

研究报告

草鱼抗菌肽 Hecpidin 过表达对拟态弧菌生长和 NF- κ B 通路的影响

赵文平, 岳小真, 常娇娇, 李瑾年*

安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036

赵文平, 岳小真, 常娇娇, 李瑾年. 草鱼抗菌肽 Hecpidin 过表达对拟态弧菌生长和 NF- κ B 通路的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4786-4797

Zhao Wenping, Yue Xiaozhen, Chang Jiaojiao, Li Jinnian. Overexpression of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) antimicrobial peptide Hecpidin activates NF- κ B pathway and its effect on the growth *Vibrio mimicus*[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4786-4797

摘要:【背景】拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)是一种严重危害水产养殖业的病原菌,可引起鱼类弧菌病,目前使用抗生素防治该病存在较多弊端。【目的】在细胞水平探讨过表达草鱼抗菌肽 Hecpidin (CiHep)对拟态弧菌生长和 NF- κ B 通路的影响。【方法】构建重组真核表达质粒 pEGFP-N1-CiHep 和 pcDNA3.1(+)-CiHep。将 pEGFP-N1-CiHep 转染草鱼肾细胞系(*Ctenopharyngodon idella* kidney, CIK),通过免疫荧光法和 Western blotting 检测转染后不同时间融合蛋白 EGFP-CiHep 的表达情况。进一步检测转染 pcDNA3.1(+)-CiHep 后的 CIK 细胞培养上清液对拟态弧菌生长的影响,以及转染细胞内 NF- κ B 通路激活关键基因和下游免疫相关基因的转录水平。【结果】融合蛋白 EGFP-CiHep 在 CIK 细胞内能够良好表达,且以转染后 48 h 的表达量最高;转染后的细胞培养上清液能够显著抑制拟态弧菌生长;过表达 CiHep 可显著改变 NF- κ B 通路激活关键基因和下游免疫相关基因的转录水平。【结论】CiHep 具有抑制拟态弧菌生长和激活 NF- κ B 通路的作用。研究结果为鱼源 Hecpidin 的开发应用提供了理论依据,有望实现从激活 NF- κ B 通路正向调控抗菌肽表达的新角度防治鱼类拟态弧菌病。

关键词: 草鱼抗菌肽 Hecpidin; 拟态弧菌; 抗菌作用; NF- κ B 通路

基金项目: 国家自然科学基金(31672698)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31672698)

*Corresponding author: E-mail: lijinnian2000@163.com

Received: 2022-04-13; Accepted: 2022-07-04; Published online: 2022-08-12

Overexpression of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) antimicrobial peptide Hecpudin activates NF- κ B pathway and its effect on the growth *Vibrio mimicus*

ZHAO Wenping, YUE Xiaozhen, CHANG Jiaojiao, LI Jinnian*

College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

Abstract: [Background] *Vibrio mimicus* is a pathogenic bacterium that severely impacts aquaculture. The application of antibiotics to the control of vibriosis caused by this pathogen leads to drug resistance, environment pollution, and food safety problems. [Objective] To explore whether overexpression of the antimicrobial peptide Hecpudin (CiHep) from *Ctenopharyngodon idella* affects *V. mimicus* growth and NF- κ B pathway at the cellular level. [Methods] The recombinant plasmids pEGFP-N1-Cihep and pcDNA3.1(+)-Cihep were constructed for eukaryotic expression. The expression of the fusion protein EGFP-CiHep was detected by immunofluorescence assay and Western blotting at different time points post transfection of pEGFP-N1-Cihep in *C. idella* kidney (CIK) cells. Then, the effect of the supernatant of the cells transfected with pcDNA3.1(+)-Cihep on the growth of *V. mimicus* was examined. The transcription levels of the key genes for NF- κ B pathway activation and the downstream immunity-related genes in the transfected cells were measured. [Results] EGFP-CiHep was well expressed in the CIK cells and reached the highest expression level 48 h post transfection. The supernatant of the transfected cells significantly inhibited the growth of *V. mimicus*. CiHep overexpression significantly altered the transcription levels of key genes for NF- κ B pathway activation and downstream immunity-related genes. [Conclusion] CiHep can inhibit *V. mimicus* growth and activate NF- κ B pathway. Our results provide a theoretical basis for developing fish-derived Hecpudin and a new perspective on regulation of antimicrobial peptide expression by activating NF- κ B pathway for prevention and treatment of fish vibriosis.

Keywords: antimicrobial peptide Hecpudin of *Ctenopharyngodon idella*; *Vibrio mimicus*; antibacterial effect; NF- κ B pathway

拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)是一种常见且重要的鱼类致病菌^[1]。近年来, 由该菌引起的鱼类弧菌病频繁发生, 已成为制约鱼类养殖业健康发展的因素之一^[2-4]。由于目前尚无商业化拟态弧菌疫苗, 养殖生产中主要依赖抗生素药物防治该病。然而, 抗生素的长期大量使用及耐药菌株的大量繁殖导致疗效甚微, 而且造成水环境污染、药物残留及水产品安全等问题。因此, 亟须研发安全高效的抗生素替代品。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是生物体产生的具有广谱抗菌和免疫调节作用的一

类小分子活性肽^[5]。与传统抗生素相比, AMPs 因其抗菌作用机制独特且不易使细菌产生耐药性, 而被认为是最有潜力的抗生素替代品^[6]。鱼源抗菌肽 Hecpudin 由 Shike 等^[7]于 2002 年首次从杂交条纹鲈中分离获得。随后, 研究者们陆续从 30 多种鱼体内检测或克隆到 Hecpudin 基因, 发现该基因启动子序列中存在 NF- κ B 结合位点^[8], 而且几乎所有硬骨鱼类 Hecpudin 成熟肽 C 端都含有 8 个保守的半胱氨酸残基和 4 个与抗菌活性密切相关的链内二硫键^[9]。近年来, 诸多研究表明, 鱼源 Hecpudin 对嗜水气单胞菌、

副溶血弧菌、鲍曼不动杆菌和海豚链球菌等多种水产生物病原菌均具有抑菌活性^[10-11]。Pan等^[12]报道将罗非鱼 Hecpudin1-5 电转到斑马鱼体内可提高免疫相关基因(TLR、NF- κ B 和细胞因子)的转录水平和鱼体抗创伤弧菌和无乳链球菌感染能力。Liu 等^[11]研究发现,注射 Hecpudin 成熟肽至乌苏里白鲑体内也能促进 TLR3、NF- κ B 和 IL-10 因子的转录表达并提高鱼体抗嗜水气单胞菌感染的的能力。

我们前期研究结果显示,人工合成的草鱼 Hecpudin (CiHep)成熟肽对拟态弧菌有体外抑菌活性^[13]。在此基础上,本研究以 CIK 细胞为模型,进一步探讨过表达 CiHep 对拟态弧菌生长、NF- κ B 通路激活关键基因及通路下游免疫相关基因,尤其是其他抗菌肽基因转录的影响,以期探讨过表达 CiHep 的细胞上清液是否有抗拟态弧菌作用,以及 CiHep 通过激活 NF- κ B 通路可促进哪些抗菌肽表达,从而为鱼源抗菌肽 Hecpudin 的开发应用提供理论依据,也为防控鱼类拟态弧菌病提供新方法。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌株和质粒

草鱼肾细胞系(*Ctenopharyngodon idella* kidney, CIK)、拟态弧菌 04-14 菌株、真核表达载体 pEGFP-N1 和 pcDNA3.1(+)均由本实验室保存; *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞,北京天根生化科技有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司; 2 \times Taq PCR Master Mix、无内毒素质粒小提中量试剂盒、TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂、FastKing cDNA 第一链合成试剂盒,北京天根生化科技有限公司; 胎牛血清,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

MEM 细胞培养液和 Lipofectamie 3000 转染试剂, Sigma 公司; Western 及 IP 细胞裂解液、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和特超敏 ECL 化学发光试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司; EasySee[®] Western Marker (14-100 kDa),北京全式金生物技术有限公司; 鼠源 Anti-GFP 和鼠源 Anti-GAPDH 抗体,上海泊湾生物技术有限公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,博士德生物工程有限公司。

Thermal Cycler PCR 仪, Bio-Rad 公司; 全自动凝胶成像分析系统,上海培清科技有限公司; 生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司; 超低温保存箱,海尔特种电器有限公司; 细菌浊度计,上海昕瑞仪器仪表有限公司; 倒置荧光显微镜, Olympus 公司; 蛋白电泳转印系统,上海天能科技有限公司; 生物安全柜,艺思高科技有限公司; 台式高速冷冻离心机,贝克曼库尔特公司; 荧光定量 PCR 仪,应用生物系统公司。

1.3 CiHep 基因的真核表达质粒构建

根据 CiHep 基因成熟肽序列(GenBank 登录号 JQ246442.1)设计 2 对带有酶切位点的特异性引物(表 1),用于构建重组真核表达质粒 pEGFP-N1-Cihep 和 pcDNA3.1(+)-Cihep。以草鱼肝脏 cDNA 为模板,PCR 扩增 CiHep 基因。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。将纯化的 PCR 产物与空载体依次进行双酶切、酶连及转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。取转化液分别均匀涂布于 LB (含 100 μ g/mL Kana 和 100 μ g/mL Amp)固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h。随机挑取 3 个菌落进行扩大培养后抽提质粒进行 PCR、双酶切和测序鉴定。

表 1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Sequence (5'→3')	Application
pEGFP-N1-Cihep-F	CCG <u>CTCGAG</u> CTATGCAAAGCCATCTTCCCTGTG	Eukaryon expression
pEGFP-N1-Cihep-R	CGG <u>AATTCG</u> AAGATTTACAGCAATATCCACAG	Eukaryon expression
pcDNA3.1(+)-Cihep-F	CCG <u>GAAATTC</u> ATGCAAAGCCATCTTCCCTGTGCA	Eukaryon expression
pcDNA3.1(+)-Cihep-R	CCG <u>CTCGAG</u> TCAGAATTTACAGCAATATCCACAG	Eukaryon expression
β -actin-QF	TCTGCTATGTGGCTCTTG	RT-qPCR
β -actin-QR	ACCTGAACCTCTCATTGCTT	RT-qPCR
CiIKK β -QF	CGAACCCCTCACAACTCAACAA	RT-qPCR
CiIKK β -QR	ACGGCGTAATTCATCAAAGCAG	RT-qPCR
CiIkBa-QF	GGCAGATGTAACGCAAAG	RT-qPCR
CiIkBa-QR	GCCGAAGGTCAGGTGGT	RT-qPCR
Cip65-QF	AACCAAGAACCAGCCATACAAG	RT-qPCR
Cip65-QR	CGCTTCAGGAATATTAAAGGGG	RT-qPCR
CiNK-lysin-QF	AATCTCCAGAACAGCAACTCCG	RT-qPCR
CiNK-lysin-QR	ATGGTTCTTGCGTCATCAGTAG	RT-qPCR
Ci β -defensin1-QF	CCGGAATTCATGGCATCATTTCCCTGGACCT	RT-qPCR
Ci β -defensin1-QR	CCGCTCGAGTCAACCAAAATGTGATACACAG	RT-qPCR
Ci β -defensin2-QF	TCTGTTTGTACGTTGCTTGAC	RT-qPCR
Ci β -defensin2-QR	ACAGCATCTGTATTTGCGTGGA	RT-qPCR
CiTnf- α -QF	ACCAGGACCAGGCTTTCTCT	RT-qPCR
CiTnf- α -QR	GCATAACTGCGTGGCTCATA	RT-qPCR
CiIL-6-QF	AACCCTGGTCAACGACATCA	RT-qPCR
CiIL-6-QR	CCACCCTTCTCTTGCTCAT	RT-qPCR

注: 下划线部分是酶识别位点

Notes: The underlined parts are the sequence of enzyme digestion sites.

1.4 重组表达质粒 pEGFP-N1-Cihep 在细胞中的表达情况检测

1.4.1 细胞培养与转染

将密度为 5×10^5 个/mL 的 CIK 细胞接种至 24 孔细胞培养板(预置细胞爬片), 用 MEM 完全培养液于 28 °C、5% CO₂ 条件下培养。当细胞汇合度约为 80% 时弃去孔内培养液, 更换无血清、无双抗的 MEM 培养液, 采用脂质体转染法将 pEGFP-N1-Cihep、空载体 pEGFP-N1 分别转染细胞, 然后在上述条件下继续培养。转染体系为: 0.5 μ g 质粒、1.5 μ L Lipofectamine 3 000 和 50 μ L 不含血清与双抗的 MEM 培养液。

1.4.2 免疫荧光法检测融合蛋白 EGFP-CiHep 的表达

分别于上述转染后 36、48 和 72 h 弃去孔内培养液, 细胞依次做如下处理: 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 漂洗 3 次、4% 多聚甲醛室温固定 10 min、PBS 漂洗 3 次、5% 牛血清白蛋白 (albumin from bovine serum, BSA) 室温封闭 1 h 和 PBS 漂洗 3 次。然后, 每孔加入 200 μ L 1:1 000 稀释的鼠源 anti-GFP 抗体, 4 °C 避光孵育过夜后, 用 PBS 漂洗 3 次, 每孔加入 100 μ L 1:5 000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG, 室温避光孵育 1 h。最后, PBS 漂洗细胞 3 次, 每孔加入 150 μ L DAPI 室温避光染核 5 min, 滴加抗荧光淬灭剂并封片, 荧光

倒置显微镜下观察融合蛋白 EGFP-CiHep 在 CIK 细胞中的表达情况。

1.4.3 Western blotting 检测融合蛋白 EGFP-CiHep 的表达

CIK 细胞培养与转染同 1.4.1。6 孔细胞培养板中转染体系为：2.5 μg 质粒、7.5 μL Lipofectamine 3 000 和 250 μL 不含血清与双抗的 MEM 培养液。转染后 36、48 和 72 h 分别收集细胞培养上清液和细胞。用 200 μL 含 1% 苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 的细胞裂解液裂解细胞, 提取细胞内总蛋白, 并使用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒测定其浓度。取等量的各组蛋白样品进行 SDS-PAGE, 并转移到 PVDF 膜上, 分别用 1:1 000 稀释的鼠源 anti-GFP 抗体为一抗, 1:5 000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG 为二抗, 采用 Western blotting 检测融合蛋白 EGFP-CiHep 在 CIK 细胞中的表达情况, 实验中同时做内参蛋白 GAPDH 对照, 实验重复 3 次。

1.5 过表达 CiHep 的细胞培养上清液对拟态弧菌生长的影响

挑取拟态弧菌 04-14 菌株单菌落接种于 3 mL LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 24 h, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用生理盐水重悬菌体沉淀。使用细菌浊度计测定菌液浓度, 并将其浓度调整为 1×10^6 CFU/mL。分别设置 2 个实验大组 (直接加菌孵育组和吸出加菌孵育组), 每一大组中又分为 3 个小组 (重组质粒转染组、空质粒转染组和细胞对照组)。直接加菌孵育法是质粒转染后 48 h, 在细胞培养上清液中直接加入 100 μL 上述浓度的拟态弧菌悬液, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 4、8 和 12 h; 而吸出加菌孵育法是转染后 48 h 将细胞培养上清液吸出再加入上述浓度的拟态弧菌悬液, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 4、8 和 12 h。各组孵育后采用稀释平板涂布法测定孵育液中活菌浓度, 每一

稀释度做 3 个重复。

进一步采用 Western blotting 检测直接加菌孵育组细胞培养上清液中是否存在融合蛋白 EGFP-CiHep。主要步骤为: 按 1.4.1 方法将 pEGFP-N1-Cihep 转染 CIK 细胞。转染后 48 h, 加入 100 μL 浓度为 1×10^6 CFU/mL 的拟态弧菌悬液 (同时做 PBS 对照), 分别孵育 4、8 和 12 h, 吸取细胞培养上清液于 6 000 r/min 离心 10 min, 收集各上清液并使用 BCA 试剂盒测定其浓度。取等量的各组蛋白样品进行 SDS-PAGE, 并转移到 PVDF 膜上, 其余步骤同 1.4.3。

1.6 过表达 CiHep 后细胞内 NF- κ B 通路相关基因转录水平的检测

根据 GenBank 中收录的草鱼 NF- κ B 通路激活关键基因序列 (*ikBa*/No. KF581195.1、*ikk β* /No. KT282114.1 和 *p65*/No. KT861470.1), 通路下游抗菌肽基因序列 (*nkl*/No. KT877168.1、*defb1*/No. KX906958.1 和 *defb2*/No. KX906959.1) 及细胞因子基因序列 (*tnf- α* /No. JQ670915.1 和 *il-6*/No. KC535507.1), 设计 8 对特异性引物, 并选择 *β -actin* 为内参基因 (详细信息见表 1)。CIK 细胞培养与 pcDNA3.1(+)-Cihep 转染同 1.5, 同时做转染空质粒 pcDNA3.1(+) 对照组。转染后 36 h 收集细胞样品, TRNzol 试剂提取细胞总 RNA, 反转录为 cDNA, 并以此为模板采用 RT-qPCR 检测上述基因的转录水平。RT-qPCR 反应体系: 2 \times SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 10 μL , 50 \times ROX Reference Dye 2 μL , cDNA 模板 1 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , RNase free ddH₂O 补足 20 μL 。RT-qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环, 每个样品做 3 个生物学重复。反应结束后使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析各检测基因的相对转录水平。

1.7 数据处理

利用 SPSS 软件对各组细胞裂解液中蛋白

表达量、细胞上清液中活菌浓度及免疫相关基因转录水平进行单因素方差分析。利用 ImageJ V1.6.0 软件分析蛋白条带灰度值, 使用 GraphPad Prism V8.0 处理图片。

2 结果与分析

2.1 重组真核表达质粒的鉴定

采用分子克隆的方法构建 2 种重组真核表达质粒 pEGFP-N1-Cihep 和 pcDNA3.1(+)-Cihep 并进行鉴定。结果显示, 以重组质粒为模板扩增到 Cihep 目的基因(图 1A 泳道 2、3); 双酶切反应后可获得两条 DNA 条带, 大小分别与空载体(pEGFP-N1/4 715 bp, 图 1B 泳道 1; pcDNA3.1(+)/5 428 bp, 图 1B 泳道 3)和目的基因(99 bp)大小一致; 测序结果显示目的基因序列未发生突变。结果表明上述两种重组真核表

达质粒构建成功。

2.2 融合蛋白 EGFP-CiHep 的表达情况

重组真核表达质粒 pEGFP-N1-Cihep 转染 CIK 细胞。转染后 36、48 和 72 h, 采用免疫荧光法检测到 CIK 细胞的胞质和胞核中均有绿色荧光, 而且以转染后 48 h 的荧光最强(图 2)。同时, 采用 Western blotting 检测融合蛋白表达情况。结果如图 3A-3D 所示, 转染后 36、48 和 72 h 的细胞裂解液中均显示出一条大小约为 30.5 kDa 的免疫反应条带, 并且以 48 h 的免疫反应条带最粗, 而各检测时间点的内参蛋白表达量基本一致, 细胞培养上清液中未出现任何反应条带。方差分析结果显示转染后 48 h 的免疫反应条带的灰度值均极显著高于 36 h 和 72 h 对应的条带灰度值($P < 0.01$)。结果表明, 融合蛋白 EGFP-CiHep 在 CIK 细胞内能够良好表达, 且以转染后 48 h 的表达量最高。

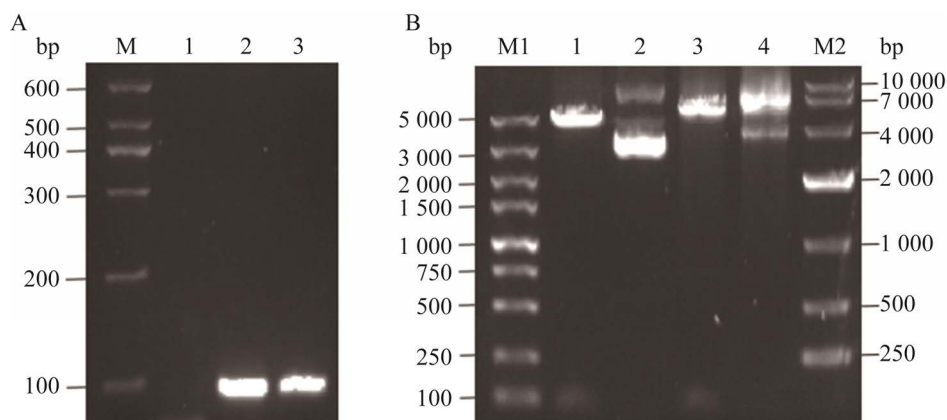


图 1 两种重组真核表达质粒的 PCR (A)与双酶切鉴定(B) A: M: DL600 DNA Marker; 1: 去离子水阴性对照; 2: pEGFP-N1-Cihep; 3: pcDNA3.1(+)-Cihep 的 PCR 产物。B: M1: DL5000 DNA Marker; 1, 3: pEGFP-N1-Cihep 或 pcDNA3.1(+)-Cihep 的双酶切产物; 2, 4: pEGFP-N1-Cihep 或 pcDNA3.1(+)-Cihep 质粒; M2: DL10000 DNA Marker

Figure 1 Identification of two recombinant eukaryotic expression plasmids by PCR and double enzyme digestion. A: M: DL600 DNA Marker; 1: Negative control of deionized water; 2: PCR products of pEGFP-N1-Cihep; 3: pcDNA3.1(+)-Cihep. B: M1: DL5000 DNA Marker; 1, 3: Double enzyme digestion products of pEGFP-N1-Cihep or pcDNA3.1(+)-Cihep; 2, 4: pEGFP-N1-Cihep or pcDNA3.1(+)-Cihep plasmid; M2: DL10000 DNA Marker.

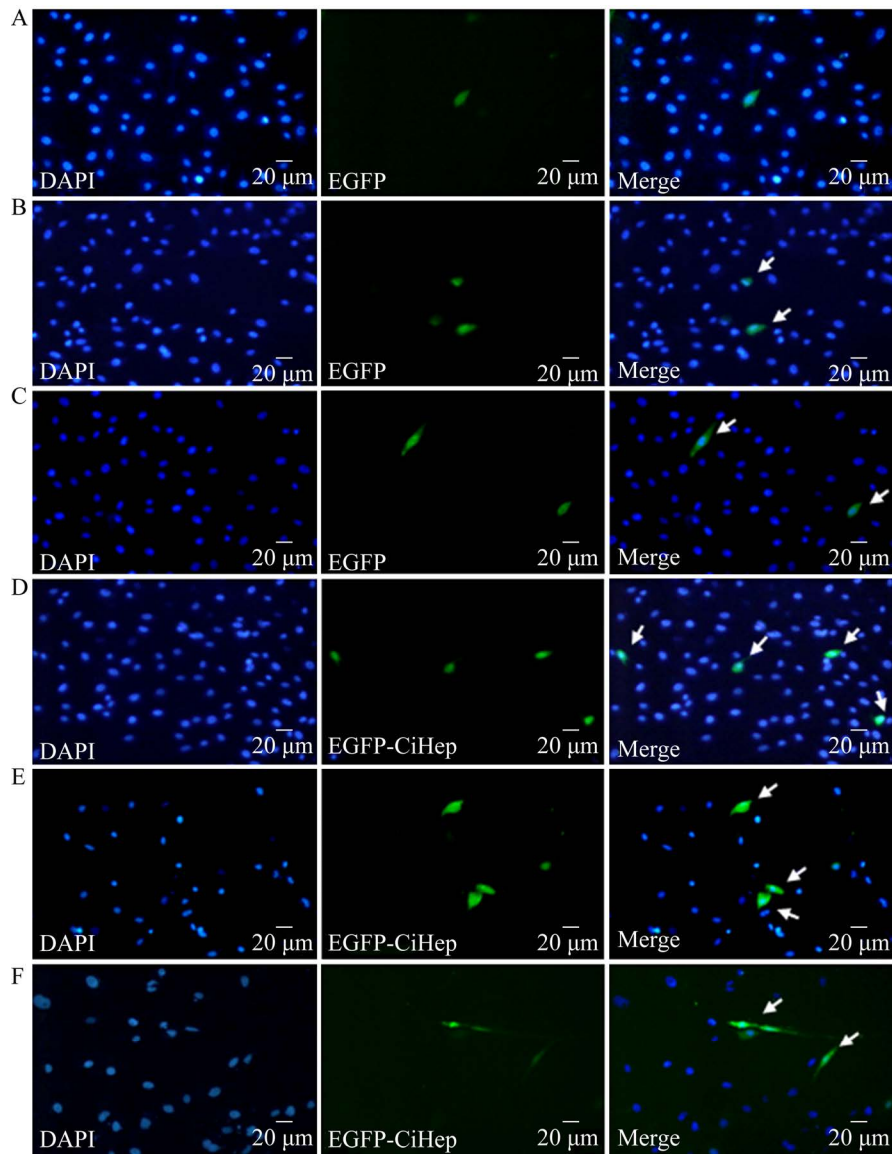


图 2 免疫荧光法检测转染后融合蛋白 EGFP-CiHep 在 CIK 细胞中的表达 A-C: 转染后 36、48 和 72 h 的 EGFP 表达; D-F: 转染后 36、48 和 72 h 的 EGFP-CiHep 表达

Figure 2 Expression of fusion protein EGFP-CiHep in the CIK cells post transfection detected by immunofluorescence assay. A-C: Expression of EGFP at 36, 48 and 72 h after transfection; D-F: Expression of EGFP-CiHep at 36, 48 and 72 h after transfection.

2.3 过表达 CiHep 的细胞培养上清液对拟态弧菌生长的抑制作用

重组真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-*Cihep* 转染 CIK 细胞 48 h 后, 分别采用直接加菌孵育法和吸出加菌孵育法检测细胞培养上清液对拟态

弧菌生长是否有抑制作用。各组孵育液中活菌浓度的检测结果见表 2。组内(同种加菌孵育法同一孵育时间点的重组质粒转染组、空质粒转染组及细胞对照组)单因素方差分析结果显示, 直接加菌孵育法中, pcDNA3.1(+)-*Cihep* 转染组

的活菌浓度在各孵育时间点均极显著低于细胞对照组($P<0.01$), 显著(4 h 与 8 h, $P<0.05$)或极显著(12 h, $P<0.01$)低于空载体转染组, 而空载体转染组与细胞对照组的活菌浓度无显著差异($P>0.05$)。吸出加菌孵育法中, pcDNA3.1(+)-*Cihep* 转染组的活菌浓度在各孵育时间点均极显著低于细胞对照组($P<0.01$), 显著(4 h, $P<0.05$)或极显著(8 h 和 12 h, $P<0.01$)低于空载体转染组, 同样空载体转染组与细胞对照组的活菌浓度也无显著差异($P>0.05$)。组间单因素方差分析结果显示, 虽然吸出加菌孵育法中转染组的活菌浓度略高于直接加菌孵育法中同一孵育时间点相应转染组的活菌浓度, 但无显著差异($P>0.05$)。

为了进一步分析直接加菌孵育法中拟态弧

菌是否可能造成 CIK 细胞膜损伤而促使抗菌肽释放至细胞培养上清液中, 使用标签蛋白 GFP 抗体为一抗, Western blotting 检测融合蛋白 EGFP-CiHep。结果如图 4 所示, 重组质粒 pEGFP-N1-*Cihep* 转染细胞 48 h, 直接加菌再孵育 8 h 和 12 h 后上清液中均检测到一条大小约为 30.5 kDa 的免疫反应条带, 与融合蛋白 EGFP-CiHep 的分子大小一致, 而孵育 4 h 后上清液中未检测到相应的免疫反应条带。同时, 用无菌 PBS 代替细菌与细胞孵育后各检测时间点均无免疫反应条带。结果表明, 拟态弧菌与重组质粒转染的细胞经过 8 h 和 12 h 孵育可造成细胞损伤, 使得抗菌肽释放出来。以上两个实验结果证明过表达 CiHep 的 CIK 细胞培养上清液对拟态弧菌生长有抑制作用。

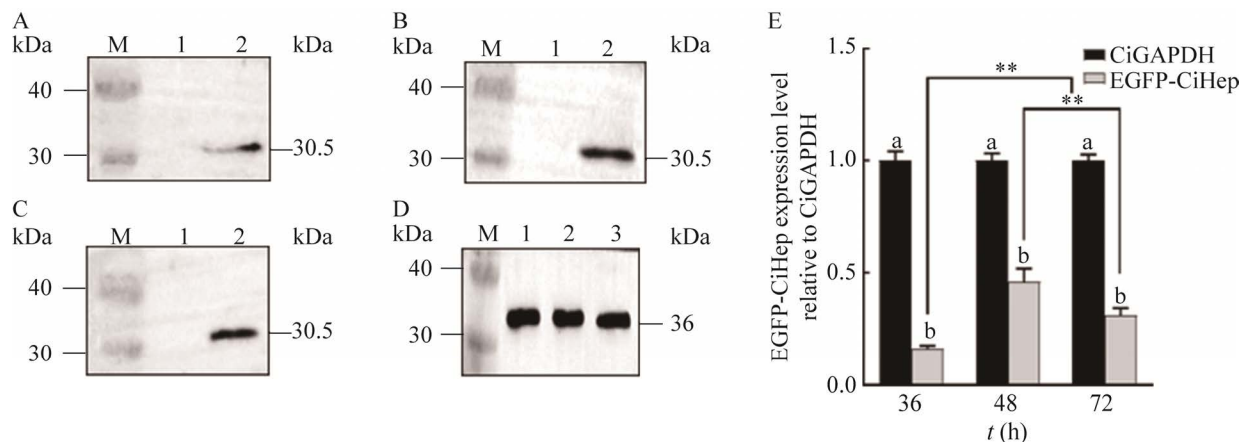


图 3 Western blotting 检测转染后融合蛋白 EGFP-CiHep 在 CIK 细胞中的表达 A-C: 转染后 36、48 和 72 h 融合蛋白的表达, M: 预染蛋白 Marker; 1: 转染后的细胞培养上清液; 2: 细胞裂解液。D: 转染后内参蛋白的表达, 1-3: 转染后 36、48 和 72 h 的细胞裂解液。E: 融合蛋白 EGFP-CiHep 的相对表达量, 不同小写字母表示同一时间点不同组间的显著差异。**: $P<0.01$

Figure 3 Expression of fusion protein EGFP-CiHep in the CIK cells post transfection detected by Western blotting. A-C: Expression of fusion protein at 36, 48 and 72 h after transfection, M: Blue Plus Protein Marker; 1: Cell culture supernatant; 2: Cell lysate. D: Expression of internal reference protein after transfection, 1-3: Cell lysate at 36, 48 and 72 h after transfection. E: Relative expression of EGFP-CiHep to GAPDH. Different lowercase letters indicate significant differences among different groups at the same time point. **: $P<0.01$.

表 2 不同孵育液中拟态弧菌的活菌浓度

Table 2 Viable concentration of *V. mimicus* in different incubation solutions

孵育时间 Incubation time (h)	直接加菌孵育法 Method of direct incubation with bacteria			吸出加菌孵育法 Method of adding bacteria for incubation post aspiration		
	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C
	4	$(4.35 \pm 0.12) \times 10^7$ a	$(3.86 \pm 0.13) \times 10^7$ a	$(2.84 \pm 0.12) \times 10^7$ b	$(4.56 \pm 0.20) \times 10^7$ a	$(4.06 \pm 0.08) \times 10^7$ a
8	$(3.38 \pm 0.22) \times 10^9$ a	$(2.75 \pm 0.16) \times 10^9$ a	$(1.44 \pm 0.12) \times 10^9$ b	$(3.55 \pm 0.06) \times 10^9$ a	$(3.12 \pm 0.19) \times 10^9$ a	$(1.56 \pm 0.11) \times 10^9$ b
12	$(5.29 \pm 0.21) \times 10^{10}$ a	$(4.90 \pm 0.12) \times 10^{10}$ a	$(2.71 \pm 0.06) \times 10^{10}$ b	$(5.75 \pm 0.11) \times 10^{10}$ a	$(5.28 \pm 0.14) \times 10^{10}$ a	$(2.91 \pm 0.07) \times 10^{10}$ b

注: A 组: 细胞对照组; B 组: 空质粒转染组; C 组: 重组质粒转染组。括号内不同小写字母表示同一孵育时间点组内的显著差异($P < 0.05$)或极显著差异($P < 0.01$)

Note: Group A: Cell control group; Group B: Transfection group of empty plasmid; Group C: Transfection group of recombinant plasmid group. Different lowercase letters in brackets indicate significant differences ($P < 0.05$) or extremely significant differences ($P < 0.01$) within each group at the same incubation time point.

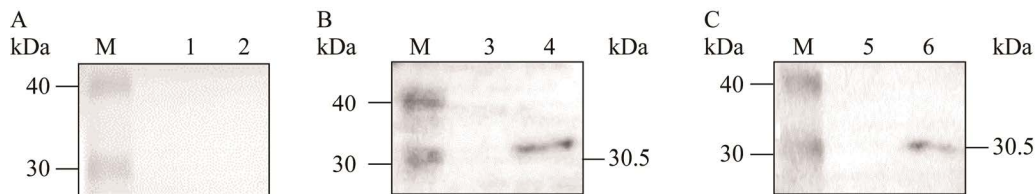


图 4 直接加菌孵育后细胞培养上清液中的融合蛋白 EGFP-CiHep 的 Western blotting 检测 A-C: 直接加菌孵育 4、8 和 12 h 后细胞培养上清液的 Western blotting 检测结果; M: 预染蛋白 Marker; 1、3、5: PBS 与细胞孵育 4、8 和 12 h 后的上清液; 2、4、6: 拟态弧菌与细胞孵育 4、8 和 12 h 后的上清液

Figure 4 Fusion protein EGFP-CiHep in the supernatant of cell culture after direct incubation with bacteria detected by Western blotting. A-C: The Western blotting results of cell culture supernatant after direct incubation with bacteria for 4, 8 and 12 h; M: Blue Plus Protein Marker; 1, 3, 5: Supernatant of PBS incubated with cells for 4, 8 and 12 h, respectively; 2, 4, 6: Supernatant of *V. mimicus* incubated with cells for 4, 8 and 12 h, respectively.

2.4 过表达 CiHep 调控 NF- κ B 通路相关基因的转录

pcDNA3.1(+)-*Cihep* 与 pcDNA3.1(+)-空载体分别转染 CIK 细胞, 转染 36 h 后 RT-qPCR 检测 NF- κ B 通路激活关键基因和下游免疫相关基因(抗菌肽、细胞因子)的转录水平。结果如图 5 所示, 与空载体对照组相比, pcDNA3.1(+)-*Cihep* 转染组 NF- κ B 通路激活关键基因 *ikkb* 和 *p65* 的转录水平分别显

著上调 1.941 倍和 1.846 倍($P < 0.01$), *ikb α* 显著下调 0.775 倍($P < 0.05$), 抗菌肽基因 *nkl* 与 *defb1* 的转录水平分别显著上调 2.094 倍和 2.140 倍($P < 0.01$), *defb2* 显著下调 0.628 倍($P < 0.05$)。细胞因子基因 *tnf- α* 与 *il-6* 的转录水平分别显著上调 1.255 倍($P < 0.05$)和 2.751 倍($P < 0.01$)。结果表明, 过表达 CiHep 基因能够激活 NF- κ B 通路, 进而调控通路下游其他抗菌肽基因和细胞因子基因的转录。

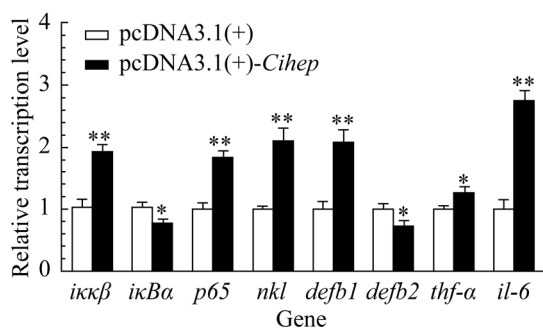


图5 过表达 CiHep 基因对 NF- κ B 通路激活关键基因及下游免疫相关基因转录的影响

Figure 5 Effects of overexpressing CiHep gene on the transcription of key genes for NF- κ B pathway activation and downstream immune-related genes. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论与结论

草鱼 Hecpudin (CiHep)是一种富含半胱氨酸的阳离子抗菌肽,成熟肽中的链内二硫键与其生物学活性存在相关性^[9]。考虑到原核表达系统不能对表达的外源蛋白进行翻译后修饰(如二硫键形成、蛋白质折叠等),导致表达产物活性降低甚至无活性^[14]。同时,由于抗菌肽本身具有抗菌作用,表达产物常常对原核表达宿主菌产生反馈抑制作用,影响其进一步表达^[15]。因此,本研究选择将真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-Cihep 转染 CIK 细胞 48 h 后,分别采用直接加菌孵育法和吸出加菌孵育法检测细胞上清液对胞外拟态弧菌生长的影响。结果显示,直接加菌孵育后的活菌浓度与吸出加菌孵育后的活菌浓度无明显差异,但均显著低于细胞对照组与空载体转染组,并且发现直接加菌孵育法中拟态弧菌与细胞孵育 8 h 和 12 h 可造成细胞损伤,致使抗菌肽释放至培养物上清液中,从而证明过表达 CiHep 后的细胞培养上清液对拟态弧菌生长具有显著抑制作用。Li 等^[16]在 HEK293T 细胞中瞬时过表达融合碳水化合物结合结构域的人类 β -defensin3 后,该体系对

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生长具有抑杀作用;Wen 等^[17]研究发现在巨噬细胞中过表达抗菌肽 PR-39 能有效抑制巨噬细胞内鼠伤寒沙门菌的生长;陈贝^[18]报道拟穴青蟹抗菌肽 Scyl1 在 EPC 细胞中过表达对藤黄微球菌、荧光假单胞菌和嗜水气单胞菌的生长具有抑制作用。这些研究结果表明可以采用细胞过表达方法研究抗菌肽对胞内菌与胞外菌生长的影响,以明确特定抗菌肽对特定细菌是否具有抗菌活性。

抗菌肽除了具有体外直接杀菌作用外,还可通过激活天然免疫信号通路诱导下游免疫效应因子表达,进而以促进或抑制炎症反应、趋化与激活免疫细胞等方式调节机体免疫功能来发挥体内抗菌效应^[19]。目前,关于抗菌肽用于鱼类弧菌病防治的研究已有报道,如 Pan^[20]等将重组融合蛋白 epinecidin-1/DsRed 与基础饲料混合饲喂斜带石斑鱼和斑马鱼,可保护鱼免受创伤弧菌感染;Jheng 等^[21]将 epinecidin-1 转基因卤虫与饲料混合饲喂斑马鱼,用于防治创伤弧菌感染。我们下一步将利用酵母表达系统制备 rCiHep 蛋白,检测其体内抗拟态弧菌效应,评价抗菌肽 Hecpudin 在防治鱼类拟态弧菌病中的作用。

NF- κ B 通路是最重要的天然免疫信号通路之一,细胞在静息状态下,核转录因子 NF- κ B 与其抑制蛋白 I κ Bs 以非活性的 p65/p50/I κ B α 三聚体复合物形式存于胞质中。当细胞受到外源信号刺激后,通过系列级联反应使通路中关键基因 *Ikkβ* 激活,进而触发 I κ B α 降解、NF- κ B 解离和 NF- κ B p65 易位入核,最终 NF- κ B 得到活化^[22]。为了探讨过表达 CiHep 是否能够激活 NF- κ B 通路,研究中以 pcDNA3.1(+)-Cihep 转染 CIK 细胞,检测 NF- κ B 通路激活关键基因的转录水平,结果显示, *ikkβ* 和 *p65* 显著上调、而抑制蛋白编码基因 *ikBα* 显著下调,表明过表

达 CiHep 能够激活 NF- κ B 通路。激活后的 NF- κ B 识别并结合通路下游免疫相关基因启动子区域中 NF- κ B 结合位点, 调控免疫相关基因的转录与表达, 从而发挥抗菌免疫作用。我们的研究结果符合上述理论, 过表达 CiHep 后, 通路下游细胞因子基因 *tnf- α* 与 *il-6* 及抗菌肽基因 *nkl* 与 *defb1* 的转录水平均显著上调, 但抗菌肽 *defb2* 的转录水平是显著下调的。已有文献报道, 草鱼 *defb2* 启动子序列上不存在 NF- κ B 结合位点, 激活的 NF- κ B 对其无调控作用^[23], 而 Liu 等^[24]研究发现激活的 p38 MAPK 通路对家禽 *defb2* 具有正向调控作用。由此推测, 草鱼 *defb2* 转录水平显著下调的可能原因是 CiHep 过表达负反馈调节 p38 MAPK 通路或其他信号通路, 进而抑制了 *defb2* 转录, 但其确切机制仍需进一步深入研究。

综上所述, 本研究探明 CiHep 能够抑制拟态弧菌生长, 而且可通过激活 NF- κ B 通路促进草鱼其他两种抗菌肽基因转录。此研究结果为鱼源 Hecpudin 的开发应用提供了理论依据, 有望实现从激活 NF- κ B 通路正向调控抗菌肽表达的新角度防治鱼类拟态弧菌病。

REFERENCES

- [1] Austin B. Vibrios as causal agents of zoonoses[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(3/4): 310-317
- [2] Zhang X, Li YW, Mo ZQ, Luo XC, Sun HY, Liu P, Li AX, Zhou SM, Dan XM. Outbreak of a novel disease associated with *Vibrio mimicus* infection in fresh water cultured yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 119-124
- [3] Geng Y, Liu D, Han S, Zhou Y, Wang KY, Huang XL, Chen DF, Peng X, Lai WM. Outbreaks of vibriosis associated with *Vibrio mimicus* in freshwater catfish in China[J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 82-84
- [4] 蔺凌云, 冯东岳, 潘晓艺, 姚嘉赞, 尹文林, 曹铮, 刘忆瀚, 夏焱春, 沈锦玉. 黄颡鱼拟态弧菌的鉴定、毒力相关因子及药敏特性[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(4): 799-810
- [5] Lin LY, Feng DY, Pan XY, Yao JY, Yin WL, Cao Z, Liu YH, Xia YC, Shen JY. Identification, virulence-related factors, and antimicrobial susceptibility of *Vibrio mimicus* from yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(4): 799-810 (in Chinese)
- [6] Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, Davidson DJ. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020, 19(5): 311-332
- [7] Wang JJ, Dou XJ, Song J, Lyu YF, Zhu X, Xu L, Li WZ, Shan AS. Antimicrobial peptides: promising alternatives in the post feeding antibiotic era[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2019, 39(3): 831-859
- [8] Shike H, Lauth X, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC, Shimizu C, Bulet P, Burns JC. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(8): 2232-2237
- [9] 杨冰贞, 张民, 王克坚. NF- κ B 信号通路在鱼类先天性免疫中的作用[J]. *生物技术通报*, 2014(1): 46-52
- [10] Yang BZ, Zhang M, Wang KJ. Role of NF- κ B signal pathway in the innate immune system of fish[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(1): 46-52 (in Chinese)
- [11] 何建瑜, 刘慧慧, 薛超波. 鱼类铁调素(Hepcidin)的研究进展[J]. *水产养殖*, 2011, 32(7): 50-53
- [12] He JY, Liu HH, Xue CB. Development of hepcidin in fish[J]. *Journal of Aquaculture*, 2011, 32(7): 50-53 (in Chinese)
- [13] Shirdel I, Kalbassi MR, Hosseinkhani S, Paknejad H, Wink M. Cloning, characterization and tissue-specific expression of the antimicrobial peptide hepcidin from caspian trout (*Salmo caspius*) and the antibacterial activity of the synthetic peptide[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 288-296
- [14] Liu EH, Huang TQ, Gu W, Wang GC, Dong FL, Ma HB, Zhang LL, He XC, Yao ZC, Jiao WL, et al. Molecular characterization and antibacterial immunity functional analysis of the antimicrobial peptide hepcidin from *Coregonus ussuriensis* berg[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 122: 78-86
- [15] Pan CY, Peng KC, Lin CH, Chen JY. Transgenic expression of tilapia hepcidin 1-5 and shrimp chelonianin in zebrafish and their resistance to bacterial pathogens[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(2): 275-285
- [16] Guo JJ, Wang H, Liu JC, Chang XY, Li JN, Liu XL. Interleukin-1 β enhances the expression of two antimicrobial peptides in grass carp (*Ctenopharyngodon*

- idella*) against *Vibrio mimicus* via activating NF- κ B pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 122: 334-344
- [14] Kaur J, Kumar A, Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 803-822
- [15] 张旭冉. LfcinB 等抗菌肽原核和真核表达体系构建的初步研究[D]. 合肥: 安徽大学硕士学位论文, 2020
Zhang XR. Construction of prokaryotic and eukaryotic expression system for LfcinB and other antimicrobial peptides[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui University, 2020 (in Chinese)
- [16] Li QT, Huang JW, Guo HX, Guo XK, Zhu YZ, Dong K. Bactericidal activity against meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* of a novel eukaryotic therapeutic recombinant antimicrobial peptide[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012, 39(6): 496-499
- [17] Wen YG, Yu XL, Xia QF, Cen D, Liu JB, Tu ZG. Macrophage-specific overexpression of antimicrobial peptide PR-39 inhibits intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in macrophage cells[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, 34(4): 315-321
- [18] 陈贝. 携带黑鲷 AS-prohepc2 及拟穴青蟹 Scy1 抗菌肽基因的减毒活菌载体系统作为口服免疫途径的研究[D]. 厦门: 厦门大学博士学位论文, 2015
Chen B. Study on live attenuated bacteria vector system carrying black porgy AS-prohepc2 and Scy1 antibacterial peptide gene of *Scylla paramamosain* as oral immunization route[D]. Xiamen: Doctoral Dissertation of Xiamen University, 2015 (in Chinese)
- [19] Ma JY, Shao S, Wang G. Antimicrobial peptides: bridging innate and adaptive immunity in the pathogenesis of psoriasis[J]. *Chinese Medical Journal*, 2020, 133(24): 2966-2975
- [20] Pan CY, Huang TC, Wang YD, Yeh YC, Hui CF, Chen JY. Oral administration of recombinant epinecidin-1 protected grouper (*Epinephelus coioides*) and zebrafish (*Danio rerio*) from *Vibrio vulnificus* infection and enhanced immune-related gene expressions[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(6): 947-957
- [21] Jheng YH, Lee LH, Ting CH, Pan CY, Hui CF, Chen JY. Zebrafish fed on recombinant *Artemia* expressing epinecidin-1 exhibit increased survival and altered expression of immunomodulatory genes upon *Vibrio vulnificus* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(1): 1-15
- [22] Gilmore TD, Siggers TW, Gerondakis S. NF-kappaB and the immune system[A]//Encyclopedia of Cell Biology[M]. Amsterdam: Elsevier, 2016: 580-587
- [23] 许群. 草鱼 β -防御素克隆表达及转录调控的研究[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2018
Xu Q. Cloning, expression and transcriptional regulation of β -defensin in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2018 (in Chinese)
- [24] Liu CG, Jiang L, Liu LL, Sun L, Zhao WJ, Chen YQ, Qi TM, Han ZX, Shao YH, Liu SW, et al. Induction of avian β -defensin 2 is possibly mediated by the p38 MAPK signal pathway in chicken embryo fibroblasts after Newcastle disease virus infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 751