

饲料中维生素D₃的添加水平对黄颡鱼幼鱼生长和Toll样受体TLR18、TLR19和TLR21的影响

郭勋 程珂 马春松 陈昕 王春芳

EFFECTS OF DIETARY VITAMIN D₃ ON THE GROWTH AND EXPRESSION OF TLR18, TLR19 AND TLR21 IN THE JUVENILE YELLOW CATFISH *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*

GUO Xun, CHENG Ke, MA Chun-Song, CHEN Xin, WANG Chun-Fang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.056>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

黄颡鱼MHC class II基因全长的克隆及饲料维生素D₃对其组织表达的影响

FULL-LENGTH cDNA CLONING AND THE EFFECT OF DIETARY VITAMIN D₃ ON TISSUE EXPRESSION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX- II IN YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2017, 41(5): 992–999 <https://doi.org/10.7541/2017.124>

日本鳗鲡TLR21基因的鉴定、免疫应答与启动子分析

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF TLR21 GENE FROM JAPANESE EEL, *ANGUILLA JAPONICA*

水生生物学报. 2017, 41(2): 296–305 <https://doi.org/10.7541/2017.36>

鱼溶浆、酶解鱼溶浆和酶解鱼浆完全替代鱼粉对黄颡鱼生长的影响

THE EFFECTS OF FISH MEAL REPLACEMENT ON GROWTH PERFORMANCE OF YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2019, 43(3): 504–516 <https://doi.org/10.7541/2019.062>

饲料中添加谷胱甘肽对黄颡鱼幼鱼组织谷胱甘肽含量、免疫及抗氧化性能的影响

EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH GLUTATHIONE ON TISSUE GSH LEVEL, IMMUNITY, AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF JUVENILE YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2018, 42(4): 728–735 <https://doi.org/10.7541/2018.089>

黄颡鱼自噬相关基因LC3B和Beclin1的原核表达及多克隆抗体制备

PROKARYOTIC EXPRESSION AND POLYCLONAL ANTIBODY PREPARATION OF AUTOPHAGY-RELATED GENES LC3B AND BECLIN1 OF YELLOW CATFISH *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1197–1202 <https://doi.org/10.7541/2019.141>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.056

饲料中维生素D₃的添加水平对黄颡鱼幼鱼生长和Toll样受体 *TLR18*、*TLR19*和*TLR21*的影响

郭勋 程珂 马春松 陈昕 王春芳

(华中农业大学水产学院, 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 池塘健康养殖湖北省工程实验室, 武汉 430070)

摘要: 为了探讨饲料中维生素D₃添加水平对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)生长和Toll样受体的影响, 研究设计了5个不同浓度梯度的维生素D₃饲料(1120、2260、3950、8030和16600 IU/kg), 对体重为(5.0±0.2) g的黄颡鱼进行了为期12周的生长实验, 并在生长实验结束后进行鲷爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)攻毒72h。于攻毒前(0)和攻毒后(72h)采样, 每个饲料组分别取6尾鱼的脾脏、头肾、肝脏和前肠四个组织, 检测不同浓度维生素D₃处理对攻毒前和攻毒后*TLR18*、*TLR19*和*TLR21*基因表达量的影响。同时另取6条新鲜黄颡鱼的肌肉、头肾、肾脏、皮肤、脑、鳃、脾脏、胃上皮、小肠和肝脏, 检测*TLR18*、*TLR19*和*TLR21*基因在黄颡鱼中的组织分布。结果表明: 不同的维生素D₃添加水平会显著影响黄颡鱼幼鱼的生长性能; *TLR18*、*TLR19*和*TLR21*基因在所检测的组织中均有表达, 但在脾脏中表达量最高; 饲料中不同维生素D₃含量在攻毒前后均会显著影响*TLR18*、*TLR19*和*TLR21*在头肾、脾脏、肝脏和前肠中的表达, 攻毒后基因的表达显著高于攻毒前; *TLR18*、*TLR19*和*TLR21*在不同组织中的表达和饲料中维生素D₃的浓度相关, 研究结果表明饲料中添加合适剂量的维生素D₃, 可以促进相关免疫基因的表达, 从而增强黄颡鱼对病原微生物的抵抗力。

关键词: 黄颡鱼; 维生素D₃; *TLR18*; *TLR19*; *TLR21*

中图分类号: S965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2020)03-0461-09

维生素D是一种脂溶性维生素, 一般来说, 鱼类不能合成维生素D, 必须依靠摄食来满足其需求^[1], 维生素D₃(VD₃)是维生素D最重要的形式, 经鱼体吸收后转化为活性维生素D₃, 维生素D₃与存在于细胞核内的特异性受体(Vitamin D Receptor, VDR)结合后, 在基因转录水平上发挥其重要的调控功能^[2]。维生素D₃的经典作用主要是维持矿物质的稳态、参与鱼类内分泌等^[3], 除经典作用外, 在哺乳动物中越来越多的研究表明, 维生素D还可以影响免疫细胞细胞因子的分泌和表达, 从而影响免疫细胞的增殖和凋亡^[4], 维生素D₃还参与了蛋白质激酶C(Protein Kinase C, PKC)、MAP激酶(Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK)、磷脂酶C(Phospholipase C, PLC)和磷脂酶D(Phospholipase D, PLD)等免疫相关通路^[5, 6], 相关实验证明维生素D₃也可以有效地干预病毒感染^[7]。尽管这些报道表明维生素D₃/VDR

调节免疫系统功能在哺乳动物中的作用, 但其对鱼类营养免疫的作用机理, 有待深入探索。

Toll样受体(Toll-like Receptors, TLRs)是一类重要的病原体识别分子的受体(Pathogen Recognition Receptors, PRRs), 是沟通机体的先天免疫和获得性免疫的桥梁^[8]。TLRs属于I型跨膜蛋白, 主要有富含亮氨酸系列的胞外区、富含半胱氨酸系列的跨膜区和含TIR(Toll-interleukin-1 Receptor)的胞内区3个典型的功能区组成, 胞外区能特异性识别病原体, 胞内区能激活信号通路, 从而调节免疫应答^[9], 鱼类*TLR*基因种类较哺乳类动物更多, 目前在硬骨鱼类至少发现了20种, 其中*TLR18*、19、20、21、22、23为鱼类所特有^[10], 不同的TLRs识别的病原体不同, 细胞外的TLRs主要检测脂质和蛋白质的配体, 细胞内的TLRs主要检测核酸的配体^[11]。已有研究表明, *TLR18*可以感受PGN(肽聚糖)、LPS

收稿日期: 2019-04-11; 修订日期: 2019-08-17

基金项目: 国家自然科学基金(31672667)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31672667)]

作者简介: 郭勋(1994—), 男, 硕士; 主要研究方向为鱼类营养与免疫。E-mail: 847175531@qq.com

通信作者: 王春芳(1975—), 主要研究方向为鱼类营养与免疫。E-mail: cfwang@mail.hzau.edu.cn

(脂多糖)、Poly(I:C)(聚肌胞酸)和寄生虫的刺激,除上述刺激物外, *TLR19*和*TLR21*还可以感受病毒的刺激^[12], 三种基因特异性识别病原体后, 启动一系列信号级联, 从而导致免疫因子的产生^[13], 然而其具体的作用机制仍待进一步研究。

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)是我国重要的淡水养殖品种, 由于其较高的市场价值, 黄颡鱼养殖规模日益增大^[14]。但在密集的养殖环境下, 细菌性传染病发病的频率越来越高, 造成严重的经济损失, “裂头病”就是一种典型的黄颡鱼疾病, 已有研究表明这种疾病是由鲶爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)引起的^[15]。传统的药物治疗法存在药物残留和耐药性等安全问题, 疫苗预防法存在操作复杂和特异性强的问题。因此, 采用营养调控手段, 来增强黄颡鱼对病原的抵抗力是防治相关疾病的有效措施之一^[16]。

本实验通过研究饲料中维生素D₃的不同添加水平对鲶爱德华氏菌攻毒前后黄颡鱼主要免疫组织中的三种典型Toll样受体家族基因*TLR18*、*TLR19*和*TLR21*表达的影响, 以期揭示维生素D₃在鱼类免疫调控中的作用, 分析黄颡鱼在营养调控后对易感病原抵抗能力的变化, 初步筛选出提高黄颡鱼免疫应答的饲料中维生素D₃的适宜水平。

1 材料与方法

1.1 试验饲料的制作

以酪蛋白和脱脂奶粉为蛋白源、玉米蛋白粉为糖源、大豆油为脂肪源配制成5组不同维生素D₃含量等氮等能饲料, 饲料组成和营养成分见表1。在饲料制作时, 各原料采取逐级放大法混匀, 最后加入20%的蒸馏水揉匀, 经制粒机加工后粉碎成适宜大小的颗粒, 37℃晾干至饲料水分低于10%, -20℃冰箱保存待用。

1.2 试验鱼及其饲养

试验黄颡鱼购于武汉正好鱼苗厂, 为了使试验鱼适应养殖环境以及排除鱼体残存的维生素D₃的影响, 正式试验前进行为期3周的暂养, 暂养期间投喂对照组饲料。在暂养结束后, 试验鱼饥饿24h后称重, 挑选出体格健壮、规格一致的黄颡鱼(5.0±0.2) g 800尾随机放入循环水养殖系统中的20个纤维玻璃鱼缸中(内径85 cm内高70 cm)。每组试验饲料对应4缸重复, 每缸40尾鱼。养殖试验在华中农业大学水产楼附1楼013鱼房内进行。

生长试验持续12周(2017.07.22—2017.10.17), 采用饱食性投喂策略, 每天投喂2次(9:00 am和15:00 pm), 每天称取定量的饲料(约为鱼重的6%), 投喂时采用多次少量投喂策略, 直至鱼饱食为止,

称量剩余饲料量以确定投喂量, 每两周全缸称重以调整投喂量, 试验期间水流约为1.5 L/min, 水温为

表1 实验饲料组成和营养成分

Tab. 1 Formulation and proximate composition of experimental diets

项目Item	饲料 I Diet I	饲料 II Diet II	饲料 III Diet III	饲料 IV Diet IV	饲料 V Diet V
原料(%饲料干重)Ingredients (% dry matter)					
血粉	10	10	10	10	10
脱脂奶粉	5	5	5	5	5
玉米蛋白粉	2	2	2	2	2
面粉	10	10	10	10	10
酪蛋白	30	30	30	30	30
豆粕	10	10	10	10	10
菜粕	10	10	10	10	10
大豆油	10	10	10	10	10
赖氨酸	1	1	1	1	1
蛋氨酸	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
氯化胆碱	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
维生素C	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
三氧化二钼	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
抗氧化剂	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
矿物盐	2	2	2	2	2
无VD ₃ -维生素预混料	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
维生素D ₃	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2
麸皮	8.08	7.88	7.48	6.68	5.08
营养成分(%饲料干重)Proximate composition (% dry matter)					
水分	5.45	6.00	5.23	5.52	5.55
粗蛋白	47.60	47.25	46.44	46.96	46.12
粗脂肪	4.53	4.57	4.56	4.40	4.48
灰分	3.30	3.45	3.47	3.36	3.37
维生素D	1120	2260	3950	8030	16600

注: (1) 矿物盐预混料(每千克饲料): 氯化钠198 mg; 硫酸镁2995 mg; 硫酸钠4560 mg; 硫酸钾4098.5 mg; 氯化钙2340 mg; 硫酸亚铁499.5 mg; 乳酸钙700.5 mg; 硫酸锌70.6 mg; 硫酸镁32.5 mg; 硫酸铜6.2 mg; 硫酸钴0.2 mg; 碘化钾0.6 mg; 麸皮4498.4 mg; (2) 无VD₃的维生素预混物(每千克饲料): 维生素A 2750 IU, 维生素E 25 IU; 维生素K₃ 5 mg, 维生素B₁ 10 mg; 维生素B₆ 10 mg; 维生素B₁₂ 10 mg; 尼克酸50 mg; 核黄素10 mg; 泛酸钙25 mg; 叶酸5 mg; 肌醇50 mg; 抗坏血酸50 mg; 脱脂米糠1757.43 mg。由广州市联鲲生物科技有限公司定制; (3) 维生素D₃预混物: 包膜饲料级别的维生素D₃ (500000 IU/kg)。由广州市联鲲生物科技有限公司提供

Note: (1) Mineral premix (mg per kg diet): NaCl 198 mg; MgSO₄·7H₂O 2995 mg; Na₂SO₄ 4560 mg; K₂SO₄ 4098.5 mg; CaCl₂·2H₂O 2340 mg; FeSO₄ 499.5 mg; Calcium lactate 700.5 mg; ZnSO₄·7H₂O 70.6 mg; MnSO₄·4H₂O 32.5 mg; CuSO₄·5H₂O 6.2 mg; CoSO₄ 0.2 mg; KI 0.6 mg; Bran 4498.4 mg; (2) Vitamin premix (per kg diet): Vitamin A 2750 IU; Vitamin E 25 IU; Vitamin K₃ 15 mg; Vitamin B₁ 20 mg; Vitamin B₆ 20 mg; Vitamin B₁₂ 20 mg; Niacin 50 mg; Riboflavin 10 mg; D-calcium pantothenate 25 mg; Biotin 5 mg; Inositol 100 mg; Ascorbic acid 500 mg; Bran 1757.43 mg. This premix was specially made by Nutriera; (3) Vitamin D₃ premix: Coated vitamin D₃ (500000 IU/kg), which was provided by Nutriera

16.0—26.0℃, 溶解氧浓度大于6.0 mg/L, 氨氮浓度低于0.5 mg/L, pH在8.0左右。

1.3 生长性能的测定

在生长实验结束后, 从每组中取24尾黄颡鱼(每个重复随机取6尾), 称重, 用于计算以下相关生长指标。

$$WG(\%)=100 \times (FBW-IBW)/IBW$$

$$TGC(\%)=100 \times (FBW^{1/3}-IBW^{1/3})/\sum t \times d$$

$$FCR=\text{总投喂量}/\text{鱼体总增重量}$$

$$FE(\%)=(\text{鱼体总增重量}/\text{总投喂量}) \times 100$$

$$SUR(\%)=(\text{鱼体终末数量}/\text{初始数量}) \times 100$$

式中, WG 表示增重率; TGC 表示积温系数; FCR 表示饵料系数; FE 表示饵料效率; SUR 表示存活率; FBW 和 IBW 分别为鱼体的末体质量和初体质量; d 为养殖天数, t 为养殖水温。

1.4 攻毒实验

在生长实验结束后, 每个饲料组随机选取55条黄颡鱼, 注射鲶爱德华氏菌进行攻毒实验, 细菌经脑心浸液培养基(Brain Heart Infusion, BHI)培养后用无菌生理盐水将菌液浓度稀释为 3.14×10^8 CFU/mL(攻毒实验前进行预实验确定的致半死浓度), 每尾鱼经腹腔注射0.1 mL的菌液, 攻毒期间不喂食, 水体充氧, 不循环, 攻毒后6h开始观察黄颡鱼临床症状, 记录攻毒后黄颡鱼的死亡数, 计算各实验组的死亡率和免疫保护率, 其中免疫保护率($\%$)= $100 \times (1-\text{实验组死亡率}/\text{对照组死亡率})$; 并于攻毒前(0)和攻毒后(72h)采样, 在每个采样点, 每个饲料组分别取6条鱼的头肾、脾脏、肝脏和前肠四个组织, 另取6条新鲜黄颡鱼的肌肉、头肾、肾脏、皮肤、脑、鳃、脾脏、胃上皮、小肠和肝脏, 所有取出的组织立即放入液氮速冻, 然后放入 -80°C 备用。

1.5 指标的测定

主要试剂和仪器 Trizol购自Invitrogen公司, Sample Protector、DL2000DNA Maker、Premix TaqTM(TaKaRa TaqTM Version2.0)和反转录试剂盒PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser购自宝生生物工程(大连)有限公司, 荧光定量试剂盒HieffTM qPCR SYBR[®] Green Master Mix(Low Rox Plus)购自翊圣生物科技(上海)有限公司。

引物的设计与合成 利用NCBI数据库中的黄颡鱼TLR18基因序列(GenBank: KY123645.1)、TLR19基因序列(GenBank: KY123646.1)、TLR21基因序列(GenBank: KY123647.1)和 β -actin基因序列(GenBank: KM673246.1), 利用Primer5.0软件设计相关基因的引物, 引物由上海生工生物公司合成。

总RNA的提取和cDNA的合成 取黄颡鱼

冷冻组织, 用trizol法提取其总RNA, 提取的总RNA用Nana Drop分光光度计测定其浓度和纯度, A_{260}/A_{280} 值在1.8—2.0。琼脂糖凝胶电泳显示28S和18S条带明亮清晰且28S条带亮度是18S的两倍。cDNA第一链的合成参照PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒方法进行。首先进行基因组DNA的除去反应。反应体系: $5 \times$ gDNA Eraser Buffer 2 μL , gDNA Eraser 1 μL , Total RNA $< 1 \mu\text{g}$, 加无菌蒸馏水至10 μL 。反应条件: 42°C 2min。然后进行反转录反应。反应体系: $5 \times$ Prime Script[®] Buffer 2 (for Real time) 4 μL , PrimeScript[®] RT Enzyme Mix I 1 μL , RT Primer Mix 1 μL , 基因组DNA除去反应的反应液10 μL , 加无菌蒸馏水至20 μL 。反应条件: 37°C 15min, 85°C 5s。合成的cDNA放入 -20°C 冰箱中保存备用。

RT-PCR 以得到的cDNA为模板用Quan Studio 6 Flex RT-PCR仪进行扩增, Real-time PCR反应体系: HieffTM qPCR SYBR[®] Green Master Mix (Low Rox Plus)10 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.4 μL (表2), cDNA溶液2 μL , 加无菌蒸馏水至20 μL 。反应条件为: 95°C 10s, 60°C 20s, 72°C 20s, 40个循环。

表2 Real-time PCR所用引物

Tab. 2 Primers used for real-time PCR

名称Name	序列Sequence (5'-3')
TLR18 Forward	GGCACAGCTAAGGAGTGTCTATGG
TLR18 Reverse	GGCCAGCTCAATCACAGACAGAG
TLR19 Forward	TCCGAGGCTGGAGGAACAAGG
TLR19 Reverse	GCACCAGTCGCTTCGCAGATAC
TLR21 Forward	CCAGGCCGCAACATAGTCGATAAC
TLR21 Reverse	AGCACCACCTCACTACGGAGGAAG
β -actin Forward	GGATTCGCTGGAGATGATG
β -actin Reverse	TCGTTGTAGAAGGTGTGATG

1.6 数据处理

mRNA表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析, 其中 $\Delta\Delta C_t=(C_t\text{靶基因}-C_t\text{内参基因})_{\text{实验组}}-(C_t\text{靶基因}-C_t\text{内参基因})_{\text{对照组}}$, 试验数据以平均值 $\pm$ 标准误表示, 采用SPSS16.0进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析, 若组间差异显著($P<0.05$), 采用邓肯检验法(Duncan's)进行多重比较分析。

2 结果

2.1 饲料中维生素D₃的添加水平对黄颡鱼生长性能的影响

表3显示, 在饲料中添加维生素D₃对黄颡鱼幼鱼的TGC和存活率没有影响($P>0.05$)。当维生素

表 3 在饲料中添加维生素D₃对黄颡鱼幼鱼生长的影响

Tab. 3 Effects of dietary vitamin D₃ levels on the growth performance of juvenile *P. fulvidraco*

指标Index	饲料维生素D ₃ 含量Dietary vitamin D ₃ level (IU/kg)				
	1120	2260	3950	8030	16600
初始体重IBW (g)	5.53±0.08	5.51±0.07	5.55±0.03	5.56±0.06	5.32±0.15
终末体重FBW (g)	26.15±0.63	24.00±0.66	24.93±0.60	25.91±0.99	26.99±1.37
增重率WG (%)	373.2±9.2 ^{ab}	335.9±12.6 ^b	349.2±11.6 ^{ab}	365.5±16.0 ^{ab}	408.3±27.0 ^a
热积温生长系数TGC (%)	0.060±0.001	0.056±0.001	0.058±0.001	0.060±0.002	0.063±0.003
饲料效率FE (%)	0.63±0.02 ^{ab}	0.58±0.01 ^b	0.62±0.02 ^{ab}	0.65±0.35 ^{ab}	0.71±0.42 ^a
饲料系数FCR	1.60±0.05 ^{ab}	1.74±0.28 ^b	1.63±0.05 ^{ab}	1.55±0.08 ^{ab}	1.43±0.09 ^a
存活率SUR (%)	93.33±1.36	95.00±0.96	95.00±0.96	95.84±0.84	95.84±0.84

注: 同一行中数值后的上标字母不同代表差异显著($P<0.05$)
Note: Means with different letters in the same row are significantly different ($P<0.05$)

D₃添加浓度为16600 IU/kg时, 黄颡鱼增重率和饲料效率达到最大, 饲料系数最小($P<0.05$)。

2.2 饲料中维生素D₃的添加水平对活菌攻毒后黄颡鱼的死亡率和免疫保护率的影响

表 4显示, 经腹腔注射鲷爱德华氏菌后, 维生素D₃浓度为1120 IU/kg时, 黄颡鱼累积死亡率达到最高, 且累积死亡率随着饲料中维生素D₃浓度的升高而增大, 免疫保护率随着饲料中维生素D₃的浓度升高而减小, 在维生素D₃浓度为16600 IU/kg时, 免疫保护率达到最大。

表 4 在饲料中维生素D₃添加水平对黄颡鱼疾病抗性的影响

Tab. 4 Effects of vitamin D₃ supplementation on the disease resistance of *P. fulvidraco*

项目Item	时间Time (d)	饲料维生素D ₃ 含量Dietary vitamin D ₃ level (IU/kg)				
		1120	2260	3950	8030	16600
攻毒后死亡数(尾)Death number after challenge tail	1	12	10	9	8	9
	2	5	5	5	4	3
	3	2	2	1	2	1
累积死亡总数(尾)Cumulative death number tail		19	17	15	14	13
累积死亡率Cumulative mortality (%)		34.54	30.90	27.27	25.45	23.63
免疫保护率Immune protective rate (%)		10.54	21.05	26.32	31.59	

2.3 黄颡鱼TLR 18、TLR19和TLR21基因的组织分布

以TLR19基因和TLR21基因mRNA表达量最低的肌肉为对照组, 以TLR18基因mRNA表达量最低的脑为对照组, 对肌肉、头肾、肾脏、皮肤、脑、鳃、脾脏、胃上皮、小肠和肝脏中5种基因的mRNA表达量进行相对定量分析, 得到黄颡鱼体内5种基因的mRNA组织表达分布图(图 1), 3个TLR受体家族基因在各组织中都分布广泛, 其中, TLR18基

因在头肾、脾脏和肝脏中的表达量较高($P<0.05$); TLR19基因在头肾和脾脏中的表达量较高($P<0.05$); TLR21基因在脾脏中的表达量最高($P<0.05$)。

2.4 鲷爱德华氏菌刺激前后黄颡鱼TLR18、TLR19和TLR21基因

TLR18基因mRNA表达量的变化 由图 2可知, 相对于攻毒前水平, 攻毒后, TLR18 mRNA表达量在头肾、脾脏、肝脏和前肠中就有提高, 头肾中TLR18 mRNA的表达量在饲料VD₃含量为2260和16600 IU/kg时显著高于其他处理组, 在8030 IU/kg时表达量最低($P<0.05$); 脾脏TLR18 mRNA表达量随饲料中维生素D₃含量增加而下降($P<0.05$); 肝脏TLR18 mRNA表达量在16600 IU/kg时最高, 在3950 IU/kg时表达量最低($P<0.05$); 而在前肠中TLR18 mRNA表达量在低浓度维生素D₃处理组(1120 IU/kg)显著高于其他处理组($P<0.05$)。

TLR19基因mRNA表达量的变化 由图 3可知, 和攻毒前相比, 在脾脏、肝脏、前肠以及高浓度VD₃处理组的头肾中, 攻毒后TLR19 mRNA的表达量均有所上升。头肾高浓度VD₃处理组(16600 IU/kg)该基因表达高于其他处理组, 但没有显著差异($P>0.05$); 在脾脏、肝脏和前肠中, TLR19 mRNA表达量总体上随维生素D₃水平升高显著下降($P<0.05$)。

TLR21基因mRNA表达量的变化 由图 4可知, 和攻毒前相比, 在头肾、脾脏、肝脏和前肠中, 攻毒后TLR21 mRNA的表达量均高于攻毒前。总体来说, 攻毒后, TLR21 mRNA基因表达随着饲料中VD₃浓度的升高而呈下降趋势($P<0.05$)。在4种免疫组织中, 高浓度VD₃处理组(16600 IU/kg)该基因表达显著低于其他处理组($P<0.05$)。

3 讨论

Toll样基因的mRNA广泛的分布在硬骨鱼类中

的各个组织中, 但不同的TLR基因在不同的鱼类表达模式不同。已有研究表明, 在斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)中, TLR18、TLR19和TLR21在脾脏或是在肝脏中表达量最高, 在其他组织中表达量相对较少^[17], TLR18在大西洋鲑(*Salmo salar*)的头肾分布较少, 在肝脏中分布最高, TLR19和TLR21在大西

洋鲑的头肾和脾脏中表达量最高^[18], TLR21在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的皮肤、头肾和脾脏中表达量相对较高^[19]。在本研究中, TLR18、TLR19和TLR21在所检测的组织中均有表达, 其中, TLR18在脾脏中表达量最高, 但在头肾和肝脏中同样高表达, 而TLR19和TLR21在脾脏中的表达量显著高于

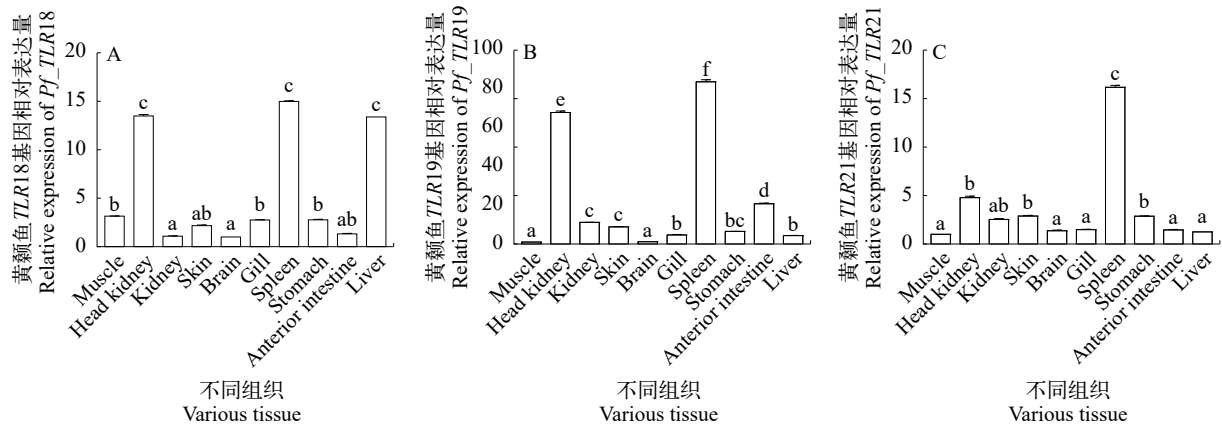


图1 黄颡鱼TLR18 (A)、TLR19 (B)和TLR21 (C)基因mRNA组织表达分布

Fig. 1 Tissue distribution of TLR18(A), TLR19(B), and TLR21(C) mRNA in *Pelteobagrus fulvidraco*

Muscle. 肌肉; Head kidney. 头肾; Kidney. 肾脏; Skin. 皮肤; Brain. 脑; Gill. 鳃; Spleen. 脾脏; Stomach. 胃; Anterior intestine. 前肠; Liver. 肝脏. 字母代表显著性差异(Duncan检验, $P < 0.05$). Letters indicate significant difference (Duncan test, $P < 0.05$)

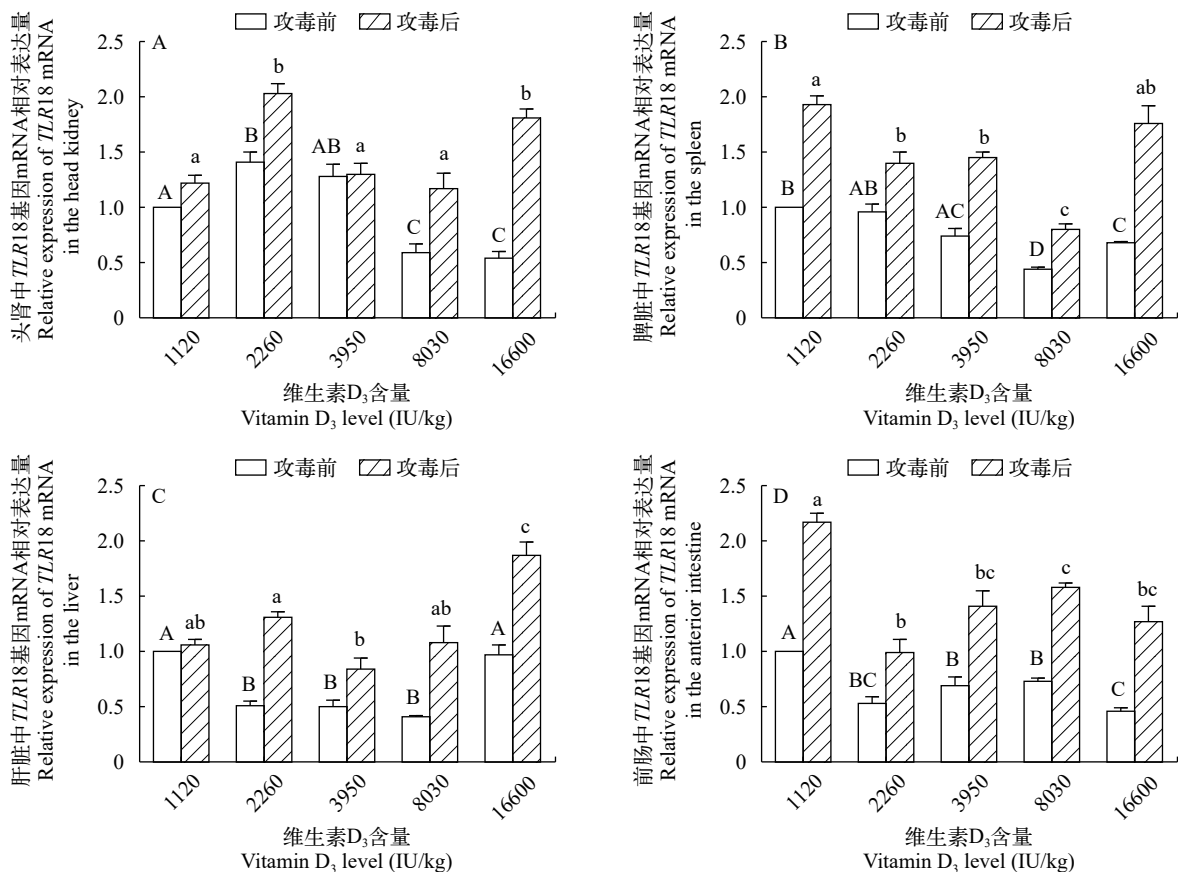


图2 攻毒前后TLR18 mRNA在黄颡鱼头肾(A)、脾脏(B)、肝脏(C)和前肠(D)中相对表达量的变化

Fig. 2 Changes in the relative mRNA expression levels of the TLR18 gene in the head kidney, spleen, liver and anterior intestine after the *Edwardsiella ictaluri* stimulation

其他组织, 其次为头肾组织。本结果证实了Wang等^[20]在黄颡鱼中的发现, 但与其他鱼中已有的研究成果有所不同, 可能是由于物种的差异性, 同一基因的mRNA在不同鱼类的分布具有特异性。

炎症是机体自身的一种保护性反应, 以确保持有害刺激, 修复受损组织的愈合过程, 微生物对细胞的感染会激活炎症反应, 感染的初始由先天模式识别受体(PRRs)介导^[21], TLRs是最常见的PRRs, TLRs识别特定的配体, 然后通过MyD88(Myeloid Differentiation Factor 88)信号通路或者TRIF(TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β)信号通路, 激活核转录因子(Nuclear Factor κ B, NF- κ B), 进而产生促炎细胞因子^[22]。到目前为止, TLR家族可以分为TLR1/3/4/5/7/11六种亚家族, 我们当前实验研究的主体是TLR18、TLR19和TLR21。TLR18是鱼类特有的基因, 隶属于TLR1亚家族, 已经被证明在硬骨鱼类的免疫中有重要作用^[23]。TLR19和TLR21都属于TLR11亚家族, 大部分TLR11亚家族的成员都仅在鱼类和青蛙中发现^[24]。TLR18与哺乳动物中的TLR6和TLR10类似, 用嗜水气单胞菌感染草鱼后, 草鱼体内的TLR18表达量会显著升高, 从而激

活NF- κ B通路, 发生炎症^[25]。TLR19基因序列非常保守, 优先作用于细胞内, 能够准确识别寄生虫的感染, 研究已经证实TLR19和斑点叉尾鲷抗小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)的免疫反应相关^[26], TLR21结构与TLR11相似, 牙鲆(*Paralichthys solivaceus*)受到鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后, 体内的TLR21表达量上调^[27]; 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)中TLR21和抗海水白点虫病(*Cryptocaryon irritans*)的免疫反应相关^[28]。由于TLR18、TLR19和TLR21在病原识别后信号转导的相似性比较高^[29], 因此我们可以将此三个基因同时进行研究。在本研究中, 我们探讨了饲料中添加不同含量维生素D₃喂养12周后, 再经过鲈爱德华氏菌攻毒后, 脾脏、头肾、肝脏和前肠中TLR18、TLR19和TLR21的表达。结果表明: 和攻毒前相比, 四个组织中攻毒后TLR18、TLR19和TLR21的表达都显著上升。这一结果与Wang等^[20]在对经过LPS和Poly(I:C)刺激后黄颡鱼中报道的结果一致: TLR18、TLR19和TLR21在脾脏、肝脏、头肾和血液中的表达量均增高。与斑点叉尾鲷中结果部分一致: 爱德华氏菌感染斑点叉尾鲷后, 其肝脏和脾脏中的TLR18、TLR19和TLR21表达

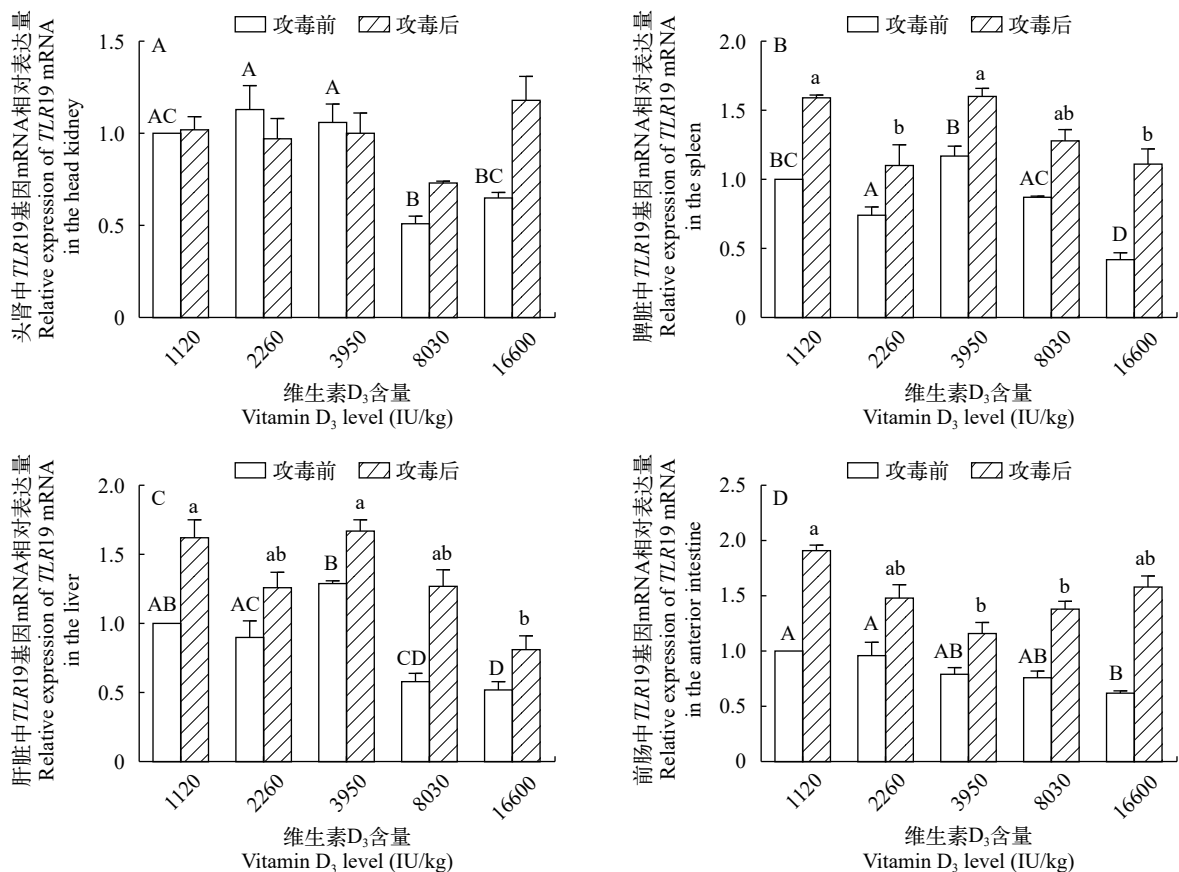


图3 攻毒前后TLR19 mRNA在黄颡鱼头肾(A)、脾脏(B)、肝脏(C)和前肠(D)中相对表达量的变化

Fig. 3 Changes in the relative mRNA expression levels of the TLR19 gene in the head kidney, spleen, liver and anterior intestine after the *Edwardsiella ictaluri* stimulation

量显著上调,但头肾中的TLR18、TLR19和TLR21的表达量会出现显著下调^[30]。本研究中的结果和文献中报道的结果都表明,TLR18、TLR19和TLR21在针对革兰氏阴性/阳性细菌和病毒的免疫应答中都起重要作用,促进了炎症的发生。至于爱德华氏菌感染斑点叉尾鲷后头肾中此3个基因表达模式与黄颡鱼不一致,也许存在物种特异性,具体原因还有待进一步研究。

维生素D₃是一种具有广泛生理效应的内分泌激素,动物实验表明其对机体免疫影响的机制在分子水平上可以分为两种,第一种是维生素D₃与免疫细胞的VDR结合,影响细胞的增殖分化和细胞因子的产生;第二种是维生素D₃可以活化免疫细胞的Toll样受体,从而发挥免疫作用^[31],鱼类此方面的研究较少,有关维生素D₃在鱼类免疫中作用及机制仍待深入探索。已有研究表明适宜的维生素D₃添加量可以显著的提高欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[32]、黄鳢(*Monopterus albus*)^[33]和金头鲷(*Sparus auratus*)^[34]相关免疫基因在免疫组织中的表达量。本实验结果也表明,饲料中不同的维生素D₃的添加水平显著

影响TLR18、TLR19和TLR21在黄颡鱼头肾、脾脏、肝脏和前肠4个组织中的表达,不论是攻毒前还是攻毒后,维生素D₃对此三个基因的影响都存在浓度剂量关系,证实维生素D₃对黄颡鱼免疫的调节作用。总体而言,以组织表达量最高的脾脏为例,TLR18、TLR19和TLR21的表达基本随着饲料中维生素D₃含量的增加而下降,表明饲料中适宜浓度的维生素D₃会促进TLR18、TLR19和TLR21的表达,高浓度的维生素D₃会抑制TLR18、TLR19和TLR21的表达,维生素D₃通过影响相关免疫基因的表达从而避免了鱼体细菌感染的发生。

4 结论

本研究探讨了黄颡鱼幼鱼经过为期12周的维生素D₃营养调控后,再经致病细菌攻毒后,维生素D₃的添加对黄颡鱼生长和Toll类受体TLR18、TLR19和TLR21表达的影响。结果显示,适宜维生素D₃浓度促进黄颡鱼生长和Toll类受体TLR18、TLR19和TLR21表达,并发现TLR18、TLR19和TLR21在不同组织中的表达和饲料中维生素D₃的浓度相关,本研

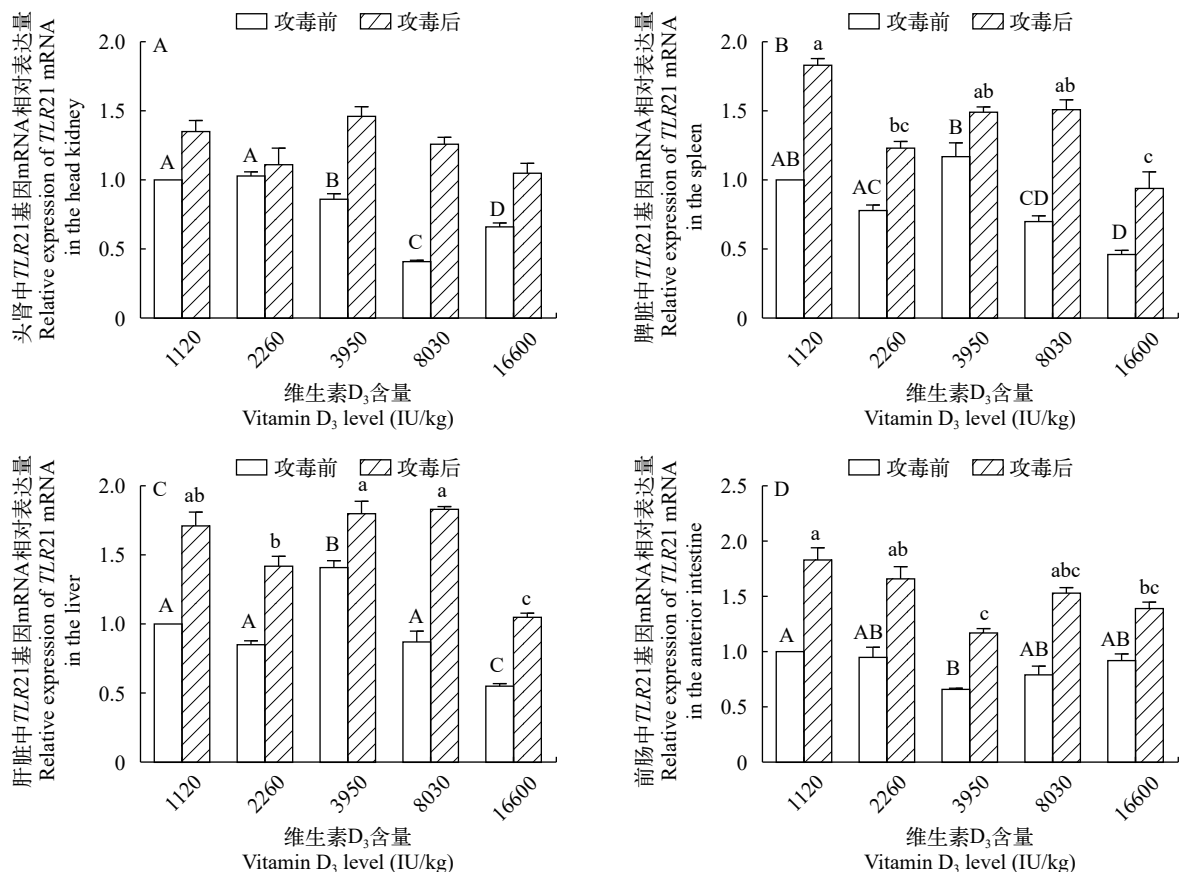


图4 攻毒前后TLR21 mRNA在黄颡鱼头肾(A)、脾脏(B)、肝脏(C)和前肠(D)中相对表达量的变化

Fig. 4 Changes in the relative mRNA expression levels of the TLR21 gene in the head kidney, spleen, liver and anterior intestine after the *Edwardsiella ictaluri* stimulation

究结果证实了饲料中添加合适剂量的维生素D₃,可以促进相关免疫基因的表达,从而增强黄颡鱼对病原微生物的抵抗力,高浓度的维生素D₃会抑制TLR18、TLR19和TLR21的表达,维生素D₃通过影响相关免疫基因的表达从而避免了鱼体细菌感染的发生。本结果为采用添加合适剂量的维生素D₃来增强鱼类的免疫能力,制作能提高鱼类免疫力的饲料提供了研究基础。

参考文献:

- [1] Zhang T, Xu Q Y. Advances in research on vitamin D requirements in fish [J]. *Feed Research*, 2010, (11): 62-65. [张铜, 徐奇友. 鱼类对维生素D需要量的研究进展 [J]. 饲料研究, 2010, (11): 62-65.]
- [2] Mostafa W Z, Hegazy R A. Vitamin D and the skin: focus on a complex relationship: A review [J]. *Journal of Advanced Research*, 2015, 6(6): 793-804.
- [3] Lock E J, Waagb R, Bonga S W, *et al.* The significance of vitamin D for fish: a review [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2010, 16(1): 100-116.
- [4] Calton E K, Keane K N, Newsholme P, *et al.* The impact of vitamin D levels on inflammatory status: a systematic review of immune cell studies [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): 141-147.
- [5] Schwartz Z, Ehland H, Sylvia V L, *et al.* 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ and 24 R, 25-dihydroxyvitamin D₃ modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(7): 2775-2786.
- [6] Fleet J C. Rapid, membrane-initiated actions of 1,25-dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean [J]? *Journal of Nutrition*, 2004, 134(12): 3215-3218.
- [7] Beard J A, Bearden A, Striker R. Vitamin D and the antiviral state [J]. *Journal of Clinical Virology*, 2011, 50(3): 194-200.
- [8] Fan Z J, Zou P F, Yao C L. Advances in fish Toll-like receptors and signal transduction [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 173-184. [范泽军, 邹鹏飞, 姚翠鸾. 鱼类Toll样受体及其信号传导的研究进展 [J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 173-184.]
- [9] Kwmar H, Kuwai T, Akwa S. Toll-like receptors and innate immunity [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 388(4): 621-625.
- [10] Rebl A, Goldammer T, Seyfert H. Toll-like receptor signaling in bony fish [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 134(3-4): 139-150.
- [11] Taro K, Shizuo A. Pathogen recognition with Toll-like receptors [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2005, 17(4): 338-344.
- [12] Li C Y, Huang B, Xiong J, *et al.* Molecular cloning and characterization of TLR21 gene from Japanese eel, *An-guilla japonica* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(2): 296-305. [李春艳, 黄贝, 熊静, 等. 日本鳗鲡TLR21基因的鉴定、免疫应答与启动子分析 [J]. 水生生物学报, 2017, 41(2): 296-305.]
- [13] Takano T, Hwang S D, Kondo H, *et al.* Evidence of molecular Toll-like receptor mechanisms in teleosts [J]. *Fish Pathology*, 2010, 245(1): 1-16.
- [14] Shen J Z. Biological characteristics and farming technology of *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Aquaculture and Feed*, 2002, (3): 25-28. [沈建忠. 黄颡鱼的生物学特性及其养殖技术 [J]. 养殖与饲料, 2002, (3): 25-28.]
- [15] Kui L L, Wu H D, Ruan J M, *et al.* Isolation and identification of the *Edwardsiella ictaluri* in *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Journal of Jiangxi Agricultural University*, 2014, 36(1): 187-192. [隗黎丽, 吴华东, 阮记明. 黄颡鱼鲺爱德华氏菌的分离及鉴定 [J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(1): 187-192.]
- [16] Zuo R T, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Effects of dietary N³-highly unsaturated fatty acids on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(2): 249.
- [17] Zhao F, Li Y W, Pan H J, *et al.* Expression profiles of toll-like receptors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(6): 993-997.
- [18] Lee P T, Zou J, Holland J W, *et al.* Identification and characterization of TLR18-21 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 549-555.
- [19] Wang W, Shen Y, Pandit N P, *et al.* Molecular cloning characterization and immunological response analysis of Toll-like receptor (TLR21) gene in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 40(3-4): 227-231.
- [20] Wang K L, Ji W, Wei K J, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of three TLR genes in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Responses to stimulation of *Aeromonas hydrophila* and TLR ligands [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, (66): 466-479.
- [21] Osamu T, Shizuo A. Pattern recognition receptors and inflammation [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 805-820.
- [22] Palti Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1263-1272.
- [23] Zhang J, Kong X H, Zhou C J, *et al.* Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: Ligand specificity and signal pathways [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 380-388.
- [24] Wang J L, Zhang Z, Fu H, *et al.* Structural and evolutionary characteristics of fish specific TLR19 [J]. *Fish &*

- Shellfish Immunology*, 2015, **47**(1): 271-279.
- [25] Huang W J, Shen Y, Xu X Y, *et al.* Identification and characterization of the *TLR18* gene in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, (47): 681-688.
- [26] Zhao F, Li Y W, Pan H J, *et al.* Expression profiles of toll-like receptors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, **35**(3): 993-997.
- [27] Gao H, Wu L, Sun J S, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of Toll-like receptor 21 cDNA from *Paralichthys olivaceus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, (35): 1138-1145.
- [28] Li Y W, Luo X C, Dan X M, *et al.* Molecular cloning of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) *TLR21* and expression analysis post *Cryptocaryon irritans* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, **32**(3): 476-481.
- [29] Bell J K, Mullen G E D, Leifer C A, *et al.* Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors [J]. *Trends in immunology*, 2003, **24**(10): 528-533.
- [30] Zhang J, Liu S, Liu Z, *et al.* Pathogen recognition receptors in channel catfish: III phylogeny and expression analysis of Toll-like receptors [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, **40**(1): 185-194.
- [31] Naim M, Maalouf M D. The noncalcitropic actions of vitamin D₃ recent clinical developments [J]. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2008, **17**(4): 408-415.
- [32] Rebeca C, Alberto C, Lee J, *et al.* Effects of dietary vitamin D₃ administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **26**(2): 243-248.
- [33] Li D B, Li C, Zhou D G, *et al.* Effects of dietary vitamin D₃ level on expression of antimicrobial peptide *hepcidin* gene in *Monopterus albus* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, **24**(8): 1520-1526. [黎德兵, 李超, 周定刚, 等. 饲料中维生素D₃水平对黄鳝抗菌肽*hepcidin*基因表达的影响 [J]. 动物营养学报, 2014, **24**(8): 1520-1526.]
- [34] Cerezuela R, Cuesta A, Meseguer J, *et al.* Effects of dietary vitamin D₃ administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, **26**(2): 243-245.

EFFECTS OF DIETARY VITAMIN D₃ ON THE GROWTH AND EXPRESSION OF *TLR18*, *TLR19* AND *TLR21* IN THE JUVENILE YELLOW CATFISH *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*

GUO Xun, CHENG Ke, MA Chun-Song, CHEN Xin and WANG Chun-Fang

(Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of dietary vitamin D₃ levels on the growth performance and the expression of *TLR18*, *TLR19* and *TLR21* in *Pelteobagrus fulvidraco*. A total of 800 healthy *Pelteobagrus fulvidraco* with an average body weight of (5.0±0.2) g were randomly assigned to 5 groups with 4 replicates per group and 40 fishes per replicate. Juvenile yellow catfish were fed with the basal diet supplemented with 1120, 2260, 3950, 8030 and 16600 IU/kg vitamin D₃. After a 12-week growth trial, 50 fish from each treatment were injected with *Edwardsiella ictaluri*, and the fish were challenged for 72h. The spleen, head kidney, liver and anterior intestine from fish in each group were collected at 0 and 72h after the *Edwardsiella ictaluri* challenge and were used to detect the expression of three toll-like receptors, i.e., *TLR18*, *TLR19* and *TLR21*. Meanwhile, the muscles, head kidney, kidney, skin, brain, gill, spleen, stomach, anterior intestine and liver were collected from fresh nonexperimental yellow catfish to detect the tissue distribution of *TLR18*, *TLR19* and *TLR21*. The results showed that different levels of dietary vitamin D₃ can significantly affect growth performance. The *TLR18*, *TLR19* and *TLR21* genes were expressed in all tested tissues, but the highest expression was found in the spleen. The *Edwardsiella ictaluri* challenge significantly increased the expression of *TLR18*, *TLR19* and *TLR21*. Different levels of dietary vitamin D₃ had a significant influence on *TLR18*, *TLR19* and *TLR21* gene mRNA expression in the head kidney, spleen, liver and anterior intestine both before and after the pathogen challenge. These results showed that appropriate supplementation with dietary vitamin D₃ can stimulate the growth and pathogen resistance of juvenile yellow catfish.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; Vitamin D₃; *TLR18*; *TLR19*; *TLR21*