

文章编号: 1000-0615(2018)12-1957-10

DOI: 10.11964/jfc.20180411240

## 齐口裂腹鱼HMGB1基因克隆及其对嗜水气单胞菌胁迫的响应

王虹<sup>1</sup>, 彭爽<sup>1</sup>, 刘佳喜<sup>1</sup>, 陈德芳<sup>1\*</sup>, 王艳<sup>1</sup>, 耿毅<sup>2</sup>,  
汪开毓<sup>2</sup>, 李志琼<sup>1</sup>, 黄小丽<sup>1</sup>, 欧阳萍<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学动物科技学院, 四川成都 611130;

2. 四川农业大学鱼病研究中心, 四川成都 611130)

**摘要:** 为了解齐口裂腹鱼高迁移率蛋白B1 (*Schizothorax prenanti* high mobility group box 1, SpHMGB1)的序列特征及其与嗜水气单胞菌胁迫的相关性, 实验根据齐口裂腹鱼脾脏TSA库中获得的序列设计引物, 采用克隆技术克隆SpHMGB1的核心序列并进行生物信息学分析, 采用实时荧光定量PCR (qPCR)技术检测嗜水气单胞菌在体和离体胁迫后组织和巨噬细胞中SpHMGB1的响应情况。序列分析结果显示, SpHMGB1开放阅读框长为615 bp, 编码204个氨基酸, 理论分子量为23.5 ku, 等电点为6.79, 包含2个基本的HMG盒: A盒和B盒, 以及一个酸性尾巴。SpHMGB1二级结构主要由47.06%的 $\alpha$ -螺旋和50%的无规则卷曲构成。系统进化树分析显示, SpHMGB1与鱼类HMGB1聚为一支, 与斑马鱼和鲫的亲缘关系最近, 氨基酸一致性分别为90.7%和90.4%。qPCR检测结果显示, 嗜水气单胞菌感染后SpHMGB1具有不同的时空表达趋势, 其中血液在72 h表达量最高, 肾脏在6 h表达量最高, 脾脏在120 h表达量最高; 热灭活嗜水气单胞菌刺激巨噬细胞后, SpHMGB1的表达量在0.5~24 h下调, 24 h表达量最低, 细胞因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达量均有上调趋势。qPCR检测结果提示, SpHMGB1可能参与齐口裂腹鱼细菌感染后的免疫响应。本实验可为进一步研究SpHMGB1在齐口裂腹鱼细菌性疾病中的免疫调节机制提供参考。

**关键词:** 齐口裂腹鱼; 嗜水气单胞菌; 高迁移率蛋白B1; 免疫响应

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

高迁移率蛋白B1(high mobility group box 1, HMGB1)是一种含量丰富、富含电荷的核蛋白, 在机体内发挥重要的功能。1999年Wang等<sup>[1]</sup>首次研究表明, HMGB1在内毒素引发的小鼠败血症中是一个重要的免疫因子。随后越来越多的研究发现, HMGB1可通过与免疫细胞相互作用, 从而参与机体的免疫应答。研究表明, 哺乳动物HMGB1可以激活巨噬细胞, 促进树突状细胞的迁移和激活, 有助于CD4+T细胞增殖、存活和Th1细胞分化。随后, 这些被激活的免疫细胞分泌

IL-1、IFN- $\gamma$ 和TNF- $\beta$ 等细胞因子调节机体免疫<sup>[2-3]</sup>。对鱼类HMGB1的研究滞后于哺乳动物, 目前仅在美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)<sup>[4]</sup>、七鳃鳗(*Lamprologus japonicum*)<sup>[5]</sup>、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[6]</sup>、红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*)<sup>[7]</sup>、斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[8]</sup>、金鱼(*Carassius auratus*)<sup>[9]</sup>和许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)<sup>[10]</sup>上克隆了HMGB1基因并进行了功能初探。然而, 目前还未见冷水鱼类关于HMGB1结构和参与细菌感染后免疫响应的报道。

收稿日期: 2018-04-11 修回日期: 2018-06-16

资助项目: 国家自然科学基金(31602148); 四川农业大学双支计划

通信作者: 陈德芳, E-mail: chendefang2011@qq.com

齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)属鲤科(Cyprinidae)、裂腹鱼亚科(Schizothoracinae),俗称雅鱼、细鳞鱼等,主要分布于我国长江上游的金沙江、岷江、大渡河、青衣江及乌江下游等水域,适宜生长水温为15~22 °C,是长江上游特有的冷水性鱼类。近年来,随着齐口裂腹鱼池塘养殖的快速发展,特别是高密度的养殖,导致一些细菌性疾病的暴发越加频繁,严重阻碍了齐口裂腹鱼养殖行业的发展<sup>[1]</sup>。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是水产养殖上常见的革兰氏阴性条件致病菌,研究表明嗜水气单胞菌感染齐口裂腹鱼后死亡率达40%~80%,给养殖户带来了严重的经济损失<sup>[12-13]</sup>。然而,目前对齐口裂腹鱼免疫的研究还十分匮乏。

本实验对*SpHMGB1*基因序列特征和系统进化进行分析,并使用qPCR技术检测齐口裂腹鱼在嗜水气单胞菌胁迫后,*SpHMGB1*在血液、脾脏和肾脏中的时空表达趋势,以及头肾巨噬细胞在热灭活嗜水气单胞菌刺激后*SpHMGB1*、*IL-1 $\beta$* 和*TNF- $\alpha$* 的表达变化,为进一步研究冷水性鱼类HMGB1的免疫应答机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

健康齐口裂腹鱼购买于周公河雅鱼有限公司(雅安,中国),规格分别为(60±10)g和(750±50)g。将购买回的齐口裂腹鱼养殖于提前消毒的鱼缸中(50 cm×40 cm×40 cm)。暂养期间保持水体持续充氧,养殖水温为(23±1) °C,每天换鱼缸体积1/3的水,于上午9:00和下午16:00投喂商业饲料。观察鱼体的健康状态,实验前随机挑选5尾鱼,麻醉致死取脾脏在LB平板划线接种,检测有无嗜水气单胞菌感染,暂养周期为2周。

嗜水气单胞菌由四川农业大学鱼病研究中心提供;*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞(天根生化科技有限公司,中国);胰蛋白胨,酵母提取物(Oxoid公司,英国);克隆载体 pMD19-T、Sample protector for RNA/DNA、RNAiso Plus、RNAiso Blood、DL2000 DNA marker、PrimeScript TM Reagent Kit cat#RR047A、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus)(宝生物工程公司,中国);10×HBSS含酚红、肝素钠、三抗、percoll分离液、

0.01 mol/L PBS (Solarbio公司,中国);DMEM培养液(Hyclone公司,美国);胎牛血清(Zeta life公司,美国)。

### 1.2 克隆及序列分析

**克隆** 根据NCBI齐口裂腹鱼脾脏TSA数据库检索得到的序列,设计*SpHMGB1*-F/R引物(表1),以脾脏cDNA为模板,进行PCR扩增。PCR扩增程序:94 °C预变性4 min;94 °C变性30 s,56 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,35个循环;72 °C延伸8 min,12 °C保存。1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统检测扩增结果。参照胶回收试剂盒说明书回收目的片段,与pMD19-T连接、转入*E. coli* DH5 $\alpha$ ,铺板于氨苄-LB培养基上培养。PCR检测阳性菌落,送公司测序。

**序列分析** 使用EditSeq软件检测*SpHMGB1*开放阅读框并推导氨基酸序列;使用ProtParam program of ExPASy ([http://www.ex-pasy.ch/tools/protpara\\_m.html](http://www.ex-pasy.ch/tools/protpara_m.html))对*SpHMGB1*氨基酸序列的基本理化性质进行分析;使用SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>)对*SpHMGB1*信号肽进行预测;使用在线软件[http://www.cbs.dtu.dk/services/Net\\_SurfP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/Net_SurfP/)对HMGB1的二级结构进行预测;使用Clustalx 1.81软件对*SpHMGB1*与其他脊椎动物HMGB1序列进行比对;使用MEGA 6.0软件对*SpHMGB1*系统发育树进行构建。

### 1.3 嗜水气单胞菌胁迫实验

**细菌的制备** 嗜水气单胞菌接种于LB培养基中,28 °C培养18~24 h,革兰氏染色观察细菌形态。提取细菌基因组DNA,16S rRNA基因鉴定细菌,送公司测序。鉴定正确的细菌经离心并PBS重悬2次后,用麦氏比浊管调节细菌浓度为1×10<sup>7</sup> CFU/mL,用于细菌在体感染实验。将调整好浓度(1×10<sup>7</sup> CFU/mL)的嗜水气单胞菌90 °C水浴30 min,平板接种检测无菌生长,制得热灭活嗜水气单胞菌,用于离体巨噬细胞刺激实验。

**在体感染与样品采集** 暂养后的齐口裂腹鱼[(60±10)g, n=50]随机分为2组,即实验组和对照组。MS-222 (50 mg/L)麻醉后实验组腹腔注射0.1 mL浓度为1×10<sup>7</sup> CFU/mL的嗜水气单胞菌,对照组注射等量PBS,放回鱼缸中常规养殖。在注射后的0.5、6、24、72和120 h,每组取5尾,麻醉致死抽取尾静脉血装入盛有1 mL血液RNA

表 1 qPCR引物

Tab. 1 The primer of qPCR

引物 primer	序列(5'-3') sequence	退火温度/°C annealing temperature	片段大小/bp fragment size
<i>SpHMGB1</i> -F	ATGGGGAAGGATCCAACAAAACCAA	56	615
<i>SpHMGB1</i> -R	CTACTCGTCGTCATCCTCTTCCTCATCA		
18S <i>rRNA</i> -F	ACCACCCACAGAATCGAGAAA	58	99
18S <i>rRNA</i> -R	GCCTGCGGCTTAATTTGACT		
$\beta$ -actin-F	CGAGCTGTCTTCCCATCCA	60	86
$\beta$ -actin-R	TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG		
<i>SpHMGB1</i> -F	CCGAGCGATGGAAGACTATG	58.7	114
<i>SpHMGB1</i> -R	CGCCTTTGGGTGGAATGTA		
<i>IL-1<math>\beta</math></i> -F	GGTGGTGAACATCATCATGTC	55.7	120
<i>IL-1<math>\beta</math></i> -R	AGACGCTCTTCGATCACATTC		
<i>TNF-<math>\alpha</math></i> -F	TGTCTGCTTCACGCTCAACA	59	116
<i>TNF-<math>\alpha</math></i> -R	AATGGATGGCWGCCTTGGA		

裂解液的EP中, 解剖采集脾脏和肾脏组织放于装有1 mL RNA/DNA保护剂的EP管中,  $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

**离体刺激与样品采集** 取暂养后的齐口裂腹鱼[(750±50) g,  $n=5$ ], 用MS-222 (400 mg/L) 麻醉致死尾静脉采血和剪鳃放血, 无菌条件下解剖, 迅速采集头肾组织于细胞培养基中。参照Jiang等<sup>[14]</sup>方法分离头肾巨噬细胞,  $22^{\circ}\text{C}$ 培养4~8 h, 使细胞贴壁备用。在贴壁的巨噬细胞中加入100  $\mu\text{L}$ 浓度为 $1\times 10^7$  CFU/mL的热灭活嗜水气单胞菌, 同时以添加等量无菌PBS为对照组,  $22^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。在刺激后的0.5、4、12、24和48 h收集细胞于装有1 mL RNA/DNA裂解液的EP管中, 每个时间点5个重复,  $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。

#### 1.4 总RNA的提取和cDNA的合成

参照RNAiso Plus试剂盒说明书提取脾脏和肾脏组织总RNA, 参照RNAiso Blood试剂盒说明书提取血液总RNA, 检测RNA质量, 并反转录成cDNA,  $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

#### 1.5 qPCR检测试验

**引物合成** 采用软件Primer 5.0设计 *SpHMGB1* 克隆引物和 *SpHMGB1* 荧光定量引物(表1), *IL-1 $\beta$* 和*TNF- $\alpha$* 参考文献<sup>[15-16]</sup>, 以 $\beta$ -actin、18S *rRNA*为内参基因<sup>[17]</sup>, 送生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**qPCR 检测** 采用 Step One Plus™ 实时荧光定量 PCR 系统对各组织样品进行荧光定量检测, 每个样品3个重复。

#### 1.6 数据处理

所得数据使用Excel软件进行计算, 结果以平均值±标准误(mean±SE)表示。基因表达量结果使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算<sup>[18]</sup>。用SPSS 19.0统计软件对实验数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),  $P<0.05$ 表示组间差异显著。

## 2 结果

### 2.1 *SpHMGB1*的克隆

PCR扩增后获得单一条带, 大小与预期一致(图1)。T-克隆阳性菌落测序显示, 目的片段长度为615 bp。

### 2.2 *SpHMGB1*序列分析

*SpHMGB1*开放阅读框长615 bp, 编码204个氨基酸(图2), 理论分子量为23.5 ku, 等电点为6.79, 富含Lys (18.6%)和Glu (13.2%)。信号肽分析显示, *SpHMGB1*不含信号肽。*SpHMGB1*氨基酸序列进行区域结构分析结果显示, *SpHMGB1*由A盒(氨基酸7~77)、B盒(氨基酸94~162)和酸性尾巴(氨基酸183~204)组成。

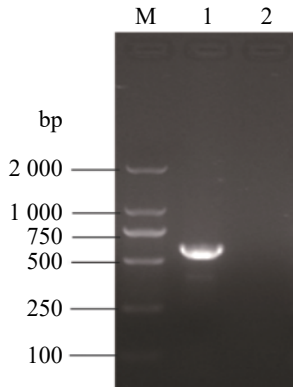


图1 SpHMGB1基因PCR扩增

M: 2000 DNA Marker DL; 1. 目的基因; 2. 空白对照

Fig. 1 Amplification of SpHMGB1 gene

M: 2000 DNA Marker DL; 1. target gene; 2. blank control

### 2.3 SpHMGB1二级结构

SpHMGB1的二级结构预测结果显示, SpHMGB1主要由α-螺旋和无规则卷曲组成, 其中α-螺旋的比例为47.06%(96个氨基酸残基), 无规则卷曲比例为50%(102个氨基酸残基), 延展链比例为2.94%(6个氨基酸残基)(图3)。

### 2.4 SpHMGB1进化树分析

氨基酸一致性分析表明, SpHMGB1氨基酸序列与包括哺乳动物、鸟类、两栖类和硬骨鱼类在内的脊椎动物HMGB1氨基酸一致性为64.75%~90.7%, 其中与鲫HMGB1一致性为90.4%(GenBank 序列号: AHI15743), 与斑马鱼HMGB1的一

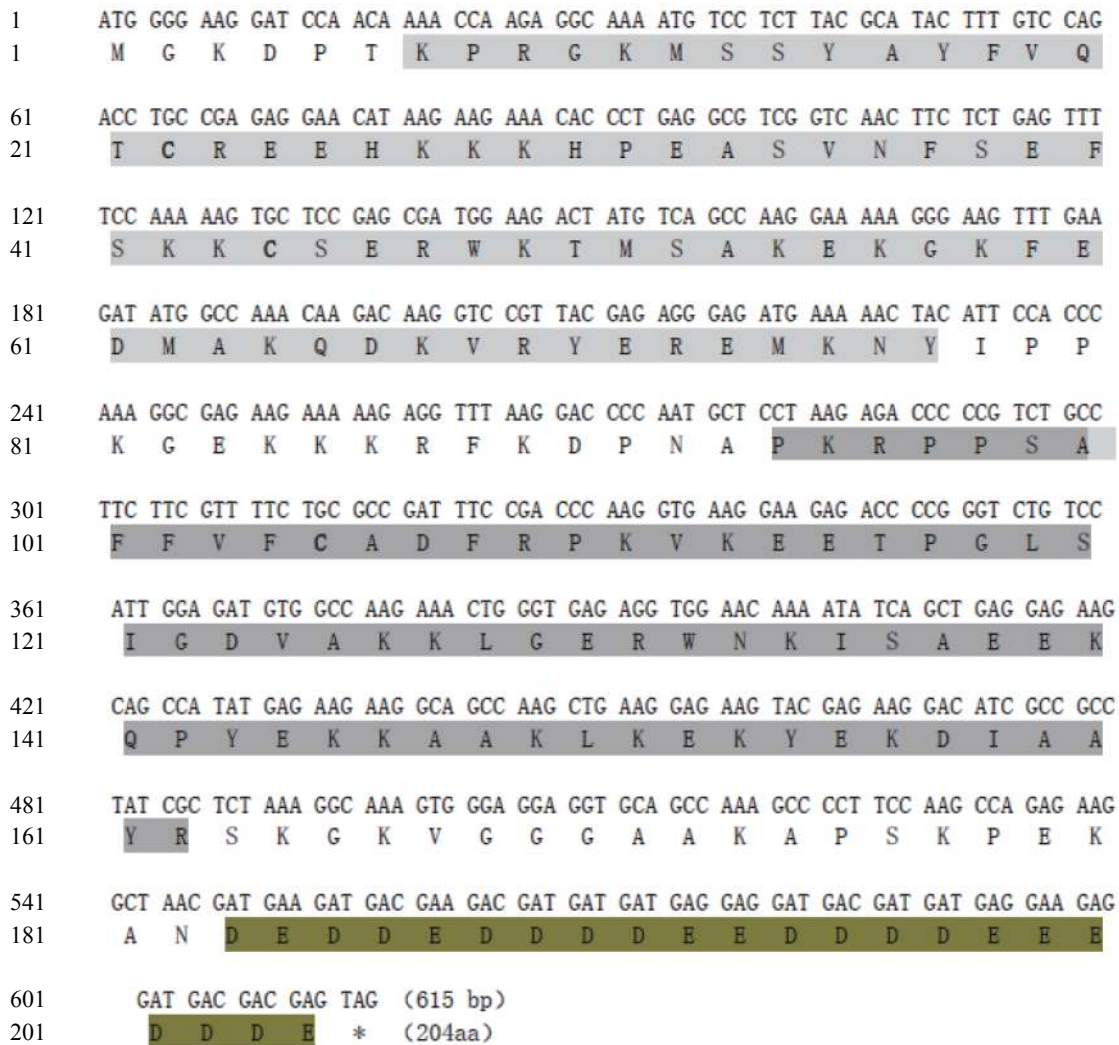


图2 SpHMGB1 ORF区及其编码的氨基酸序列

浅阴影为A盒, 深阴影为B盒, 棕色为酸性尾巴

Fig. 2 The ORF and its codes amino acid sequence of SpHMGB1

Shallow shadow is A box, deep shadow is B box and brown is acid tail

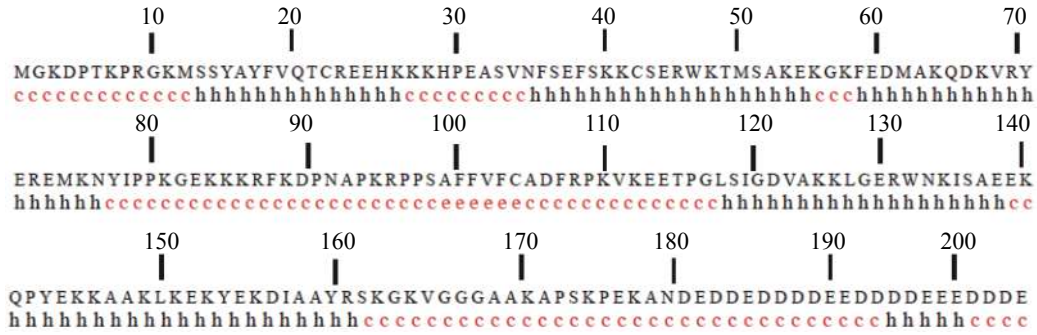


图 3 SpHMGB1氨基酸序列二级结构预测

h.  $\alpha$ -螺旋, e. 延展链, c. 无规则卷曲

Fig. 3 Secondary structure prediction of the deduced SpHMGB1 protein

h.  $\alpha$ -helix, e. extending chain, c. random coil

致性为90.7%(GenBank序列号: AAI65307)。系统发育显示, SpHMGB1与硬骨鱼类的HMGB1聚为一支, 与斑马鱼和鲫亲缘关系最为接近(图4)。

### 2.5 嗜水气单胞菌感染对SpHMGB1基因表达量的影响

嗜水气单胞菌在体感染后, 血液中SpHMGB1基因表达量在0.5~72 h上调, 48 h达到峰值(图5-a);

脾脏中SpHMGB1表达量在0.5 h无明显变化, 6~120 h显著上调( $P < 0.05$ ), 在120 h达到峰值(图5-b); 肾脏中SpHMGB1表达量在0.5~6 h显著上调( $P < 0.05$ ), 6 h达到峰值(图5-c)。

### 2.6 嗜水气单胞菌刺激对巨噬细胞SpHMGB1表达量的影响

对热灭活嗜水气单胞菌刺激后头肾巨噬细胞

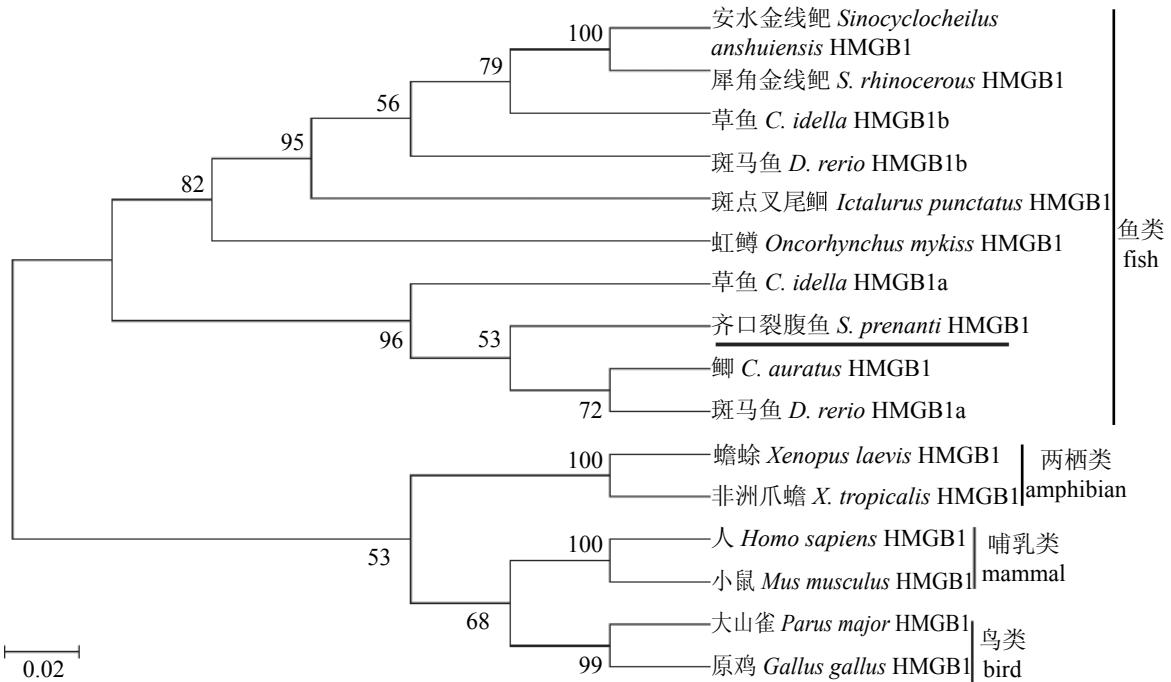


图 4 SpHMGB1系统进化分析

比例尺表示每个残基的替代率, 位于节点上的数字表示置信度, 重复次数为1 000, SpHMGB1用黑线标出, 右侧为脊椎动物分类

Fig. 4 Phylogenetic analysis of SpHMGB1

The scale bar indicate the average number of amino acid substitutions per site, numbers at nodes indicate the bootstrap value obtained after 1 000 resampling efforts and refers to percentage divergence, and the SpHMGB1 was indicated by black line, the right side was vertebrate classification

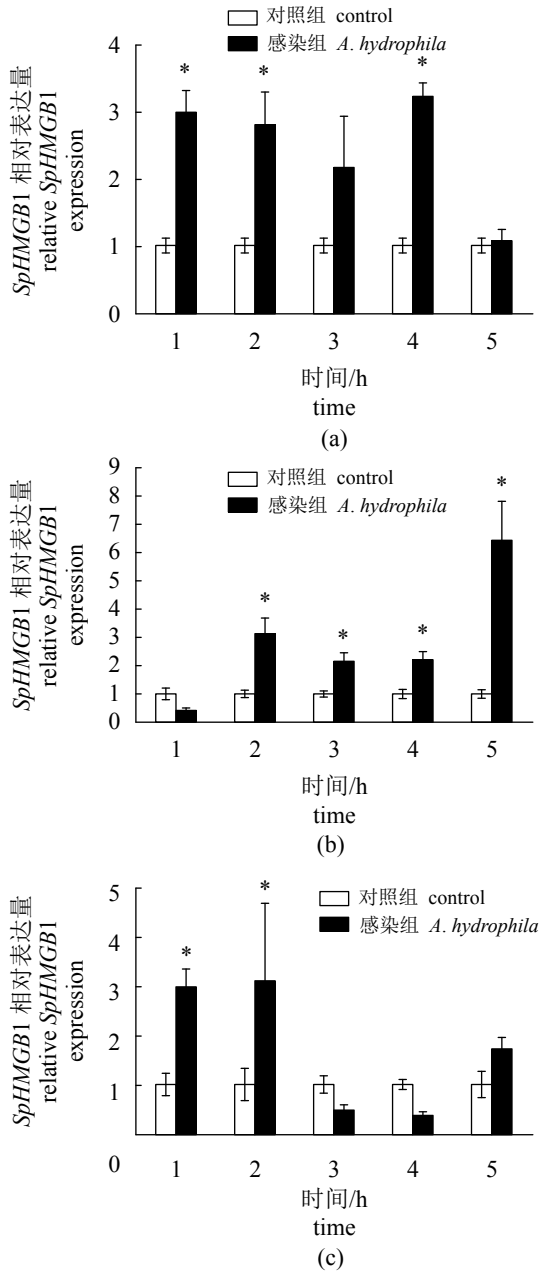


图 5 嗜水气单胞菌感染齐口裂腹鱼后血液(a)、脾脏(b)和肾脏(c)中SpHMGB1基因表达量变化

“\*”表示差异显著(P<0.05), 下同。1. 0.5 h, 2. 6 h, 3. 24 h, 4. 72 h, 5. 120 h

Fig. 5 SpHMGB1 expression dynamics of blood (a), spleen (b) and kidney (c) in S. prenanti infected by A. hydrophila

“\*” show significant difference (P<0.05). The same below. 1. 0.5 h, 2. 6 h, 3. 24 h, 4. 72 h, 5. 120 h

SpHMGB1基因表达量进行检测, 结果显示, 与对照组相比, 热灭活嗜水气单胞菌刺激后SpHMGB1在0.5~24 h表达下调, 48 h恢复至对照组水平(图6-a)。进一步对刺激后的巨噬细胞表达的细胞因

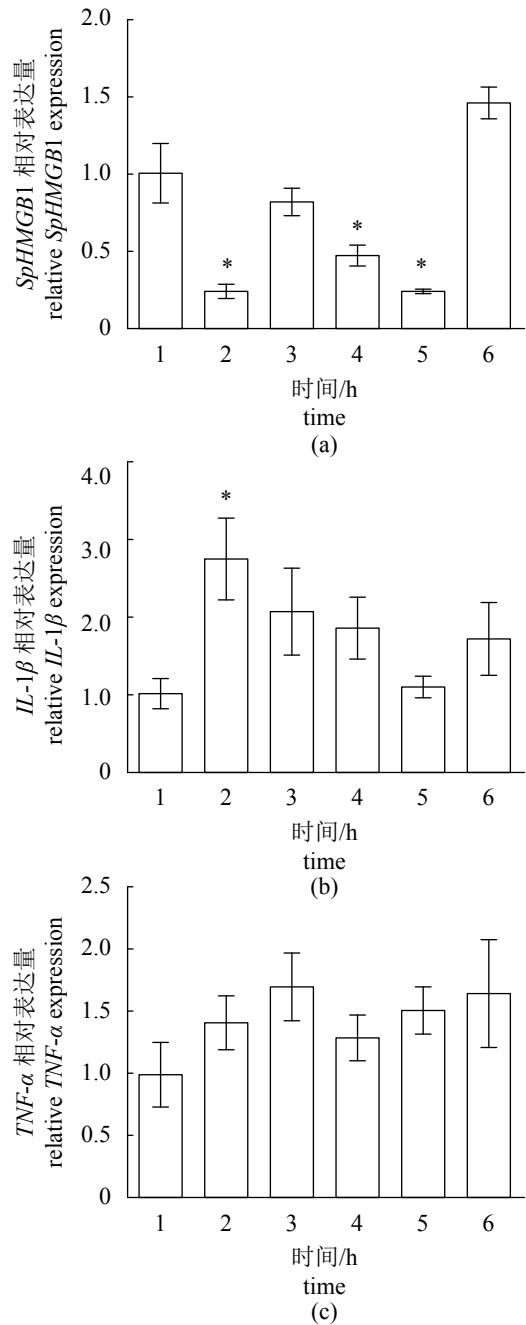


图 6 热灭活嗜水气单胞菌刺激后头肾巨噬细胞SpHMGB1 (a)、L-1β (b)和TNF-α (c)表达量变化

1. 对照组, 2. 0.5 h, 3. 4 h, 4. 12 h, 5. 24 h, 6. 48 h

Fig. 6 SpHMGB1 (a), L-1β(b) and TNF-α (c) expression dynamics of head-kidney macrophage stimulated by heat-killed A. hydrophila

1. control group, 2. 0.5 h, 3. 4 h, 4. 12 h, 5. 24 h, 6. 48 h

子IL-1β和TNF-α进行检测, 结果显示IL-1β在肋道后的0.5 h表达量显著上调, 在4~24 h逐渐恢复至对照组水平, 48 h时IL-1β表达量略有上调, 但差异不显著(图6-b)。TNF-α表达量在0.5~48 h与对照

组相比有上调趋势, 但差异不显著(图6-c)。

### 3 讨论

实验从齐口裂腹鱼上获得了HMGB1的核心序列, 其开放阅读框全长为615 bp, 编码204个氨基酸, 拥有HMGB1的典型特征: A盒、B盒和酸性尾巴。系统发育分析显示, SpHMGB1与硬骨鱼类聚为一支, 且与鲫和斑马鱼亲缘关系最近。因此, 本实验所得序列是脊椎动物HMGB1家族成员。SpHMGB1氨基酸序列与脊椎动物具有较高的保守性, 提示不同动物HMGB1在功能上可能具有相似性。哺乳动物HMGB1是一种胞内普遍存在的核蛋白, 在维持染色质的结构功能、调控基因表达和调节免疫过程中发挥着重要作用。研究表明, 哺乳动物HMGB1具有与DNA结合的能力; 七鳃鳗和许氏平鲑重组的HMGB1证实可以绑定到DNA上<sup>[5]</sup>。DNA骨架极性带负电, 因此极性带正电的Arg (R)、His (H)和Lys (K)所在序列具有与DNA结合的能力。本实验发现, SpHMGB1富含Lys (18.6%), 这可为SpHMGB1与DNA结合提供条件。 $\alpha$ -螺旋结构在DNA结合基序中有重要的作用, 含有 $\alpha$ -螺旋的基序具有与DNA结合的能力, 如锌指结构、亮氨酸拉链、螺旋-转角-螺旋。SpHMGB1主要由 $\alpha$ -螺旋和无规则卷组成, 在高级结构中可形成“螺旋-转角-螺旋”结构, 这有助于SpHMGB1结合到DNA上。信号肽具有指导蛋白质跨膜转移的功能, 在信号肽的指导下蛋白通过内质网和高尔基体折叠与修饰, 随后经过高尔基体边缘突起形成小泡运输到细胞膜。已有研究表明, HMGB1作为一种不含信号肽的蛋白, 可通过溶血磷脂酰胆碱触发, 以一种非典型的囊泡方式运输到胞外<sup>[9]</sup>。本实验发现SpHMGB1不含信号肽, 这提示SpHMGB1可能采用相似胞外运输机制。

本实验中, 嗜水气单胞菌在体感染后, 血液SpHMGB1首先快速响应, 且在0.5~72 h表达量持续上调; 而脾脏SpHMGB1在6 h开始响应, 120 h达到峰值; 肾脏在0.5~6 h显著上调, 表明SpHMGB1参与齐口裂腹鱼嗜水气单胞菌感染后的响应。这一结果与目前鱼类上的研究类似, 美国红鱼在迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)感染后, 头肾组织HMGB1的表达量在12~48 h显著上调<sup>[4]</sup>。七鳃鳗在LPS和ConA刺激后, 鳃组织

HMGB1的表达量显著上调<sup>[5]</sup>。硬骨鱼类中的研究表明, HMGB1参与病原感染后的免疫响应。本研究发现SpHMGB1的响应情况可能与嗜水气单胞菌对组织的感染入侵存在相关性。腹腔注射的细菌通过腹膜毛细血管最先进入血液, 血液中含有丰富的单核细胞和白细胞等免疫细胞, 因此能最先感应到危险因子, 免疫细胞快速被激活, 从而表达效应分子。随着病原的迁移, 机体免疫场所发生改变, 脾脏启动抗病机制, 因此相较于血液, 脾脏的响应滞后(6 h开始响应)。此外, 本实验在感染后的0.5~6 h检测到肾脏SpHMGB1表达量显著变化。肾脏是鱼类重要的泌尿器官, 兼具造血功能, 也是嗜水气单胞菌败血症的主要靶器官, 嗜水气单胞菌感染团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)后, 肾小管有不同程度的病变, 肾小球毛细血管肿胀且严重坏死<sup>[20]</sup>。嗜水气单胞菌感染剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)后, 11~19 h出现肾小球、肾小管固缩和溶解坏死<sup>[21]</sup>。本实验中嗜水气单胞菌感染后, 在24~120 h随着感染进程的发展, SpHMGB1表达下调。同时对嗜水气单胞菌感染齐口裂腹鱼肾脏进行病理观察发现, 肾脏的肾小管上皮细胞排列松散, 管腔结构不清晰, 肾间质出血坏死, 伴有嗜中性白细胞浸润, 红染物质出现, 大量肾小球毛细血管扩张出血。因此推测随着感染, 肾脏组织出现坏死, 细胞结构破坏, 使得免疫相关细胞的数量急剧减少, 是细胞因子表达水平下降的可能原因。

巨噬细胞是鱼类重要的免疫细胞, 具有吞噬病原、激活淋巴球或其他免疫细胞的功能, 此外巨噬细胞被病原激活后可以表达多种效应分子, 调节机体免疫反应。本实验发现, 齐口裂腹鱼头肾巨噬细胞在热灭活嗜水气单胞菌刺激后, 0.5~24 h SpHMGB1表达量明显下调。与本实验结果类似的是, 草鱼肾组织细胞用LPS和肽聚糖刺激后HMGB1a和HMGB1b均以显著下调方式参与响应<sup>[6]</sup>。与本实验响应方式存在差异的是美国红鱼头肾巨噬细胞在迟缓爱德华菌感染后, 4~24 h HMGB1的表达量显著上调<sup>[4]</sup>。类似的, 金鱼巨噬细胞受到热灭活海鱼分枝杆菌和杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)刺激后可诱导HMGB1基因和蛋白表达<sup>[9]</sup>。由此可见, 鱼类细胞HMGB1响应病原胁迫的方式存在差异, 造成这种响应差异的原因还有待进一步研究。热灭

活嗜水气单胞菌的主要成分为脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 研究发现LPS结合蛋白(LPS-binding protein, LBP)是最快将LPS分子转移到巨噬细胞表面受体CD14上的蛋白<sup>[22]</sup>。LPS-LBP与CD14结合后, 形成LPS/LBP/CD14三联复合物, 激活巨噬细胞表达细胞因子<sup>[23]</sup>。本实验对热灭活嗜水气单胞菌刺激后的巨噬细胞表达的 $IL-1\beta$ 和 $TNF-\alpha$ 进行检测。结果显示, 在0.5 h时 $IL-1\beta$ 的表达显著升高, 4~24 h表达高于对照组;  $TNF-\alpha$ 的表达在检测期间也均高于对照组。因此推测, 热灭活革兰氏阴性菌刺激巨噬细胞后, LPS可能快速与宿主LBP结合形成LPS-LBP复合物, 通过与细胞表面CD14受体迅速激活巨噬细胞, 使得细胞因子 $IL-1\beta$ 和 $TNF-\alpha$ 的表达有上调趋势。此外, 研究表明, HMGB1可以剂量依赖的结合到LPS上, 从而诱导人单核细胞释放 $TNF-\alpha$ , 而当机体存在LBP时, LBP可以通过与HMGB1竞争, 显著抑制HMGB1结合到LPS上<sup>[22]</sup>。本实验中热灭活嗜水气单胞菌刺激后 $SpHMGB1$ 的表达量下调, 可能是因为LPS与LBP结合激活巨噬细胞, 而抑制 $SpHMGB1$ 的表达, 但是具体的机制还有待进一步研究。

本实验所得序列为 $SpHMGB1$ , 且 $SpHMGB1$ 氨基酸在进化上具有较高的保守性。 $SpHMGB1$ 能够参与嗜水气单胞菌感染齐口裂腹鱼和热灭活嗜水气单胞菌刺激头肾巨噬细胞后的响应。这些结果可为进一步研究 $SpHMGB1$ 在齐口裂腹鱼细菌性疾病中的免疫调节机制提供参考。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Wang H C, Bloom O, Zhang M H, *et al.* HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. *Science*, 1999, 285(5425): 248-251.
- [ 2 ] Dumitriu I E, Baruah P, Valentinis B, *et al.* Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 174(12): 7506-7515.
- [ 3 ] 张莹, 姚咏明, 董宁, 等. 高迁移率族蛋白B1对小鼠调节性T细胞抑制性相关分子表达的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(5): 616-618.  
Zhang Y, Yao Y M, Dong N, *et al.* Influence of high mobility group box-1 protein on immunosuppression molecules expression of splenic regulatory T cells in mice[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2007, 24(5): 616-618(in Chinese).
- [ 4 ] Zhao L, Hu Y H, Sun J S, *et al.* The high mobility group box 1 protein of *Sciaenops ocellatus* is a secreted cytokine that stimulates macrophage activation[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(10): 1052-1058.
- [ 5 ] Pang Y, Xiao R, Liu X, *et al.* Identification and characterization of the lamprey high-mobility group box 1 gene[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e35755.
- [ 6 ] Yang C R, Peng L M, Su J G. Two HMGB1 genes from grass carp *Ctenopharyngodon idella* mediate immune responses to viral/bacterial PAMPs and GCRV challenge[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 39(3): 133-146.
- [ 7 ] Cai J, Xia H L, Huang Y C, *et al.* Molecular cloning and characterization of high mobility group box1 (Ls-HMGB1) from humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(2): 539-544.
- [ 8 ] Fang P, Pan H C, Lin S L, *et al.* HMGB1 contributes to regeneration after spinal cord injury in adult zebrafish[J]. *Molecular Neurobiology*, 2014, 49(1): 472-483.
- [ 9 ] Xie J S, Hodgkinson J W, Li C, *et al.* Identification and functional characterization of the goldfish (*Carassius auratus* L.) high mobility group box 1 (HMGB1) chromatin-binding protein[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 44(1): 245-253.
- [10] Zhao X P, Hu Y H, Liu Y, *et al.* A high-mobility group box 1 that binds to DNA, enhances pro-inflammatory activity, and acts as an anti-infection molecule in black rockfish, *Sebastes schlegelii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 56: 402-409.
- [11] 杜宗君, 汪开毓, 李志琼, 等. 齐口裂腹鱼疾病防治初报[J]. *中国水产*, 2003(1): 82-83.  
Du Z J, Wang K Y, Li Z Q, *et al.* Preliminary report on disease control of *Schizothorax prenanti*[J]. *China Fisheries*, 2003(1): 82-83(in Chinese).
- [12] 耿毅, 汪开毓, 吴麟, 等. 齐口裂腹鱼败血症的病原分离与鉴定[J]. *水利渔业*, 2004, 24(4): 71-73.  
Geng Y, Wang K Y, Wu L, *et al.* Pathogen Separation and identification of the blood poisoning disease of *Schizothorax prenanti*[J]. *Reservoir Fisheries*, 2004, 24(4): 71-73(in Chinese).



- [13] 杜宗君, 黄小丽, 汪开毓, 等. 齐口裂腹鱼溃疡病病原的分离鉴定[J]. *四川农业大学学报*, 2011, 29(2): 274-279.  
Du Z J, Huang X L, Wang K Y, *et al.* Isolation and identification of etiology of skin ulcer in *Schizothorax prenanti*[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2011, 29(2): 274-279(in Chinese).
- [14] Jiang J, Zhao W Y, Xiong Q X, *et al.* Immune responses of channel catfish following the stimulation of three recombinant flagellins of *Yersinia ruckeri* *in vitro* and *in vivo*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 73: 61-71.
- [15] Zheng Q R, Wu Y L, Xu H L, *et al.* Immune responses to *Aeromonas hydrophila* infection in *Schizothorax prenanti* fed with oxidized konjac glucomannan and its acidolysis products[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 49: 260-267.
- [16] Du X G, Li Y K, Li D, *et al.* Transcriptome profiling of spleen provides insights into the antiviral mechanism in *Schizothorax prenanti* after poly (I: C) challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 62: 13-23.
- [17] Pu Y D, Zhu J Y, Wang H, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of *Hsp90* in *Schizothorax prenanti*[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2016, 21(6): 983-991.
- [18] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. *Genome Biology*, 2002, 3(7): research0034.1-research0034.11.
- [19] Gardella S, Andrei C, Ferrera D, *et al.* The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non - classical, vesicle - mediated secretory pathway[J]. *EMBO Reports*, 2002, 3(10): 995-1001.
- [20] 杨永波. 嗜水气单胞菌感染对团头鲂铁代谢影响的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.  
Yang Y B. Studies on iron metabolism of *Megalobrama amblycephala* challenged by *Aeromonas hydrophila* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [21] 杜雄伟, 于博, 李叶, 等. 剑尾鱼感染嗜水气单胞菌的动态病理变化观察[J]. *中国兽医科技*, 2004, 34(10): 22-25.  
Du X W, Yu B, Li Y, *et al.* Observation on dynamic pathological changes of *Xiphophorus helleri* infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2004, 34(10): 22-25(in Chinese).
- [22] Youn J H, Oh Y J, Kim E S, *et al.* High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF- $\alpha$  production in human monocytes[J]. *Journal of Immunology*, 2008, 180(7): 5067-5074.
- [23] 陈莉琴. LPS受体及作用机制研究进展[J]. *中国水电医学*, 2006(3): 186-190.  
Chen L Q. Progress of LPS receptors and action mechanism[J]. *China Hydropower Medicine*, 2006(3): 186-190(in Chinese).

## Cloning of *HMGB1* gene from *Schizothorax prenanti* and its response to *Aeromonas hydrophila* stress

WANG Hong<sup>1</sup>, PENG Shuang<sup>1</sup>, LIU Jiayi<sup>1</sup>, CHEN Defang<sup>1\*</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, GENG Yi<sup>2</sup>,  
WANG Kaiyu<sup>2</sup>, LI Zhiqiong<sup>1</sup>, HUANG Xiaoli<sup>1</sup>, OUYANG Ping<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Fish Disease Research Center, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** In order to understand the immune response of *Schizothorax prenanti* high mobility group box 1 (SpHMGB1) to *Aeromonas hydrophila* stress, primers were designed by the sequence obtained from the TSA database of spleen in *S. prenanti*, then the sequence characterization was analyzed. Finally the response situations were detected by qPCR after *A. hydrophila* infection *in vivo* and heat-killed *A. hydrophila* stimuli *in vitro*. Sequence analysis results showed that the open reading frame of SpHMGB1 was 615 bp which encoded a peptide of 204 amino acids with a predicted molecular mass of 23.5 Ku and a theoretical isoelectric point of 6.79. The peptide contained two basic HMG boxes: box A and box B, and an acidic tail. The secondary structure was mainly composed of 47.06% of  $\alpha$ -helices and 50% of random curls. Phylogenetic tree showed that SpHMGB1 and HMGB1 from *Danio rerio* and *Carassius auratus* were clustered together among fish HMGB1 with the high identities of 90.7% and 90.4%, respectively. After *A. hydrophila* infection, the relative expression of SpHMGB1 was significantly up-regulated at different time in tissues. The highest relative expression of SpHMGB1 appeared in kidney at 6 h, in blood at 72 h and in spleen at 120 h. After heat-killed *A. hydrophila* stimuli in macrophages, the relative expression of SpHMGB1 was down-regulated within 0.5–24 h with the lowest at 24 h. Meanwhile the relative expression of *IL-1 $\beta$*  and *TNF- $\alpha$*  showed the up-regulated tendency. qPCR results suggested that SpHMGB1 might be involved in the immune response after *A. hydrophila* infection in *S. prenanti*. This study provided a theoretical basis for further revealing the immune-modulatory mechanism of SpHMGB1 in bacterial disease of cold-water *S. prenanti*.

**Key words:** *Schizothorax prenanti*; *Aeromonas hydrophila*; high mobility group box 1; immune response

**Corresponding author:** CHEN Defang. E-mail: chendefang2011@qq.com

**Funding projects:** National Natural Science Fundation of China (31602148); Double Branch Plan of Sichuan Agricultural University