

文章编号: 1000-0615(2016)03-0396-08

DOI: 10.11964/jfc.20150910074

抗嗜水气单胞菌NJ-1感染的乳酸菌筛选及其免疫调节作用

王彦波¹, 任真真¹, 张岩², 傅玲琳^{1*}

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品微生物技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310018;

2. 河北省食品检验研究院, 河北 石家庄 050091)

摘要: 为了筛选能提高水产动物对嗜水气单胞菌抗病性的益生菌, 并研究其免疫调节的作用机制。将5种乳酸菌与斑马鱼ZF-4细胞共培养后通过荧光定量PCR方法检测细胞因子 $NF\kappa B$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $IL-10$ 的表达量, 并用流式细胞仪检测被嗜水气单胞菌NJ-1攻毒后的细胞凋亡率来筛选对ZF-4细胞保护性最显著的乳酸菌, 将其添加至模式生物斑马鱼饲料中饲喂28 d后, 用嗜水气单胞菌NJ-1攻毒并检测斑马鱼肠道中促炎性细胞因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和抗炎性细胞因子 $IL-10$ 的表达情况, 并计算斑马鱼被攻毒后的累积死亡率。结果显示, 5种乳酸菌分别与细胞共培养后, 芽孢乳酸菌09.712能明显提高ZF-4细胞 $NF\kappa B$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $IL-10$ 的表达量, 攻毒后细胞凋亡率降低至23.36%, 与其他组相比存在显著性差异, 所以选取芽孢乳酸菌09.712用于下一步实验。体内实验显示, 攻毒后第1天, 与对照组相比, 芽孢乳酸菌09.712能显著促进斑马鱼肠道内 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $IL-10$ 的表达量, 且随时间变化表达量减少; 其中攻毒后第3天, 菌饲喂组 $IL-1\beta$ 表达量比对照组低, 而 $IL-10$ 表达量明显比对照组高。此外, 芽孢乳酸菌09.712的饲喂显著降低斑马鱼攻毒后的死亡率。研究表明, 芽孢乳酸菌09.712在体外能显著提高对细胞的保护性, 在体内能诱导斑马鱼产生先天免疫应答, 提高斑马鱼的免疫力, 可作为预防水产动物疾病的理想选择, 也为阐明乳酸菌先天性免疫调节作用提供理论基础。

关键词: 嗜水气单胞菌; 乳酸菌; ZF-4细胞系; 斑马鱼; 免疫调节; 细胞因子

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

在水产养殖中, 疾病的频繁暴发严重影响并制约其产量和经济的发展^[1]。长期以来, 传统的消毒剂和抗菌药物等在预防和治疗水生生物疾病等方面的作用有限, 因为对抗生素产生耐药性的细菌种类不断增加, 而且抗生素的使用也涉及到食品安全等问题^[2]。益生菌可以抑制病原菌的生长和对肠黏膜的侵袭^[3-4], 而且具有无毒、无残留、无抗药性、不污染环境、成本低廉等优势, 是抗生素的理想替代品。因此, 筛选出能明显提高水产品先天或获得性免疫系统能力的益生菌显得尤为重要。实践证明, 乳酸

菌能显著提高水产动物的免疫力^[5]及其对病原菌的抗感染能力^[6]。但是, 乳酸菌在体内与体外对机体免疫调节作用的一致性还有待进一步的研究。斑马鱼(*Danio rerio*)由于其体积小, 繁殖力强, 生长速度快, 在生理、基因结构功能等方面与高等动物具有高度相似性等优点^[7], 被广泛用于免疫学的研究^[8-10]。本实验以斑马鱼为模型, 采用体外细胞实验, 从5种乳酸菌中筛选出对斑马鱼胚胎上皮细胞(ZF-4)有明显免疫保护作用的种类。

收稿日期: 2015-09-11 修回日期: 2015-12-24

资助项目: 国家自然科学基金(31571770, 31571913); 浙江省自然科学基金(LY14C200001, LZ15C200001)

通信作者: 傅玲琳, Email: fulinglin@mail.zjgsu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 细菌菌株与细胞的来源

芽孢乳酸菌09.712(*Bacillus coagulans* 09.712)分离于豆豉(*Merrill*),植物乳杆菌08.923(*Lactobacillus plantarum* 08.923)分离于发酵乳(fermented milk),由浙江省重点实验室分离保存;鼠李糖乳杆菌CGMCC 1.372(*L. rhamnosus* CGMCC 1.3724)、嗜热链球菌CGMCC 1.2471(*Streptococcus thermophilus* CGMCC 1.2471)、长双歧杆菌婴儿亚种CGMCC 1.2202(*Bifidobacterium infantis* CGMCC 1.2202)均购于中国普通微生物菌种保藏管理中心;嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)NJ-1由上海海洋大学馈赠;斑马鱼ZF-4细胞系购于国家斑马鱼资源中心。

1.2 细菌培养

将分离保存的芽孢乳酸菌09.712接种于营养肉汤(nutrient broth, NB)培养基,其余4种乳酸菌接种于MRS(de Man, Rogosa, Sharpe)肉汤培养基,37℃厌氧培养48 h。嗜水气单胞菌NJ-1作为斑马鱼的攻毒菌株,用LB(Luria-Bertani)培养基培养,37℃摇床培养12 h,300 r/min。将菌液离心(3500 r/min, 10 min, 4℃),弃上清液。用无菌PBS缓冲液漂洗3次后加入适量的PBS重悬,参照嗜水气单胞菌的标准曲线计算悬浊液中嗜水气单胞菌的浓度^[11]。

1.3 细胞培养

斑马鱼ZF-4细胞系在细胞培养基DMEM/F-12(1:1)中进行培养(10%灭活胎牛血清,1%双抗),培养温度为28℃,培养中CO₂浓度为5%。

1.4 乳酸菌与细胞共培养

用胰酶将ZF-4细胞消化,吸取1 mL ZF-4细胞消化液(1×10⁶个/mL),接种至6孔板中,在二氧化碳培养箱中进行培养,直至细胞长满整个细胞培养板;再向各孔中分别接种5种乳酸菌1 mL悬浮液[1×10⁸ CFU/mL,溶解在无双抗的DMEM/F-12(1:1)培养基],并单独用DMEM/F-12(1:1)细胞培养基代替乳酸菌作为对照。在28℃、5% CO₂培养箱中培养12 h,弃掉培养液,加入等体积的PBS轻轻冲洗以去除未黏附的乳酸菌;去除PBS后,取每组中的3个培养孔加入1 mL Trizol以重悬裂解细胞,

并将裂解液直接提取RNA或储存于-80℃冰箱中。其余每组3个细胞培养孔加入新鲜的细胞培养基,然后加入嗜水气单胞菌NJ-1至终浓度为10⁷ CFU/mL,诱导细胞凋亡4 h。使用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒检测每个处理组中细胞的凋亡率。

1.5 斑马鱼的饲养及饲料的制备

斑马鱼的饲养:AB系斑马鱼大约4月龄,平均体质量(1.5±0.24) g,平均体长(3.0±0.5) cm,购于国家斑马鱼资源中心。斑马鱼的养殖条件:养殖水电导率500~550 μS/cm, pH为7.2~7.6,温度为28℃,光照黑白比为10:14,每天上午9:00和下午3:00喂食至表现饱食。

实验分为乳酸菌组和对照组。体外实验中,5种乳酸菌对斑马鱼ZF-4细胞的保护性最好的是*B. coagulans* 09.712,所以体内实验选取*B. coagulans* 09.712对斑马鱼进行饲喂。乳酸菌组的饲料制备:将培养好的*B. coagulans* 09.712经PBS缓冲液漂洗后重悬,参照Zhou等^[11]方法中的标准曲线,细菌定量为10⁷个/mL PBS缓冲液,按照1 mL PBS缓冲液:1 g基础饲料的比例,在无菌培养皿中均匀喷洒含有*B. coagulans* 09.712的PBS缓冲液,在每毫升PBS缓冲液中加入0.01 g脱脂牛奶作为保护剂,最终配成10⁷ CFU/g饲料。对照组中只喷洒无菌PBS,20℃风干15 h。并参照Harikrishnan等^[12]的方法包装、存放、检测细胞存活率。

1.6 实验动物分组

取斑马鱼138尾,将其随机分为2组,每组69尾,一组饲喂添加*B. coagulans* 09.712的饲料,一组饲喂PBS制备的饲料并作为对照组,分别持续饲喂28 d后用嗜水气单胞菌NJ-1进行浸浴攻毒实验,根据前期预实验,每组9条用低浓度(10⁵ CFU/mL)攻毒,攻毒12 h后将斑马鱼用养殖水冲洗3遍并转移至普通饲养水中,在攻毒后的第1、2、3天进行肠道取样(n=3)用于细胞因子表达的分析。其余每组60尾随机分至3个鱼缸,作为3个重复实验,2组斑马鱼饲喂28 d后,向水中添加终浓度为10⁸ CFU/mL的嗜水气单胞菌NJ-1进行浸浴攻毒实验,攻毒12 h后将斑马鱼冲洗3遍并转移至普通饲养水中,持续观察15 d直到累积死亡数不变为止,并且攻毒后每天记录斑马鱼的死亡情况。

1.7 实时荧光定量PCR检测

用Trizol提取总RNA, 逆转录为cDNA 后进行扩增, 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成(表1)。采用实时荧光定量PCR仪(Nano, Roche), 其中内参基因为RpL13。RT-PCR采用20 μ L体系: 2 \times SYBR Green Mix 10 μ L, 20 μ M的正反引物各0.4 μ L, cDNA模板2 μ L, ddPCR水7.2 μ L。

PCR扩增程序: 95 $^{\circ}$ C预变性15 min, 95 $^{\circ}$ C变性20 s, 60 $^{\circ}$ C退火20 s, 72 $^{\circ}$ C延伸20 s, 40个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。在65 $^{\circ}$ C时绘制熔解曲线, 72 $^{\circ}$ C时检测荧光信号。

1.8 数据处理

实验中获得的各组数据均采用Origin8.0和SPSS 16.0进行统计分析。结果均采用平均数 \pm 标准

表 1 实时荧光定量PCR引物参数

Tab. 1 Sequences of primers used for real-time PCR

基因名称 genes	引物序列(5'-3') sequences(5'-3')	登录号 accession no.
<i>IL-1β</i>	F: AACCTGTACCTGGCCTGTTG R: ATCTCCACCATCTGCGAATC	BC098597
<i>TNF-α</i>	F: ACCAGGCCTTTTCTTCAGGT R: TGCCAGTCTGTCTCCTTCT	AY427649
<i>IL-10</i>	F: ATTTGTGGAGGGCTTTCCTT R: AGAGCTGTTGGCAGAATGGT	NM_001020785
<i>NFκB</i>	F: GGACGGAGACACGTATCTGC R: ACCATTTGTGGCTGTTCTGTGAC	NM_213184.1
<i>rpl13</i>	F: TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC R: TCAGACGCACAATCTTGAGAGCAG	NM_198143

差表示, 各组数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 比较均值使用Duncan氏极差检验, $P < 0.05$, 认为存在显著性差异; $P < 0.01$, 认为存在极显著性差异。

2 结果

2.1 5种乳酸菌对ZF-4细胞中细胞因子表达及细胞凋亡的影响

为了检测各种乳酸菌在体外对斑马鱼胚胎上皮细胞的免疫应答刺激和调控机制, 实验共选择3种细胞因子来检测免疫应答基因的表达量。其中*NF κ B*是细胞免疫应答的重要关键调控因子, 主要涉及机体防御反应、组织损伤和应激、细胞分化和凋亡以及肿瘤生长抑制过程的信息传递, *TNF α* 是其下游靶基因, *IL-10*是抑炎性因子。经各乳酸菌处理后, 对于*NF κ B*的表达, 经芽孢乳酸菌09.712处理组与其他处理组相比都有极显著性差异($P < 0.01$), 是对照组的4倍, 其次是植物乳杆菌 08.923(图1)。此外, 对于抑炎性因子*IL-10*的表达, 芽孢乳酸菌09.712和植物乳杆菌 08.923处理组与其他乳酸菌处理组相比有极显著性差异($P < 0.01$)。总体来讲, 以上结果均表明芽孢乳酸菌09.712和植物乳杆菌08.923有较强的细胞刺激效应。

细胞凋亡实验分析被广泛地应用于外源物质

和细胞互作的研究当中, 可以方便准确地反映细胞对外源物质的应答反应。本实验通过使用5种乳酸菌处理细胞, 并用嗜水气单胞菌NJ-1对细胞进行凋亡诱导, 从而检测乳酸菌对于细胞的保护作用。通过流式细胞仪对细胞凋亡进行计数, 对数据进行统计分析之后发现, 乳酸菌的添加可以减缓细胞的凋亡, 尤其以芽孢乳酸菌09.712处理组的凋亡率最低($P < 0.05$), 仅为23.36%, 其次是鼠李糖乳杆菌CGMCC 1.372和植物乳杆菌 08.923, 大约为33%, 其他2组乳酸菌处理后细胞的凋亡率也显著减少, 但是没有前3种显著(图2)。通过以上实验得出, 5种乳酸菌中*B. coagulans* 09.712对于ZF-4的保护作用最为明显, 所以选取*B. coagulans* 09.712用于下一步体内实验。

2.2 低浓度嗜水气单胞菌NJ-1攻毒斑马鱼后肠道细胞因子表达量的变化

在不同处理组中, 3种细胞因子的表达量在攻毒后没有一定的规律性。在攻毒后第1天, 饲喂*B. coagulans* 09.712组的细胞因子*IL-1 β* 的表达量比对照组有了极显著的提高($P < 0.001$), 但是随着攻毒时间的增长, 在攻毒后第3天实验组的表达量相比对照组差异不显著。而对于*TNF- α* 和*IL-10*的表达, 在攻毒后的第1天, *B. coagulans*

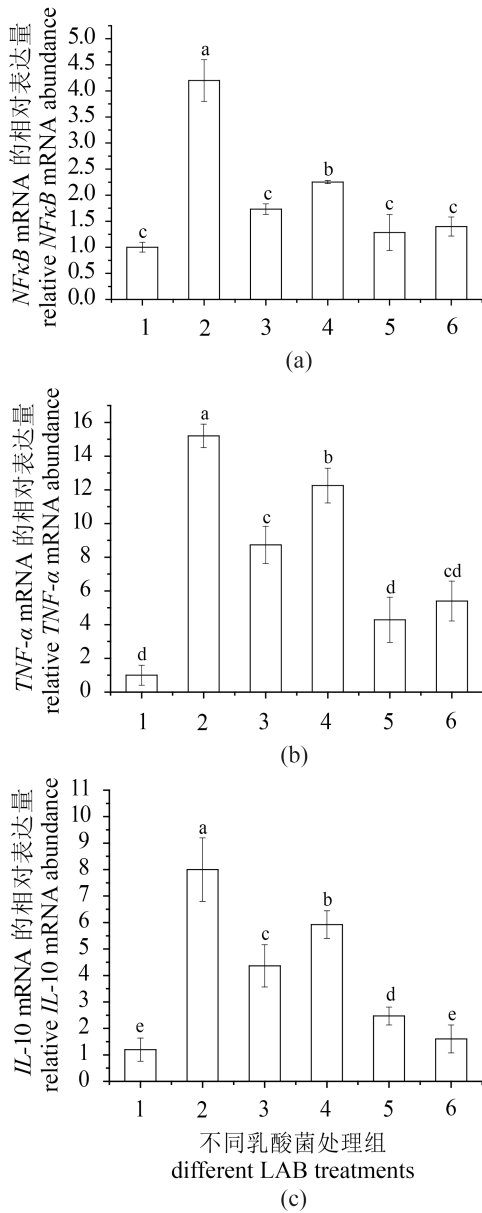


图 1 乳酸菌与ZF-4细胞互作的细胞因子相对表达量
 1. 对照组; 2. 芽孢乳酸菌09.712; 3. 鼠李糖乳杆菌CGMCC 1.372; 4. 植物乳杆菌08.923; 5. 长双歧杆菌婴儿亚种CGMCC 1.2202; 6. 嗜热链球菌CGMCC 1.2471; 误差线表示标准偏差(±SD), 不同字母代表 $P < 0.01$, 下同

Fig. 1 Relative gene expression of cytokines in the ZF-4 cells incubated with lactic acid bacteria

1. control; 2. *B. coagulans* 09.712; 3. *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724; 4. *L. plantarum* 08.923; 5. *B. infantis* CGMCC 1.2202; 6. *S. thermophilus* CGMCC 1.2471; the error bars indicate standard deviation (±SD), statistical significance ($P < 0.01$) was marked by different letters, the same below

09.712相比对照组明显升高($P < 0.01$), 但是在攻毒后的第3天, 与对照组相比就明显回落, 在 *TNF-α* 的相对表达量上差异不显著, 但是与对照

组比较, *B. coagulans* 09.712处理组的 *IL-10* 还是处于高表达量($P < 0.05$, 图3)。

2.3 添加芽孢乳酸菌09.712对斑马鱼抗病性的影响

在斑马鱼的饲料中添加乳酸菌, 并饲喂斑马鱼28 d后再用高浓度嗜水气单胞菌NJ-1对斑马鱼进行浸浴攻毒, 结果显示, 对照组与 *B. coagulans* 09.712处理组的死亡率在攻毒后的第11天已经趋于稳定, 对照组的死亡率很高, 为97.60%, *B. coagulans* 09.712处理组中的死亡率与对照组相比有明显减少($P < 0.05$), 为42.20%(图4)。可见添加 *B. coagulans* 09.712对斑马鱼的抗病性有明显提升。

3 讨论

本实验以斑马鱼为模型筛选有效益生菌用于预防水产动物疾病。先利用体外实验比较5种乳酸菌对斑马鱼胚胎上皮细胞ZF-4的刺激, 诱导细胞产生先天性免疫应答, 分泌细胞因子, 其中, *IL-1β*和*TNF-α*是促炎性因子, *IL-10*是抑炎性细胞因子, 而核因子 κB (*NFκB*)体系主要涉及机体防御反应、组织损伤和应激、细胞分化和凋亡以及肿瘤生长抑制过程的信息传递, *TNF-α*是其下游靶基因。实验结果显示, 添加芽孢乳酸菌09.712和植物乳杆菌08.923后, 细胞中*NFκB*、*TNF-α*和*IL-10*的表达比其他组都高($P < 0.01$), 说明这2种细菌对斑马鱼ZF-4细胞系的免疫刺激可能是通过*NFκB*信号通路实现的, 对*NFκB*调控的下游靶基因 *TNF-α* 表达量的检测结果也支持了这一结论。抑炎性细胞因子 *IL-10*具有限制肠上皮细胞对致病菌的免疫应答和维持共生细菌稳态的作用^[13], 添加芽孢乳酸菌09.712处理组能促进ZF-4细胞表达更多的*IL-10*, 结合5种乳酸菌对嗜水气单胞菌NJ-1诱导的细胞凋亡率的数据, 说明芽孢乳酸菌09.712对斑马鱼ZF-4细胞在抵抗病原感染和缓解炎症反应等方面具有一定的潜力。

实验又将芽孢乳酸菌09.712添加到饲料中饲喂斑马鱼28 d, 并用嗜水气单胞菌NJ-1进行攻毒实验。嗜水气单胞菌NJ-1是从患有败血症的鲫(*Carassius auratus*)体内分离出的, 其致病力比常用致病菌嗜水气单胞菌ATCC 7966更强。实验结果表明, 添加乳酸菌组的斑马鱼肠道中促炎因子*IL-1β*的mRNA表达量在攻毒之后减少, 而抑炎因子*IL-10*的表达量却升高, 揭示了芽孢乳酸菌

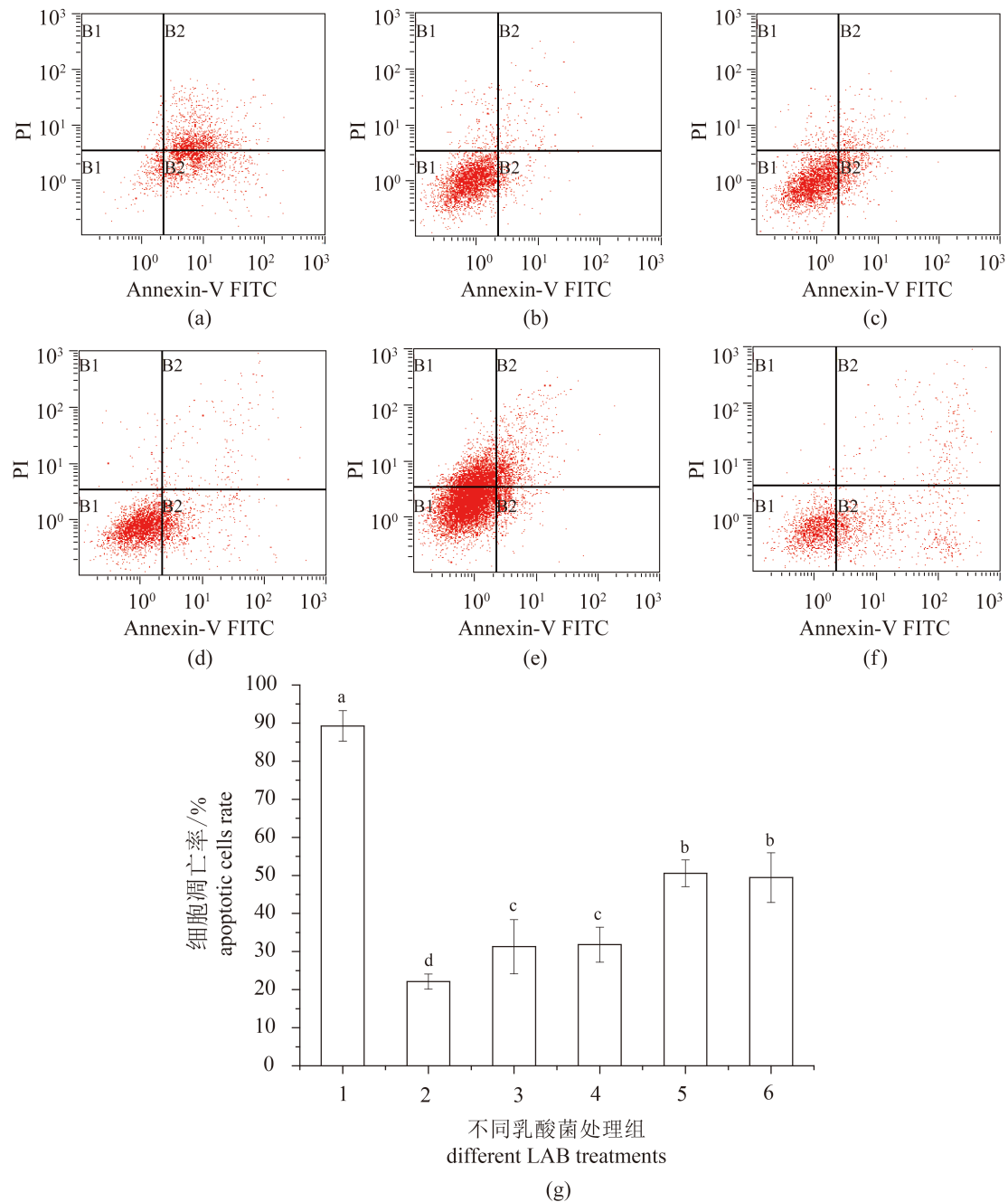


图 2 5种乳酸菌对细胞凋亡的影响

(a)~(f). 流式细胞分析图谱; (a) 对照组; (b) 芽孢乳酸菌09.712处理组; (c) 植物乳杆菌08.923处理组; (d) 鼠李糖乳杆菌CGMCC 1.3724处理组; (e) 长双歧杆菌婴儿亚种CGMCC1.2202处理组; (f) 嗜热链球菌CGMCC 1.2471处理组; (g) 经嗜水气单胞菌NJ-1诱导后各组细胞凋亡率的统计学分析(1.对照组; 2.芽孢乳酸菌09.712; 3.鼠李糖乳杆菌CGMCC 1.3724; 4.植物乳杆菌08.923; 5.长双歧杆菌婴儿亚种CGMCC 1.2202; 6.嗜热链球菌CGMCC 1.2471)

Fig. 2 Apoptosis of ZF-4 cells incubated with five kinds of LAB infected by *A. hydrophila* NJ-1

a~f. flow cytometry profiles; (a) PBS-treated group; (b) *B. coagulans* 09.712; (c) *L. plantarum* 08.923; (d) *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724; (e) *B. infantis* CGMCC 1.2202; (f) *S. thermophilus* CGMCC 1.2471); (g) statistical analysis of apoptosis rate of each group after the induction of *A. hydrophila* NJ-1(1. control; 2. *B. coagulans* 09.712; 3. *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724; 4. *L. plantarum* 08.923; 5. *B. infantis* CGMCC 1.2202; 6. *S. thermophilus* CGMCC 1.2471)

09.712可以减少机体对于致病菌引起的炎症反应。之前也有研究报道, 益生菌[包括混合益生

菌制剂 VSL#3、单一的双歧杆菌、乳酸杆菌或乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)]能够促进单核/巨噬

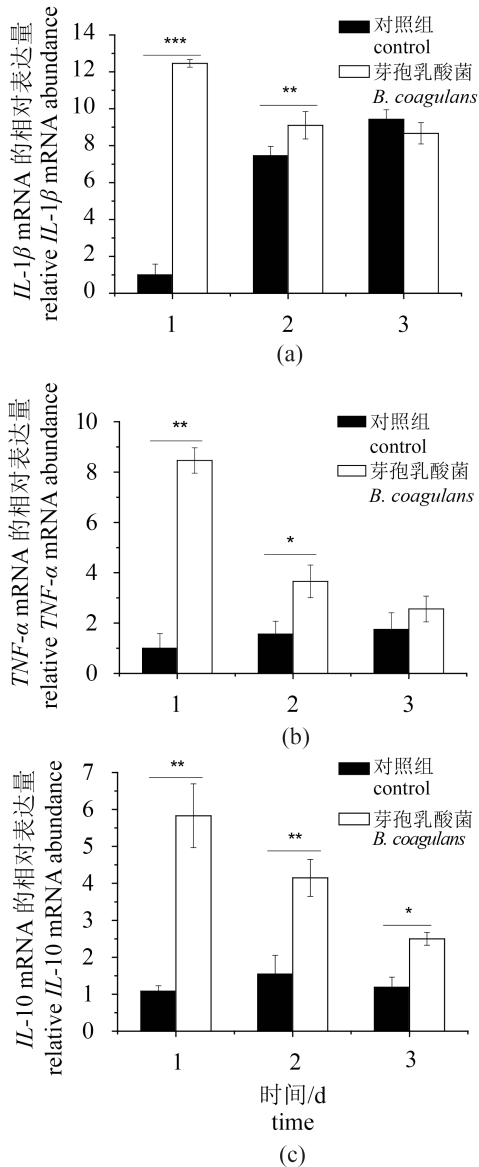


图3 嗜水气单胞菌NJ-1攻毒后芽孢乳酸菌09.712对斑马鱼体内细胞因子表达量的影响

误差线表示标准偏差(±SD), *. P < 0.05; **. P < 0.01; ***. P < 0.001, 下同

Fig. 3 Quantitative PCR analysis of the expression of cytokine genes associated with gut mucosal immunity in B. coagulans 09.712-treated zebrafish after A. hydrophila NJ-1 challenge

The error bars indicate standard deviation (±SD), *. P < 0.05; **. P < 0.01; ***. P < 0.001, the same below

细胞或者树突细胞产生 IL-10^[14-17]。然而在乳酸菌处理组中, 抑炎因子 TNF-α 的 mRNA 表达量却比对照组中多, 这可能是由于 TNF-α 也可以刺激上皮细胞的增生^[18], 从而促进肠道上皮屏障的再生, 具体机制有待于进一步的研究。

综上所述, 筛选出的芽孢乳酸菌09.712对斑

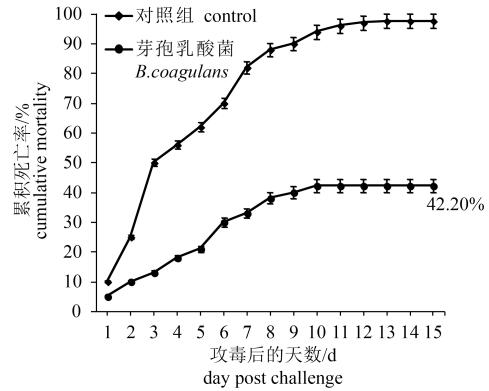


图4 嗜水气单胞菌NJ-1攻毒斑马鱼后的平均累积死亡率

Fig. 4 Average cumulative mortality rates of zebrafish after the effects against A. hydrophila NJ-1 infection by B. coagulans 09.712

马鱼有显著的免疫调节能力, 在一定程度上能抑制炎症反应, 增强机体的免疫应答, 并且在体内实验中能明显减少嗜水气单胞菌NJ-1感染后斑马鱼的死亡率。芽孢乳酸菌09.712可作为预防水产动物疾病的理想选择, 本研究结果也为阐明乳酸菌先天性免疫调节作用机理提供理论基础。

参考文献:

[1] Verschuere L, Heang H, Criel G, et al. Selected bacterial strains protect Artemia spp. from the pathogenic effects of Vibrio proteolyticus CW8T2[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 1139-1146.

[2] Subasinghe R P, Barg U, Phillips M J, et al. Aquatic animal health management: investment opportunities within developing countries[J]. Journal of Applied Ichthyology, 1998, 14(3-4): 123-129.

[3] Tuomola E M, Ouwehand A C, Salminen S J. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 1999, 26(2): 137-142.

[4] Scannapieco F A, Wang B Y, Shiao H J. Oral bacteria and respiratory infection: effects on respiratory pathogen adhesion and epithelial cell proinflammatory cytokine production[J]. Annals of Periodontology, 2001, 6(1): 78-86.

[5] Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, et al. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout Oncorhynchus mykiss[J]. Aquaculture, 2005, 243(1-4): 241-254.

- [6] Pirarat N, Kobayashi T, Katagiri T, *et al.* Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 113(3-4): 339-347.
- [7] Russo P, Iturria I, Mohedano M L, *et al.* Zebrafish gut colonization by mCherry-labelled lactic acid bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(8): 3479-3490.
- [8] Gioacchini G, Maradonna F, Lombardo F, *et al.* Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Reproduction*, 2010, 140(6): 953-959.
- [9] Rieu A, Aoudia N, Jego G, *et al.* The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*[J]. *Cellular Microbiology*, 2014, 16(12): 1836-1853.
- [10] Pan C Y, Wang Y D, Chen J Y. Immunomodulatory effects of dietary *Bacillus coagulans* in grouper (*Epinephelus coioides*) and zebrafish (*Danio rerio*) infected with *Vibrio vulnificus*[J]. *Aquaculture International*, 2013, 21(5): 1155-1168.
- [11] Zhou Z G, Wang W W, Liu W S, *et al.* Identification of highly-adhesive gut *Lactobacillus* strains in zebrafish (*Danio rerio*) by partial *rpoB* gene sequence analysis[J]. *Aquaculture*, 2012, 370-371: 150-157.
- [12] Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo M S. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(5): 868-874.
- [13] Clavel T, Haller D. Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation[J]. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2007, 8(2): 25-43.
- [14] Foligne B, Nutten S, Grangette C, *et al.* Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2007, 13(2): 236-243.
- [15] Niers L E M, Timmerman H M, Rijkers G T, *et al.* Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2005, 35(11): 1481-1489.
- [16] O'Hara A M, O'Regan P, Fanning Á, *et al.* Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*[J]. *Immunology*, 2006, 118(2): 202-215.
- [17] Lammers K M, Brigidi P, Vitali B, *et al.* Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2003, 38(2): 165-172.
- [18] Hart A L, Lammers K, Brigidi P, *et al.* Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria[J]. *Gut*, 2004, 53(11): 1602-1609.

Selection and immunomodulatory effect of lactic acid bacteria in protecting zebrafish against *Aeromonas hydrophilia* NJ-1 infection

WANG Yanbo¹, REN Zhenzhen¹, ZHANG Yan², FU Linglin^{1*}

(1. Food Microbiology Technology Key Laboratory of Zhejiang Province, School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China;

2. Hebei Food Inspection and Research Institute, Shijiazhuang 050091, China)

Abstract: In order to screen and obtain probiotic bacteria for effective protection against *Aeromonas hydrophilia* NJ-1 infection in aquatic animals, we compared the expression levels of *NFκB*, *TNF-α* and *IL-10* in ZF-4 cell model co-cultured with five different potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) by quantitative PCR. The apoptosis of ZF-4 cells induced by *A. hydrophilia* NJ-1 infection was also determined in LAB-treated and control groups. Next, *Bacillus coagulans* 09.712 with best immunomodulative effect *in vitro* was supplemented into feed and fed to zebrafish for 28 days. The expression levels of cytokines (*TNF-α*, *IL-1β* and *IL-10*) in gut tissue were monitored and the cumulative mortality was recorded for 15 days after challenge. Our results showed that among these five probiotic LAB, treatment with *B. coagulans* 09.712 could significantly increase the expression levels of *NFκB*, *TNF-α* and *IL-10* in ZF-4 cells. The apoptosis rate was 23.36%, much lower than other groups. In addition, administration of *B. coagulans* 09.712 significantly enhanced the levels of *IL-1β*, *TNF-α* and *IL-10* in gut on the first day post challenge. The expression of cytokines remarkably decreased during the periods after challenge. At day 3-post challenge, the level of *IL-1β* in *B. coagulans* 09.712-treated group was lower than that of control, while the level of *IL-10* was higher in bacteria treatment. The cumulative mortality of zebrafish fed with bacteria was significantly lower than that of control. Taken together, *B. coagulans* 09.712 has an effective immunomodulatory effect *in vitro* and *in vivo* against infection. Our work may provide new insight into immunomodulative and immunoprotective function of probiotic LAB in zebrafish.

Key words: *Aeromonas hydrophilia*; lactic acid bacteria (LAB); ZF-4 cell line; zebrafish; immunomodulatory effect; cytokine

Corresponding author: FU Linglin. E-mail: fulinglin@mail.zjgsu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31571770, 31571913); Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (LY14C200001, LZ15C200001)