

## 黄颡鱼甘露糖受体基因的克隆和功能分析

刘小玲<sup>1,2</sup>, 王虹<sup>1,2</sup>, 樊启学<sup>2</sup>, 兰江风<sup>1,2,3\*</sup>, 林鑫<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 水生动物医学系, 湖北武汉 430070;

2. 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, 湖北武汉 430070;

3. 华中农业大学水产学院, 池塘健康养殖湖北省工程实验室, 湖北武汉 430070;

4. 华中农业大学水产学院, 农业部淡水生物繁育重点实验室, 湖北武汉 430070)

**摘要:**甘露糖受体(MR)隶属凝集素超家族, 主要表达于巨噬细胞和未成熟的树突状细胞表面。MR不仅在先天免疫防御中发挥重要作用, 还通过参与抗原呈递, 激活T淋巴细胞, 启动获得性免疫应答过程。本研究采用同源克隆技术获得黄颡鱼甘露糖受体(*pfMR*)基因, 采用荧光定量PCR技术检测MR在正常黄颡鱼体内的分布情况, 采用鲷爱德华菌感染黄颡鱼头肾巨噬细胞和甘露聚糖封闭MR方法研究黄颡鱼MR在抗细菌感染中的作用。结果显示, *pfMR*同团头鲂、草鱼、斑马鱼和尼罗罗非鱼的MR聚为一支。*pfMR*在所检测的12个组织中均有分布, 其在肾脏、脾脏和肌肉组织中表达量较高, 在血液中表达量较少。鲷爱德华菌感染黄颡鱼头肾巨噬细胞后, *pfMR*、*IL-1 $\beta$* 和*TNF- $\alpha$* 均被细菌诱导表达, 超氧阴离子和一氧化氮的含量也上升, 超氧阴离子在感染30 min后即显著上升, 一氧化氮在感染12 h后才显著上升。甘露聚糖竞争结合MR, 显著抑制巨噬细胞内化GFP标签的鲷爱德华菌, 加入EDTA减少内化的荧光强度, 加入Ca<sup>2+</sup>使内化的荧光强度回升。研究表明, 黄颡鱼头肾巨噬细胞MR参与鲷爱德华菌的识别和内吞过程, 而且依赖Ca<sup>2+</sup>。

**关键词:**黄颡鱼; 甘露糖受体; 鲷爱德华菌; 超氧阴离子; 一氧化氮

**中图分类号:** Q 785; S 965

**文献标志码:** A

甘露糖受体(mannose receptor, MR)是一种跨膜糖蛋白, 属于C型凝集素家族, 不仅表达于巨噬细胞和树突状细胞, 还在肝脏内皮细胞、视网膜上皮细胞、脑神经细胞以及精子等多种类型的细胞上表达<sup>[1]</sup>。MR是重要的模式识别受体和内吞受体, 可以识别多种内源性和外源性的糖分子, 通过介导配体内化, 并与其他模式识别受体协同作用, 在维持机体内环境稳定和抗感染过程中发挥重要作用<sup>[2-3]</sup>。

大量的研究表明, MR不仅能识别细菌、真菌、病毒、寄生虫等病原生物, 还可以结合病

原生物入侵机体过程中产生的代谢产物, 启动先天免疫反应, 或通过提呈抗原启动获得性免疫应答。人巨噬细胞MR参与对白色念珠菌(*Candida albicans*)、卡氏肺囊虫(*Pneumocystis carinii*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、杜诺万利什曼原虫(*Leishmania donovani*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)和疟原虫(*Plasmodium* sp.)等病原的识别和非调理性吞噬过程, 并促进产生大量活性氧<sup>[4-8]</sup>。曼森氏裂体吸虫(*Schistosoma mansoni*)尾蚴在宿主体内移行和向童虫转变过程中, 许多分泌和排泄物都能被宿主MR识别, 从而激

收稿日期: 2016-04-11 修回日期: 2016-12-10

资助项目: 国家自然科学基金(31372563, 31572657, 31502199); 中央高校基本科研业务费专项(2014PY035, 2662015QC019); 湖北省科技支撑计划(2015BBA228, YSF2015000255); 农业部渔用药物创制重点实验室开放课题(201401); 广东省海洋与渔业局基金(A201512C003, 2015-115); 武汉市科技局基金(2016020101010089)

通信作者: 兰江风, E-mail: lanjiangfeng@mail.hzau.edu.cn; 林鑫, E-mail: linli@mail.hzau.edu.cn

发机体产生特异的抗曼森氏裂体吸虫免疫反应<sup>[9]</sup>。小家鼠(*Mus musculus*)巨噬细胞MR能够结合新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*), 并能识别其组分隐球菌甘露糖蛋白, 通过提呈该抗原, 诱导小鼠的T细胞应答以保护宿主。同时MR敲除的小鼠, 其T细胞保护应答显著减弱<sup>[10]</sup>。由于MR的胞质内部分很短, 缺乏信号转导结构域, 因此其激活免疫信号转导途径需要与其他的受体协作。如人单核细胞对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)感染的炎症反应必须依赖MR与TLR2的协同作用<sup>[11]</sup>。免疫共沉淀技术实验结果证实, 巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)及其gp43蛋白激活人单核细胞促炎症信号通路, 除需要MR与TLR2、TLR4的协作外, 还需要dectin-1的参与<sup>[12-13]</sup>。

进一步的研究表明, 吞噬细胞MR与病原免疫逃逸相关, 同时发现吞噬细胞胞外分布的MR介导了多种病原的入侵和传播。新生隐球菌通过下调巨噬细胞MR的表达量抑制机体的免疫应答, 从而逃避机体免疫系统的捕杀<sup>[14]</sup>。结核分枝杆菌及其细胞壁成分(mannose-capped lipoarabinomannan, ManLAM)通过MR依赖途径, 诱导过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$ 的表达, 抑制巨噬细胞的成熟以及吞噬泡与溶酶体的融合, 从而逃避免疫杀伤和清除作用<sup>[15]</sup>。肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)通过嗅鞘细胞上MR介导的内吞作用入侵宿主细胞<sup>[16]</sup>。人类精子头部表达的MR能作为HIV的载体而介导HIV的入侵, 从而导致HIV的垂直和水平传播<sup>[17]</sup>。人类MR可以识别和结合4种血清型的登革热病毒和特异性的糖蛋白, 介导其感染<sup>[18]</sup>。Chakraborty等<sup>[19]</sup>发现, 巨噬细胞在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后, 引起MR表达的下降, 减少了杜诺万利什曼原虫进入细胞的量, 表明MR的表达与杜诺万利什曼原虫的感染相关。

综上所述, MR作为能结合多种配体的C-型凝集素, 在多种病原的感染中起重要作用。开展以MR为靶点的免疫调节研究, 以及深入研究MR在病原入侵和免疫逃逸中的作用机制, 对开拓有效的防治途径具有极其重要的价值。爱德华菌病是水产养殖中最常见的传染病之一, 对水产养殖业危害巨大, 目前尚无有效的防治方法。爱德华菌属兼性胞内寄生菌, 能够逃逸吞噬细胞的杀灭作用, 在胞内存活和生长繁殖。本研究克隆黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的

MR序列, 了解pfMR的结构特征, 采用鲷爱德华菌(*Edwardsiella ictaluri*)感染黄颡鱼头肾巨噬细胞, 探讨MR在爱德华菌感染中的角色, 为进一步研究MR的功能, 及寻求爱德华菌病的防治新策略提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验用黄颡鱼(180~200 g)购自湖北团风县某渔场, 使用淡水循环养殖系统(水温约25 °C)暂养至稳定后用于实验。

病原采用鲷爱德华菌和转化有GFP表达载体pFPV25.1的鲷爱德华菌。

### 1.2 pfMR的组织分布

随机选取5条黄颡鱼, 取其肝、脾、肾、头肾、肠、皮肤、肌肉、脑、鳃、心脏、血液和精巢等组织, 提取总RNA, 使用反转录试剂盒按照既定步骤反转录得到cDNA (百泰克, 北京)。使用荧光定量PCR对MR组织分布进行分析,  $\beta$ -actin作为内参。数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 利用SPSS 16.0软件进行统计分析,  $P < 0.05$ 表示差异显著,  $P < 0.01$ 表示差异极显著。

### 1.3 巨噬细胞MR表达模式

使用Percoll (碧云天, 北京)提取鱼头肾组织巨噬细胞。分离的黄颡鱼头肾巨噬细胞以 $2.5 \times 10^5$ 个/mL接种于细胞培养板, 培养过夜后, 以MOI=1:10(1细胞:10细菌)的鲷爱德华菌进行细胞感染。提取感染后1、2、4和7 h细胞总RNA, 并反转录为cDNA。使用荧光定量PCR对MR的表达模式进行分析, PCR反应条件按照罗氏公司的荧光定量PCR推荐的方法。

### 1.4 巨噬细胞呼吸爆发的测定

细胞以 $1 \times 10^5$ 个/mL接种于96孔细胞培养板, 培养过夜后, 鲷爱德华菌以MOI=1:10感染细胞, 对照组为磷酸盐缓冲液(PBS)。采用NBT法, 检测细菌刺激后0.5、1、1.5、2和3 h细胞超氧阴离子的含量。采用Griess法, 于感染后1、2、4、8、12和24 h测定NO的含量。

### 1.5 MR与鲷爱德华菌感染的关系

MR是一种重要的模式识别受体, 研究表明其参与了多种病原菌侵入宿主细胞的过程。甘

露聚糖与MR有较高的亲和力,使用Sigma公司的终浓度为5 mg/mL的甘露聚糖封闭MR,以分析MR与鲷爱德华菌感染的关系。实验过程中选择性添加2.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 和2 mmol/L EDTA以验证MR的活性是否依赖 $\text{Ca}^{2+}$ 。实验分为6组,  $2.5 \times 10^6$ 个/mL细胞接种于细胞培养板,贴壁培养过夜后,第1组加入甘露聚糖孵育2h;第2~4组加入EDTA孵育30 min, PBS清洗3遍,第3组加入 $\text{Ca}^{2+}$ 孵育1 h,第4组加入 $\text{Mg}^{2+}$ 孵育1 h;第5组只用 $\text{Ca}^{2+}$ 孵育1 h,第6组为空白对照组。在前期处理完成后,所有组分均加入预先活化好的含有GFP的鲷爱德华菌( $\text{GFP}^+$ ),以MOI=1:10感染细胞2 h后, PBS清洗3~5遍,于509 nm检测裂解细胞中的荧光强度。

## 2 结果

### 2.1 *pfMR*氨基酸序列比对及系统进化分析

为了分析*pfMR* (NCBI Submission ID: 1921439)在进化中的地位,利用NCBI数据库,选取包括7种哺乳动物、2种鸟类和5种硬骨鱼类的氨基酸序列。使用MEGA 4.0软件对选取的MR氨基酸序列构建系统进化树。*pfMR*同团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的MR聚为一支,随后与尼罗

罗非鱼聚为一支,并与舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)关系较近。鸟类和哺乳类分别聚为一支(图1)。总之,MR的聚类分析结果和动物的分类地位比较一致。

### 2.2 *pfMR*组织分布

采用实时定量PCR检测了*pfMR*基因在黄颡鱼不同组织中的表达情况。*pfMR*在所有的被检测组织中均有表达,在脾脏和肾脏中有较高的表达量,分别为血液中表达量的120.14和105.50倍(血液中表达量做参照,设定为1)(图2)。

### 2.3 细菌刺激后巨噬细胞*pfMR*、*IL-1 $\beta$* 和*TNF- $\alpha$* 的表达分析

以MOI=1:10鲷爱德华菌感染分离的黄颡鱼头肾巨噬细胞,在感染后1、2、3和4 h收取样品,采用实时定量PCR检测感染后*pfMR*、*IL-1 $\beta$* 和*TNF- $\alpha$* 基因mRNA表达水平,在细菌处理1 h后*pfMR*表达量显著高于未处理的空白对照组,并且在感染后3 h达到峰值,为对照组的11.43倍,之后又显著下降(图3)。

细菌感染会引起细胞因子表达量的变化,为了研究鲷爱德华菌感染与细胞因子之间的关系,本研究对*TNF- $\alpha$* 和*IL-1 $\beta$* 的表达进行了分析。*TNF- $\alpha$* 的表达量在感染后显著上升,并在感染后

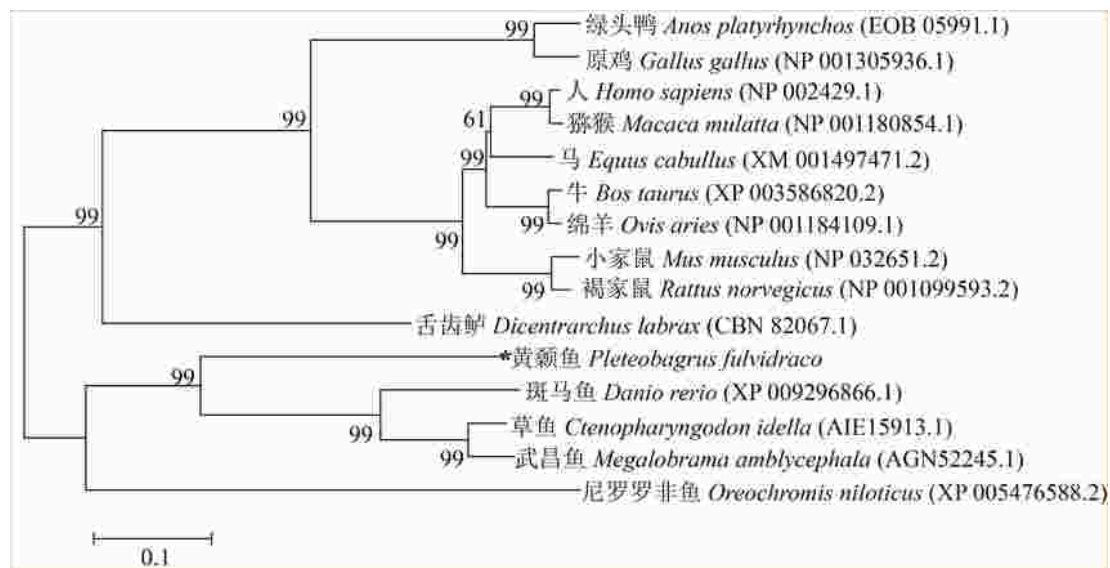


图1 *pfMR*进化树的构建

使用MEGA 4.0软件,构建了MR的系统发育树。节点处数值为置信值

Fig. 1 Phylogenetic tree of *pfMR*

MEGA 4.0 with neighbor-joining method was used in phylogenetic tree construction of *pfMR*. Numbers of each node indicated the percentage of bootstrapping of a 1000 replications

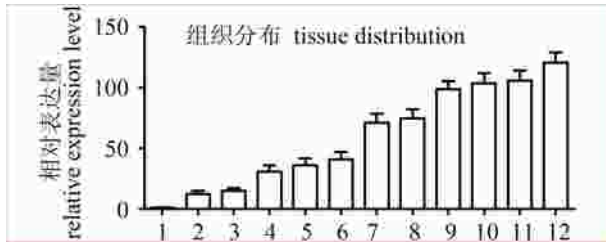


图2 pfMR的组织分布

1.血;2.皮肤;3.肠;4.精巢;5.鳃;6.肝;7.心;8.头肾;9.脑;10.肌肉;11.肾;12.脾。β-actin作为内参,实验重复3次

Fig. 2 Tissue distribution analysis of pfMR

1. blood; 2. skin; 3. intestine; 4. testis; 5. gills; 6. liver; 7. heart; 8. head-kidney; 9. brain; 10. muscle; 11. kidney; 12. spleen. β-actin was used as the internal control, the experiment was repeated three times

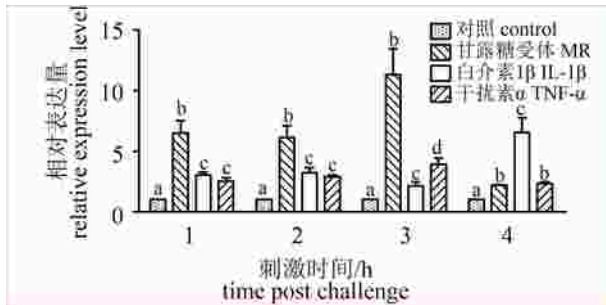


图3 鲷爱德华菌感染黄颡鱼巨噬细胞后pfMR、IL-1β和TNF-α的表达模式分析

β-actin作为内参基因,实验结果重复3次。数值采用平均值±标准差。同一时间点,不同的字母表示具有显著性差异(P<0.05),下同

Fig. 3 Expression profile analysis of pfMR, IL-1β and TNF-α in macrophage of P. fulvidraco after E. ictaluri infection

Expression of β-actin was used as an internal control. Each experiment was performed triplicate. Data were shown as mean±SD (n=3). There are significant differences between groups if marked with different letters (P<0.05), the same below

3 h达到峰值,为对照组的4.01倍。IL-1β的表达量在感染后1 h显著升高,在处理2 h达到第1个峰值,为PBS对照组的3.36倍,之后有下降趋势,在处理4 h达到第2个峰值(6.91倍)。

2.4 超氧阴离子、一氧化氮测定

采用NBT法、Griess法分别检测细菌感染后超氧阴离子、NO的含量,有爱德华菌组的超氧阴离子通常高于对照组(无细菌)。鲷爱德华菌感染细胞可以较早激活细胞产生超氧阴离子,在感染30 min,其超氧阴离子显著高于灭活爱德华菌组(P<0.05)。但是随着时间的延长(1.5和

3 h),灭活鲷爱德华菌处理细胞组的超氧阴离子高于鲷爱德华菌感染组。NO的产生和超氧阴离子的产生具有不同的特点。热灭活的鲷爱德华菌在24 h内没有显著诱导NO的产生。但是,活细菌感染细胞后,在12 h之后NO的产量显著升高(图4,图5)。

2.5 MR与鲷爱德华菌感染的关系

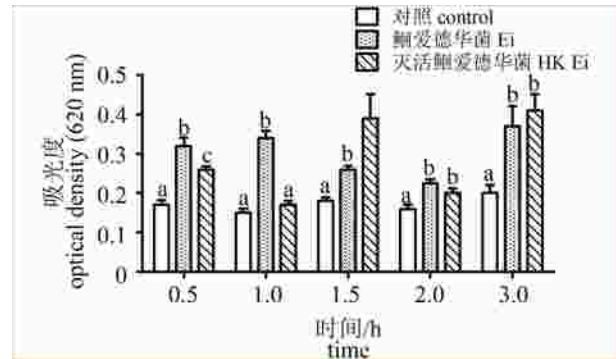


图4 鲷爱德华菌处理黄颡鱼头肾巨噬细胞后超氧阴离子的含量

实验分为3组,分别使用鲷爱德华菌、热灭活鲷爱德华菌和PBS处理黄颡鱼头肾巨噬细胞,随后利用NBT法检测各组中超氧阴离子的含量

Fig. 4 Superoxide anion amount in macrophage of P. fulvidraco

Macrophages were treated with live, heat killed E. ictaluri and PBS, respectively. Thereafter, the amount of superoxide anion was measured by NBT method

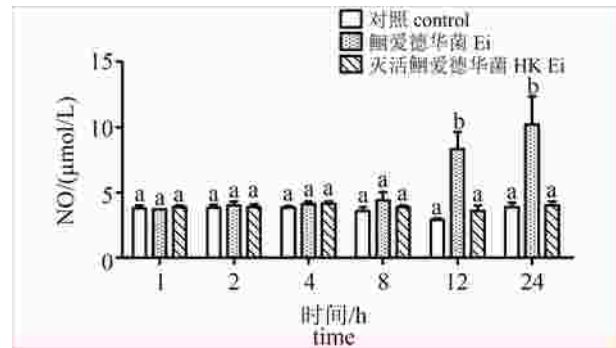


图5 鲷爱德华菌感染后黄颡鱼头肾巨噬细胞NO的含量

实验分为3组,分别使用鲷爱德华菌、热灭活鲷爱德华菌和PBS处理黄颡鱼头肾巨噬细胞,随后利用Griess法检测各组中NO的含量

Fig. 5 NO amount in macrophage of P. fulvidraco

Macrophages were treated with live, heat killed E. ictaluri and PBS, respectively. Thereafter, the amount of NO was measured by Griess method

大量研究表明哺乳动物细胞中MR的活动能够特异性被甘露聚糖mannan所抑制。为了研究MR与鲷爱德华菌感染的关系,本研究进行了甘露聚糖抑制试验。细菌感染前先用mannan孵育2 h,然后用表达有GFP标签的鲷爱德华菌感染细胞,PBS清洗3~5次后在培养板中加入细胞裂解液,509 nm检测荧光强度。对照组是未经mannan处理的细菌感染组。与对照组相比,加入甘露聚糖后,裂解液中荧光强度显著降低。加入Ca<sup>2+</sup>后,能显著增强其荧光强度。细胞预先加入EDTA后,荧光强度降低,而在EDTA之后再加入Ca<sup>2+</sup>其荧光强度有所升高,然而加入Mg<sup>2+</sup>不能产生这

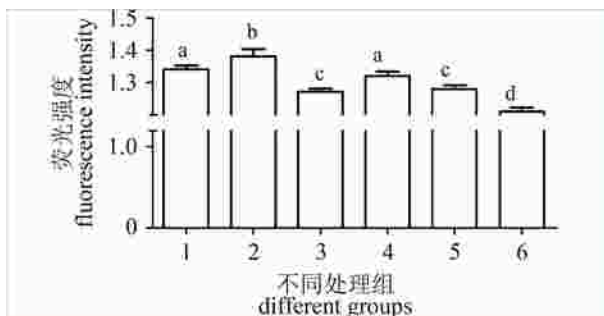


图6 甘露聚糖竞争抑制鲷爱德华菌与MR的结合

实验分为6组,第1组加入培养基+爱德华菌,第2组先添加培养基+Ca<sup>2+</sup>之后添加细菌(Ca<sup>2+</sup>),第3组加入培养基+EDTA后添加细菌(EDTA),第4组加入培养基+EDTA和Ca<sup>2+</sup>,后加入细菌(EDTA+Ca<sup>2+</sup>),第5组加入培养基+EDTA和Mg<sup>2+</sup>,后加入细菌(EDTA+Mg<sup>2+</sup>),第6组添加培养基+mannan后加入细菌(mannan)。细菌添加2 h后检测荧光信号

Fig. 6 Inhibition of the binding of MR to *E. ictaluri* by mannan

These experiments were divided into 6 groups, macrophages cells were pre-incubated with medium (1) or medium containing 5 mmol/L mannan (6), 2.5 mmol/L Ca<sup>2+</sup> (2), 2.0 mmol/L EDTA (3), 2.0 mmol/L EDTA+2.5 mmol/L Ca<sup>2+</sup> (4) and 2.0 mmol/L EDTA+Mg<sup>2+</sup> (5), respectively. Thereafter, heat-inactivated GFP-expressed *E. ictaluri* was added, and cells were incubated for 2 h. Fluorescence intensity of the cells was measured

种效果(图6)。表明甘露聚糖能够显著抑制鲷爱德华菌的内化过程,并且此过程依赖于Ca<sup>2+</sup>。

### 3 讨论

MR是一种模式识别受体,与内吞过程密切相关。MR主要存在于细胞膜表面,其胞质内部很短,含有内吞基序,但缺乏信号转导基序<sup>[20]</sup>。进化树分析发现黄颡鱼MR与鲤形目(Cypriniformes)的团头鲂、草鱼、斑马鱼MR聚为一支,并与尼罗罗非鱼、舌齿鲈距离较近。哺乳动物和鸟类

又分别单独聚为一支,表明MR的分子进化和动物进化较一致。

早期的研究表明,吞噬细胞表面的MR参与识别和结合多种病原,介导吞噬作用,并激活各种先天免疫应答机制。在激活吞噬作用时,巨噬细胞首先通过呼吸爆发产生大量活性氧、NO来杀灭病原,同时通过激活促炎信号通路,导致炎症反应<sup>[5]</sup>。鲷爱德华菌体外感染黄颡鱼头肾巨噬细胞后,检测*pfMR*、*IL-1β*和*TNF-α*的表达,结果显示*pfMR*、*IL-1β*和*TNF-α*的表达水平在不同时间点都有上调,表明*pfMR*可能参与了黄颡鱼抵抗细菌感染的先天性免疫反应。此结果与Wang等<sup>[21]</sup>在研究嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)注射感染草鱼和团头鲂<sup>[22]</sup>的结果一致。Heinsbroek等<sup>[23]</sup>发现缺乏MR的小鼠腹腔巨噬细胞在应答白色念珠菌感染时产生了较少的*TNF-α*; Yamamoto等<sup>[24]</sup>利用反义寡核苷酸抑制小鼠巨噬细胞中MR的表达,能够有效地抑制*IL-1β*、*IL-6*和*GM-CSF*等mRNA的合成。有学者提出,MR本身并不是一个信号分子,所以MR必须与其他受体共同合作来引起信号级联反应<sup>[11, 13]</sup>。近几年的研究表明,在铜绿假单胞菌感染过程中,MR和TLR2能协同激活人单核细胞NF-κB信号通路<sup>[11]</sup>。本研究中,甘露聚糖竞争抑制实验的结果预示着黄颡鱼*pfMR*可能参与了巨噬细胞内吞爱德华氏菌的过程,并且这个过程依赖于Ca<sup>2+</sup>。该结果与团头鲂巨噬细胞MR识别内吞嗜水气单胞菌的结果一致<sup>[25]</sup>。MR是否同其他受体一起协同激活免疫信号通路,还需进一步研究。

鲷爱德华菌感染黄颡鱼巨噬细胞30 min后,诱导产生了大量的活性氧,细胞内细菌含量呈减少的趋势,这与已报道的结果类似<sup>[26-28]</sup>。有研究指出,鲷爱德华菌自身编码的过氧化物酶、过氧化氢酶及超氧化物歧化酶,使其具有一定的抵抗宿主活性氧的能力。本研究发现,在感染1.5 h时,灭活菌组较活菌组和对照组产生较多的活性氧,而在其他时间点,灭活菌组和活菌组诱导产生的活性氧量并没有明显差异。这个差异可能是鲷爱德华菌抑制宿主细胞产生活性氧所致,也可能是宿主细胞在清除活细菌过程中,消耗了更多的活性氧,具体机制有待进一步研究。鲷爱德华菌感染12 h后,巨噬细胞才产生高水平的NO,并且活的鲷爱德华菌组NO含量明显高于对照和热灭活菌组。宿主在感染的晚期才

表达较高的NO, 可能是宿主细胞在调控活性氧和NO上存在协调机制<sup>[28]</sup>, 有待进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] East L, Isacke C M. The mannose receptor family[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2002, 1572(2-3): 364-386.
- [2] Stahl P D, Ezekowitz R A B. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense[J]. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10(1): 50-55.
- [3] Taylor P R, Gordon S, Martinez-Pomares L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition[J]. *Trends in Immunology*, 2005, 26(2): 104-110.
- [4] Kerrigan A M, Brown G D. C-type lectins and phagocytosis[J]. *Immunobiology*, 2009, 214(7): 562-575.
- [5] Gazi U, Martinez-Pomares L. Influence of the mannose receptor in host immune responses[J]. *Immunobiology*, 2009, 214(7): 554-561.
- [6] Martinez-Pomares L, Linehan S A, Taylor P R, *et al.* Binding properties of the mannose receptor[J]. *Immunobiology*, 2001, 204(5): 527-535.
- [7] Allavena P, Chieppa M, Monti P, *et al.* From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor[J]. *Critical Reviews in Immunology*, 2004, 24(3): 179-192.
- [8] Stahl P, Schlesinger P H, Sigardson E, *et al.* Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling[J]. *Cell*, 1980, 19(1): 207-215.
- [9] Paveley R A, Aynsley S A, Turner J D, *et al.* The mannose receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth *Schistosoma mansoni* and modulates IFN $\gamma$  production[J]. *International Journal for Parasitology*, 2011, 41(13-14): 1335-1345.
- [10] Dan J M, Kelly R M, Lee C K, *et al.* Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(6): 2362-2367.
- [11] Xaplanteri P, Lagoumintzis G, Dimitracopoulos G, *et al.* Synergistic regulation of *Pseudomonas aeruginosa*-induced cytokine production in human monocytes by mannose receptor and TLR2[J]. *European Journal of Immunology*, 2009, 39(3): 730-740.
- [12] Nakaira-Takahagi E, Golim M A, Bannwart C F, *et al.* Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes[J]. *Medical Mycology*, 2011, 49(7): 694-703.
- [13] Balderramas H A, Penitenti M, Rodrigues K R, *et al.* Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1[J]. *Cytokine*, 2014, 67(1): 36-43.
- [14] 李平. 甘露糖受体MR参与隐球菌免疫逃逸及S100A10促进隐球菌穿过血脑屏障的机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- Li P. The role of MR in immune evasion of cryptococcal infection and s100a10 in promoting *Cryptococcus neoformans* traversal across blood-brain barrier[D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2013 (in Chinese).
- [15] Rajaram M V S, Brooks M N, Morris J D, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses[J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 185(2): 929-942.
- [16] Macedo-Ramos H, Campos F S O, Carvalho L A, *et al.* Olfactory ensheathing cells as putative host cells for *Streptococcus pneumoniae*: evidence of bacterial invasion via mannose receptor-mediated endocytosis[J]. *Neuroscience Research*, 2011, 69(4): 308-313.
- [17] Cardona-Maya W, López-Herrera A, Velilla-Hernández P, *et al.* The role of mannose receptor on HIV-1 Entry into human spermatozoa[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2006, 55(4): 241-245.
- [18] Miller J L, de Wet B J M, Martinez-Pomares L, *et al.* The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages[J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(2): e17.
- [19] Chakraborty P, Ghosh D, Basu M K. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes[J]. *The Journal of Parasitology*, 2001, 87(5): 1023-1027.
- [20] 刘小玲, 曾令兵. 甘露糖受体结构、功能、表达和应用研究的新进展[J]. *水产学杂志*, 2013, 26(1): 54-59.
- Liu X L, Zeng L B. A review of the research ad-

- vancement of structure, function, expression and application of mannose receptor[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2013, 26(1): 54-59(in Chinese).
- [21] Wang L, Liu L C, Zhou Y, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor C type 1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 43(1): 54-58.
- [22] Liu X L, Tang X C, Wang L, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(7): 4601-4611.
- [23] Heinsbroek S E M, Taylor P R, Martinez F O, *et al.* Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis[J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(11): e1000218.
- [24] Yamamoto Y, Klein T W, Friedman H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages[J]. Infection and Immunity, 1997, 65(3): 1077-1082.
- [25] Zhao X, Liu L, Hegazy A M, *et al.* (2015) Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a  $Ca^{2+}$ -dependent manner. Fish Shellfish Immunol 43(2): 357-363.
- [26] Wang B, Yu T, Dong X, *et al.* *Edwardsiella tarda* invasion of fish cell lines and the activation of divergent cell death pathways[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 163(3-4): 282-289.
- [27] 刘小玲, 葛海燕, 田珍, 等. 皮质醇对黄颡鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活动的影响[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(6): 749-754.
- Liu X L, Ge H Y, Tian Z E, *et al.* Effects of cortisol on respiratory burst of head kidney macrophages in *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2008, 27(6): 749-754(in Chinese).
- [28] Liu L C, Zhou Y, Zhao X H, *et al.* Oligochitosan stimulated phagocytic activity of macrophages from blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) associated with respiratory burst coupled with nitric oxide production[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 47(1): 17-24.

## Cloning and functional analysis of mannose receptor from Chinese yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

LIU Xiaoling<sup>1,2</sup>, WANG Hong<sup>1,2</sup>, FAN Qixue<sup>2</sup>, LAN Jiangfeng<sup>1,2,3\*</sup>, LIN Li<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. Department of Aquatic Animal Medicine, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China;

3. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, Wuhan 430070, China;

4. Key Lab of Freshwater Animal Breeding, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Mannose receptor (MR) is a member of C-lectin family. It is mainly expressed on the surface of macrophage and immature dendritic cells. It has been shown that MR not only plays a significant role in innate immune responses, but also initiates acquired immune responses through processing and presenting antigens to activate T cells. In this study, we cloned and characterized *pfMR* of Chinese yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). The expression profiles of *pfMR* mRNA in different tissues of *P. fulvidraco* were assessed by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). To investigate the role of *pfMR* participating in the antibacterial infection, yellow catfish head kidney macrophages were infected with *Edwardsiella ictaluri* and competition binding test of mannan to MR was carried out. The phylogenetic tree analysis showed that MR of *P. fulvidraco*, *Megalobrama amblycephala*, *Ctenopharyngodon idella*, *Danio rerio*, and *Oreochromis niloticus* formed a clade. The mRNA of *pfMR* was expressed in all detected tissues with higher level in the kidney, spleen and muscle, and lowest expression in the blood. The expressions of *pfMR*, *IL-1 $\beta$*  and *TNF- $\alpha$*  mRNAs were all increased in cultured primary head-kidney macrophages after *E. ictaluri* infection. The infection of *E. ictaluri* also resulted in the over-expression of large number of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) and nitric oxide (NO) in the macrophages. The infection of *E. ictaluri* could significantly activate the production of  $O_2^{\cdot-}$  at 30 min post treatment, while the amount of NO in the macrophage was significantly elevated at 12 h post treatment. Mannan significantly inhibited the engulfed GFP-*E. ictaluri* by macrophages through competition binding to MR. The engulfed GFP-*E. ictaluri* was significantly reduced by addition of EDTA, and restored by addition of  $Ca^{2+}$ . The present study indicated that MR in head kidney macrophages of yellow catfish mediated phagocytosis of *E. ictaluri* and it was  $Ca^{2+}$ -dependent.

**Key words:** *Pelteobagrus fulvidraco*; mannose receptor; *Edwardsiella ictaluri*; superoxide anion  $O_2^{\cdot-}$ ; nitric oxide

**Corresponding author:** LAN Jiangfeng. E-mail: lanjiangfeng@mail.hzau.edu.cn;

LIN Li. E-mail: linli@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31372563, 31572657, 31502199); The Fundamental Research Funds for the Central Universities (2014PY035, 2662015QC019); Special Fund for Science and Technology from Hubei Province (2015BBA228, YSF2015000255); Fund from Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture (201401); Special Funds from the Administration of Ocean and Fisheries of Guangdong Province (A201512C003, 2015-115); Fund from Wuhan Science and Technology Bureau (2016020101010089)