVER OF BLACK CARP *MYLOPHARYNGODON PICEUS* UNDER *AEROMONAS HYDROPHILA* INFECTION

LIU Wen

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Aquatic Resources Conservation and Development, School of Life Science, Huzhou University, Huzhou 313000, China)

Abstract: To investigate whether *Aeromonas hydrophila* generally mediate liver protein expression, isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) combined with LC-MS/MS were used to screen liver proteins of black carp *Mylopharyngodon piceus* after infected with *Aeromonas hydrophila* (BCK0712) for 24 hours. Differentially expressed proteins were screened through identification and quantification analysis. As a result, a total of 4475 proteins were identified and 188 differentially expressed proteins were quantified upon bacterial infection, including 70 up-regulated and 118 down-regulated proteins. Bioinformatics analysis indicated that these differentially expressed proteins were mainly associated with complement and coagulation cascades, spliceosome, endocytosis, oxidative phosphorylation, carbon metabolism, arginine and proline metabolism, etc. Histopathological characteristics including unclear cell boundary, hemorrhage at different degrees and necrosis were observed on liver of black carp infected with *A. hydrophila* under microscope after hematoxylin-eosin staining. The potential mechanism of regulated proteins by *A. hydrophila* infection in liver pathology need further investigation.

Key words: *Mylopharyngodon piceus*; *Aeromonas hydrophila*; Liver; iTRAQ