



尼罗罗非鱼铁调素调节蛋白在宿主抵御病原菌侵染和调节铁稳态中的功能

尹晓雪*, 慕伟伟, 木亮亮, 王安利, 叶剑敏*

(华南师范大学生命科学学院, 现代水产养殖科学与工程研究院
广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东广州 510631)

摘要: 为了研究铁调素调节蛋白 (hemojuvelin, HJV) 在硬骨鱼中抵御病原菌感染和维持自身铁稳态过程中的作用, 实验扩增了尼罗罗非鱼铁调素调节蛋白基因 (*Onhvj*) 的开放阅读框 (ORF), 分析其在健康尼罗罗非鱼各组织中的分布模式及在抵御病原菌感染和调节铁稳态中的相关作用。结果显示, *Onhvj* 的 ORF 全长由 1 248 个碱基组成, 编码 415 个氨基酸, 在不同物种之间具有一定的保守性。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 结果显示, *Onhvj* 在尼罗罗非鱼各组织中广泛分布, 并在肝脏中的表达量最高。在无乳链球菌或嗜水气单胞菌感染后, *Onhvj* 在肝脏、脾脏、肠和鳃中的表达量均显著上调。体外头肾单核/巨噬细胞和肝细胞中 *Onhvj* 表达量在受到这 2 种病原菌应激下也显著上调。此外, 在 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 溶液刺激后, *Onhvj* 表达量在肝脏、脾脏、肠和鳃等组织, 以及头肾单核/巨噬细胞和肝细胞中的表达量也呈显著上调。受重组罗非鱼 IL-6 蛋白 [(r)OnIL-6] 刺激后, 头肾单核/巨噬细胞中 *Onhvj* 表达量显著上调, 表明炎症因子可以促进 *Onhvj* 表达。研究表明, 尼罗罗非鱼铁调素调节蛋白在宿主抵御病原菌感染和维持铁稳态的过程中发挥作用。本实验为探究 HJV 在硬骨鱼中的生物学功能提供了参考, 同时为进一步研究铁代谢在宿主防御病原菌感染过程中的重要作用提供理论指导。

关键词: 尼罗罗非鱼; 铁调素调节蛋白; 病原菌; 铁稳态; 炎症因子

中图分类号: S 942

文献标志码: A

铁是几乎所有生命体所必须的微量元素, 在许多关键的生物学过程, 尤其是在免疫反应调节中发挥至关重要的作用^[1-2]。例如, 在炎症反应和感染疾病期间, 宿主细胞和病原体都存在竞争铁的过程; 免疫细胞 (例如巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞) 需要足够的铁元素才能使其增殖并介导其效应功能^[1]。铁元素参与的生物学过程包括能量产生 (细胞色素 C)、生物合成 (氨基酸

氧化酶、脂肪酸去饱和酶)、解毒 (细胞色素 P450、过氧化氢酶)、氧气输送 (血红蛋白) 和宿主防御 (一氧化氮合酶、髓过氧化物酶、NAPH 氧化酶) 等^[3]。然而, 游离铁虽然对生命至关重要, 却具有潜在的毒性作用。另外, 细胞内过量 3 价铁也会通过芬顿反应引起 DNA 损伤 (如双链断裂) 及蛋白质的损伤, 从而导致细胞过早衰老和死亡^[4-5]。因此, 保持生物体内铁含量的稳定具有重要的

收稿日期: 2021-06-19 修回日期: 2021-08-13

资助项目: 国家自然科学基金 (31902396, 31972818); 中国博士后科学基金 (2019M652942)

通信作者: 尹晓雪 (照片), E-mail: sheilayin@m.scnu.deu.cn; 叶剑敏, E-mail: jmye@m.scnu.edu.cn



生物学意义。早期研究中指出, Fe^{3+} 通过肠上皮细胞中的铁还原酶转化为 Fe^{2+} , 并通过 2 价金属转运蛋白 1(DMT1) 转运到细胞质中^[6-8]。转铁蛋白 (transferrin, TF) 是一种血浆蛋白, 铁元素通过与 TF 结合转运并通过转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TFR) 介导的内吞作用将铁转运到组织中^[9]。肝细胞是主要的铁储存位点和重要的铁水平传感器, 而铁调素 (hepcidin) 是铁代谢的主要调节剂。当肝脏中铁含量升高时, 肝细胞就会大量转录编码铁调素基因^[10-11], 铁调素可直接与膜铁转运蛋白 (ferroportin, FPN) 结合, 然后进入细胞中并被降解, 抑制铁从细胞中的释放从而降低肝脏中铁的含量^[12]。其中, 铁调素调节蛋白 (HJV) 是铁调素的关键调节剂^[13-14], 主要通过 BMP/SMAD 信号传导途径促进铁调素的表达^[15]。

HJV 是调节铁调素表达的关键上游分子^[16], 是排斥性指导分子 (RGM) 家族的成员之一, 以糖基磷脂酰肌醇连接蛋白的形式存在于细胞膜上^[17]。rgm 是一个具有广泛影响的小型基因家族, 主要包含 4 个成员: *rgma* (或 *rgm*)、*rgmb* (*dragon*)、*rgmc* (*hemojuvelin*) 和 *rgmd* (仅存在于鱼类中)。RGM 家族成员共享几个糖蛋白结构基序, 这些基序都含有 N 端信号肽和部分血管性假血友病 D 型 (vWFD) 结构域, 其中 RGMa 和 RGMc 的 N 端信号肽内还含有特殊的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 序列。RGMs 家族成员具有调节免疫系统和维持铁稳态等多种生理功能^[18-19]。HJV 主要通过 BMP/SMAD 信号传导途径激活铁调素的表达^[20], 其过程为铁饱和转铁蛋白 (Holo-TF) 与 2 个转铁蛋白受体 (TFR1 和 TFR2) 的结合刺激 BMP 受体 (BMPR), 其配体 BMP2/4 和作为骨形态发生蛋白 BMP6 共受体的 HJV 组成的受体复合物发出信号^[21-22]。Holo-TF 与 TFR1 的结合释放了遗传性血色素沉着病蛋白 (HFE), 而 Holo-TF 与 TFR2 的结合稳定了 TFR2, 因此, HFE 和 TFR2 均可与受体复合物缔合, 即 HFE 和 TFR2 都可以以非竞争性方式结合 HJV^[23], 然后导致细胞质中 SMAD1/5/8 磷酸化。磷酸化的 SMAD 与 SMAD4 结合形成异聚复合物, 然后共同转移到细胞核中帮助形成转录复合物从而诱导 *hepcidin* 的表达^[24]。跨膜丝氨酸蛋白酶基因 (*TMPRSS6*) 是该通路中唯一被下调的基因, 与 *MT2* 共同促进 HJV 的裂解^[25]。HJV 功能的异常造成与铁过载相关的疾病, 如青

少年血色素沉着症^[26]、促红细胞增多症等^[27]。目前, HJV 已被鉴定出存在超过 40 个变异体^[28]。

目前, 关于 *hvj* 的基因结构及其表达异常引起的疾病已有一系列的报道, 比如人体血液中 HJV 的新生蛋白 FN5-6 片段的晶体结构域呈现线性排列^[29], HJV 功能异常导致人 (*Homo sapiens*) 患青少年血色素沉着症和促红细胞增多症^[26-27]; 同时有研究中报道了小鼠 (*Mus musculus*) 因缺乏 *TMPRSS6* 对 HJV 的表达具有显著影响^[30]。而在硬骨鱼类中, 关于 HJV 的结构及其生物学功能方面的研究处于起步阶段。有研究发现, 挪威舌齿鲈 (*Dicentrarchus lobrax*) 体内铁过载时肝脏中 *hvj* 和其他调节铁的基因表达发生变化^[31], 斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎 *hvj* 可调节影响 *hepcidin* 表达的 BMP 信号通路的相关功能^[32]。

尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 是世界范围内广泛分布的经济鱼类, 中国在 2019 年成为最大的罗非鱼养殖和出口国, 年产量达 162.5 万 t^[33]。尼罗罗非鱼具有生长速度快, 对饲料中蛋白的需求量低, 并且能够高养密饲养等优点^[34], 但是无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 等细菌疾病的大面积暴发给罗非鱼养殖产业带来巨大的经济损失^[35]。本研究扩增了尼罗罗非鱼 *hvj* (*Onhvj*) 的开放阅读框序列, 研究了 *Onhvj* 在响应细菌感染和铁过载中的功能特点, 阐述了 *Onhvj* 在尼罗罗非鱼抵御病原菌感染的先天免疫反应和维持铁稳态中发挥重要作用, 并阐明了炎症因子白介素 6 (IL-6) 具有调节 *Onhvj* 表达水平的作用。本研究为探究 *hvj* 在硬骨鱼中的生物学功能提供了参考, 同时为进一步研究铁代谢在宿主防御病原菌侵染过程中的重要作用提供了理论指导。

1 材料与方法

1.1 尼罗罗非鱼组织样本收集

尼罗罗非鱼购自广东省罗非鱼良种场, 并饲养于华南师范大学生命科学学院鱼类恒温半自动循环养殖系统内。选择 100 尾体质量为 70~90 g 的尼罗罗非鱼用于体外病原菌感染和铁离子应激, 选择 20 尾体质量为 180~220 g 的尼罗罗非鱼用于头肾巨噬细胞的分离^[36-38]。饲养期间, 每天投喂鱼体质量 10% 的浮性罗非鱼饲料 (通威股份有限公司), 每日监测水温, 循环系统水温控

制在 (26±2) °C, 水体透明度保持在 25~35 cm, 水质 pH 控制在 7.5~8.0。保持适当的氧气溶解度, 并定期检查硫化氢和亚硝酸盐的含量。

实验动物的饲养与处理严格遵守华南师范大学科学研究伦理专门委员会的管理条例, 并尊重动物研究中的伦理学问题^[39]。实验开始前, 将尼罗罗非鱼在养殖系统水环境中饲养至少 3 周, 使其充分适应新的生长环境, 保证机体各项指标处于稳定状态。

实验开始时使用 40 mg/L MS-222(Aladdin, 美国)对尼罗罗非鱼进行麻醉。参照已有研究采集尼罗罗非鱼外周血、皮肤、肌肉、鳃、胸腺、肝脏、脾脏、肠、头肾和后肾等 10 个组织^[40], 每个时间点采集 3 尾尼罗罗非鱼的组织样本, 每尾鱼的每个组织样本取 3 份作为备用。获取的组织样本迅速放入液氮中冷冻, 待取样工作完成后, 将所有组织样品转移至-80 °C 冰箱中储存备用。

1.2 病原菌培养与尼罗罗非鱼应激

实验用无乳链球菌 (ZQ0910) 由广东海洋大学赠送, 嗜水气单胞菌 (BYK00810) 由上海海洋大学赠送, 关于病原菌的活性以及半致死浓度在前期研究中已经报道^[15, 41-42], 病原菌储存于本实验室-80 °C 冰箱内。实验开始前, 提前准备好无菌的脑-心浸萃液体培养基与 LB 液体培养基, 将冻存保种的菌株按照 1 : 100 倍的体积比接种在新鲜的培养基内, 于 30 °C 恒温摇床内以 180 r/min 的转速培养至 OD_{600 nm} 处的吸光值达到 0.6~1.0, 活化成功后将病原菌转移至 50 mL 离心管内, 加入 20 mL 相对应的培养基继续振荡培养, 使用比浊仪对病原菌的浓度进行测定。

病原菌感染对 *Onhvj* 表达量的影响。对照组尼罗罗非鱼以 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 按照 100 μL/尾的剂量进行腹腔注射, 实验组将活化好的无乳链球菌或嗜水气单胞菌提前重悬在 10 mmol PBS 溶液中, 并将浓度调节至 1×10⁷ CFU/mL, 按照 100 μL/尾的剂量进行腹腔注射。在感染后的 3、6、12、24、48 和 72 h 随机选取 3 尾实验鱼分别收集组织样本。

铁离子浓度对 *Onhvj* 表达量的影响。对照组尼罗罗非鱼以 10 mmol/L PBS 按照 100 μL/尾的剂量进行腹腔注射, 实验组同样以 100 μL/尾的剂量分别注射 1 μmol/L 和 10 μmol/L 的 FeCl₃ 溶液。在应激后的 12、24、48 和 72 h 每个时间点随机选

取 3 尾实验鱼分别收集组织样本, 每个组织样本取 3 份作为备用。

1.3 RNA 提取与 cDNA 合成

本实验通过 TRIzol (Thermo, 美国) 裂解法提取尼罗罗非鱼各组织总 RNA。取适量组织加入 200 μL TRIzol 试剂后用电动匀浆器充分研磨成组织匀浆, 再加入 800 μL TRIzol 试剂, 在冰浴中静置 10 min 后以 12 000 r/min 于 4 °C 离心 10 min, 吸取上清液至新的无 RNA 酶离心管中, 加入 300 μL 三氯甲烷 (氯仿), 充分振荡混匀后在冰浴中静置 10 min, 按照以上的步骤再次离心。吸取上层水相, 向水相中加入 500 μL 异丙醇后轻轻混匀, 静置后离心。弃去上清液, 向沉淀中加入浓度为 75% 的无水乙醇, 上下颠倒悬浮沉淀对 RNA 进行清洗, 离心后弃去上清液, 重复该步骤洗涤 2 次。最后一次离心结束后, 弃掉酒精并敞开盖子, 室温下使酒精充分挥发, 加入适量的 DEPC 水溶解沉淀。使用 NanoDrop 2000 微量分光光度计检测 RNA 的浓度, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 将 RNA 样本保存于-80 °C 以备长期使用。使用 PrimeScriptTM RT 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 以组织总 RNA 合成 cDNA 模板。实验步骤按照 cDNA 合成试剂盒说明书执行, 获得的模板保存在-20 °C 备用, 用于实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的模板需要在原始浓度上进行 10 倍稀释。

1.4 *Onhvj* 的序列扩增

在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中获得 *Onhvj* 的预测序列 (XM_025911358.1), 基于该序列信息使用 Primer premier 5.0 软件设计扩增引物。PCR 反应总体系为 25 μL, 其中包括 LA Taq Mix 12.5 μL (TaKaRa, 日本)、ddH₂O 7.5 μL、上下游引物各 1 μL 及模板 3 μL, 以肝脏 cDNA 作为模板。PCR 反应: 预变性 95 °C 3 min; 变性 95 °C 30 s, 退火 64 °C 30 s, 延伸 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 反应产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 目的基因片段以琼脂糖凝胶试剂盒进行回收 (天根生化科技北京有限公司) 并连接到 pMD-18T 载体上 (TaKaRa, 日本)。连接产物转化到 Top10 感受态细胞中, 涂布于含有氨苄的 LB 固体培养平板上于 37 °C 倒置培养 12~14 h, 阳性克隆菌株通过北京六合华

大基因科技有限公司进行测序并分析。基因扩增需要的所有引物见表1。使用Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 程序分析了 *Onhvj* 潜在的开放阅读框。用 ExPASy 工具 (<http://expasy.org/tools/>) 将核苷酸翻译成氨基酸序列, 并对氨基酸序列进行分析。通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) 程序对核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行相似性分析。OnHJV 序列结构域位置使用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan>) 程序预测, 使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 网站对铁调素调节蛋白信号肽进行预测。MEGA 6 程序用于基于氨基酸序列的 Clustal X 比对构建系统发育树。

1.5 qRT-PCR

通过 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 系统 (Life Technologies, 美国) 检测健康鱼和病原菌感染后尼罗罗非鱼不同组织中 *Onhvj* 表达量的动态变化。PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 10 μ L TaKaRa Ex Taq™ SYBR premix, 4 μ L 稀释的 cDNA, 上下游引物各 2 μ L (2 μ mol/L), 1.5 μ L ddH₂O (Invitrogen, 美国), 0.5 μ L ROX Dye II 染料 (TaKaRa, 日本)。PCR 程序为 95 °C 变性 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。使用罗非鱼 *β -actin* 作为内参基因, 通过与各自的对照组进行比较, 利用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算 *Onhvj* 相对表达水平^[43], 定量表达数据表示为平均值 \pm 标准偏差 (SD)。

1.6 单核/巨噬细胞与肝细胞的分离和应激

尼罗罗非鱼头肾单核/巨噬细胞的分离方法

表 1 本研究中使用的引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物 primers	序列 (5'-3') sequence (5'-3')	目的 purpose
qOnHvj-F	GCCACAGTCCTACCAAAATCA	qRT-PCR
qOnHvj-R	CCACTCGCCGCTCCACATCG	
OnHvj-F	ATCCACCTGACTCTGCTGC	序列扩增
OnHvj-R	TGCTAAGAGTTCCTCCAAAATG	
M13-F	TGTA AACGACGGCCAGT	测序分析
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC	
<i>β-actin</i> -F	CGAGAGGGAAATCGTGCGTGACA	qRT-PCR
<i>β-actin</i> -R	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGGGC	

参考已有文献^[35-37]。实验前先用 10 mL 31% percoll 细胞分离液轻缓叠加在 10 mL 54% percoll (Sigma, 美国) 上配置成不同浓度的细胞分离液, 以 L-15 基础培养基配成含 1% 青霉素/链霉素和 10% 胎牛血清 (FBS) 的细胞培养基, 并通过 0.22 μ mol/L 无菌滤网除去细菌。采取尼罗罗非鱼的头肾组织并在无菌培养皿中捣碎成组织匀浆, 将细胞悬浮液轻轻叠加到细胞分离液上。在 500 \times g 4 °C 下离心 40 min 后, 收集 31% 和 54% percoll 界面的细胞, 加入培养基稀释至 5 \times 10⁶个/mL, 按照 100 μ L/孔培养于 96 孔细胞培养板中 (Thermo, 美国)。3 d 后去除非贴壁细胞, 用 10 mL 1640 基础培养基洗涤 3 次。使用培养基将细胞浓度稀释至 1 \times 10⁶个/mL, 按照 100 μ L/孔的量继续培养于 96 孔细胞板中。

尼罗罗非鱼肝细胞的分离和原代培养同样参照已有文献^[44]。将麻醉好的尼罗罗非鱼通体喷洒 75% 的乙醇进行消毒后置于超净工作台内, 并小心地切除肝脏组织。选择 0.5 g 的肝脏样本转移到无菌培养皿中, 并用无菌 PBS 清洗 2 次。将肝脏切成小块, 在室温下用含有 0.2% EDTA (Gibco, 美国) 的 15 mL 胰蛋白酶进行酶解^[35], 在 25 °C 的温度下用恒温振荡器在 80 r/min 下孵育 30 min。将细胞悬液转移至 50 mL 无菌离心管中加入 2 mL FBS 终止酶解反应。500 \times g 4 °C 离心 5 min, 收集沉淀细胞, 并用 1640 基础培养基洗涤 3 次, 最后一次洗涤后, 将细胞重新悬浮在 DMEM 培养基 (Gibco, 美国) 中, 用 0.4% 台盼蓝测定细胞的数量和活力。向 DMEM 基本培养基中加入 10% FBS、1% 青霉素/链霉素和 1% L-谷氨酰胺配置培养基, 并用该培养基将分离得到的肝细胞稀释至 5 \times 10⁶个/mL, 并于 24 孔培养板 (Thermo, 美国) 中, 按 1 mL/孔的量进行培养。

病原菌对单核/巨噬细胞和肝细胞中 *Onhvj* 表达量的影响。实验组用无乳链球菌和嗜水气单胞菌 (终浓度为 1 \times 10⁷ CFU/mL) 对细胞进行体外应激, 病原菌提前使用 1% 的甲醛溶液振荡培养 3 d 进行灭活, 并通过涂板检验, 保证病原菌的灭活效果。对照组用无菌 PBS 处理, 应激后的细胞在 25 °C 细胞培养箱内静置培养。在应激后的 3、6、12、24、48 和 72 h 收集细胞。

铁离子浓度对单核/巨噬细胞和肝细胞中 *Onhvj*

表达量的影响。实验组用 1 μmol/L 和 10 μmol/L FeCl₃ 应激, 对照组用无菌 PBS 处理, 培养方式与细胞收集时间参照以上步骤。

1.7 重组罗非鱼白介素 6 蛋白 [(r) OnIL-6] 调节 *Onhvj* 的表达

为了探究 *Onhvj* 在炎症反应中的重要性, 实验组以 5 μg/mL (r)OnIL-6 体外应激尼罗罗非鱼头肾单核/巨噬细胞, 对照组用空载蛋白 (Trx) 或无菌 PBS 溶液处理。应激后的 3、6、12、24、48 和 72 h 收集头肾巨噬细胞, 检测 *Onhvj* 相对表达量的动态变化趋势。以尼罗罗非鱼 β-actin 为内参, 并以 2^{-ΔΔC_t} 方法^[41] 计算相对表达量。

1.8 实验数据统计分析

所有实验重复执行 3 次, 收集实验数据进行统计学分析。数据分析方法是通过 SPSS 17.0 进行单向 ANOVA 分析, 同时伴随 Tukey 测试和

T 检验。数据表示为平均值±标准偏差 (SD)。统计显著性以字母和星号 (*P<0.05, **P<0.01) 表示。所有图表均由 GraphPad 17.0 软件绘制。

2 结果

2.1 *Onhvj* 序列分析

Onhvj 的编码区全长为 1 248 bp, 编码 415 个氨基酸 (aa)。氨基酸结构中包含一个由 27 个氨基酸组成的信号肽序列, 2 个 RGM 结构域, 分别为 RGM-N 与 RGM-C (图 1)。

同时 OnHJV 与许多物种的铁调素调节蛋白同源性较高 (图 2-a)。以 Swiss-Model 软件绘制尼罗罗非鱼铁调素的三维结构模拟图 (图 2-b)。结果显示, 尼罗罗非鱼铁调素调节蛋白由 1 条肽链盘曲折叠形成, 斑马拟丽鱼 (*Maylandia zebra*) HJV 的同源性最高。HJV 序列在不同物种中高度保守, 罗非鱼铁调素调节蛋白的氨基酸序列与人、小



图 1 OnHJV 的核酸序列与氨基酸序列

其中阴影部分为信号肽; 单下划线部分为 RGM-N 结构域; 双下划线部分则为 RGM-C 结构域; -表示终止密码子; 红色 M. 起始因子

Fig. 1 The nucleotide and amino acid sequences of OnHJV

The shaded area indicated the signal peptide; the single underlined part indicated the the RGM-N domain; the double underlined part indicated the RGM-C domain; - indicated the termination codon; red M. initiation factor

鼠、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、斑马鱼以及斑马 54.78% 和 95.69% (图 2-c)。拟丽鱼的同源性分别为 45.94%、44.76%、43.71%、

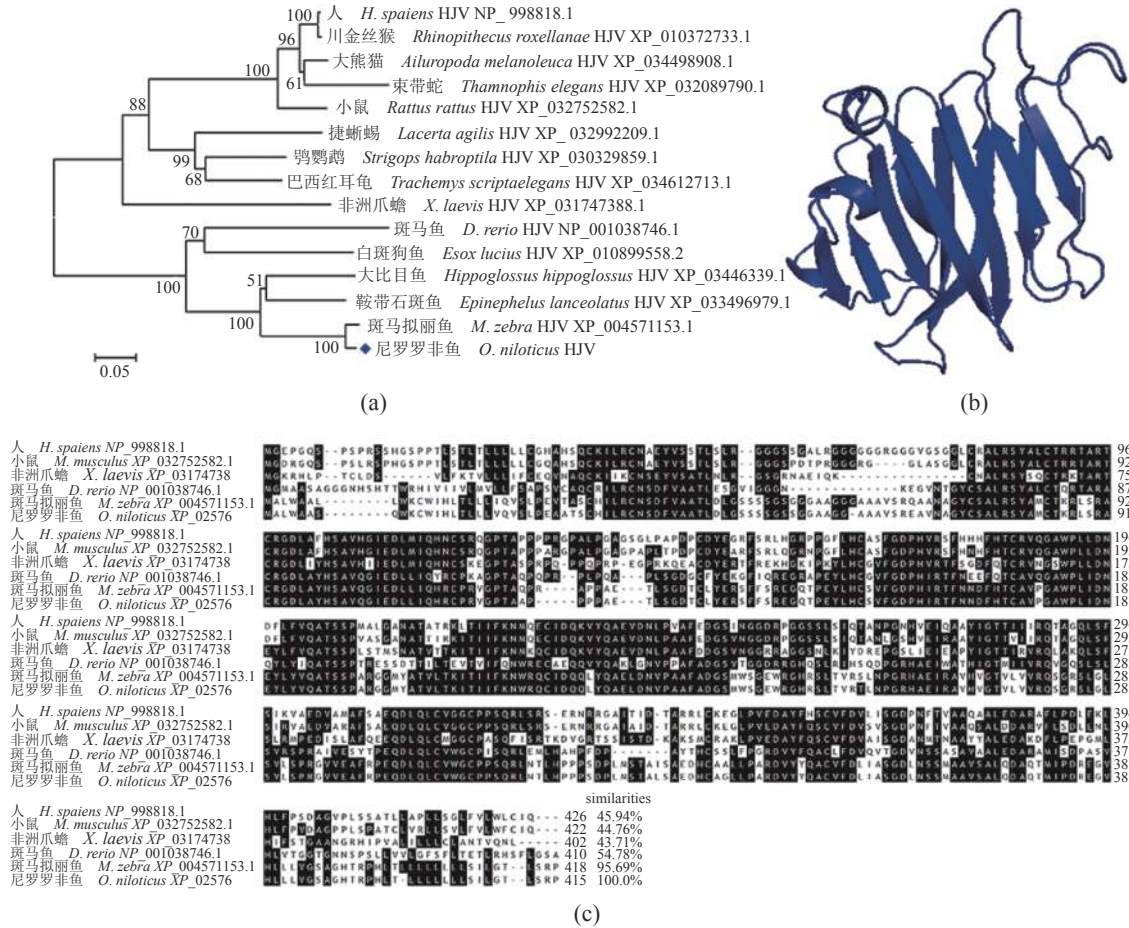


图 2 OnHJV 氨基酸序列的进化树分析 (a)、三级结构预测 (b) 和物种间氨基酸序列保守性比对 (c)

(a) 基于 Clustal W 方法进行的 15 个铁调素调节蛋白成员的比对, 以 NJ 方法构建的铁调素调节蛋白家族成员的系统发育树, 每个分支处的数字表示 1 000 次重复的百分比引导值

Fig. 2 The analysis of evolutionary tree (a), the prediction of tertiary structure (b) and conservative alignment (c) of HJV amino acid sequences in different species

(a) Phylogenetic tree of hemojuvelin family members constructed using the NJ method by MEGA 6.0 program based on the alignment of 15 members of hemojuvelin performed with the Clustal W method, numbers at each branch indicate the percentage bootstrap values on 1 000 replicates

2.2 Onhvj 组织分布模式

通过 qRT-PCR 检测健康尼罗罗非鱼组织中 Onhvj 分布模式。结果表明, Onhvj 在 10 个被检测的组织中广泛表达分布。其中, 肝脏组织中 Onhvj 表达量最高, 其次是外周血、肠、鳃、后肾、脾脏、胸腺、皮肤、头肾和肌肉。在肝脏中, Onhvj 表达量比肌肉中的高约 80 倍 (图 3)。

病原菌感染对 Onhvj 表达量影响的结果显示, 在无乳链球菌或嗜水气单胞菌感染后, 肝脏、脾脏、肠和鳃 4 个组织中 Onhvj 表达量均出现显著上调, 并且 2 种病原菌对 Onhvj mRNA 表达量

的上调基本都在感染后的相同时间点达到高峰。其中肝脏和脾脏中 Onhvj 的表达量在感染后 6 h 达到峰值 (图 4-a, b), 肠中 Onhvj 表达量在 12 h 达到峰值 (图 4-c), 鳃中 Onhvj 的表达量在 24 h 达到峰值 (图 4-d)。但这种感染现象在出现显著上升后的一段时间内开始下降, 尤其在肝脏、脾脏、肠中的 Onhvj 表达量在感染后的 72 h 与对照组的表达大水平不存在显著差异。鳃中 Onhvj 的表达量在感染后的 72 h 仍处于一个较高的水平。所有组织在无乳链球菌感染后的 Onhvj 表达水平要显著高于嗜水气单胞菌感染组的变化趋

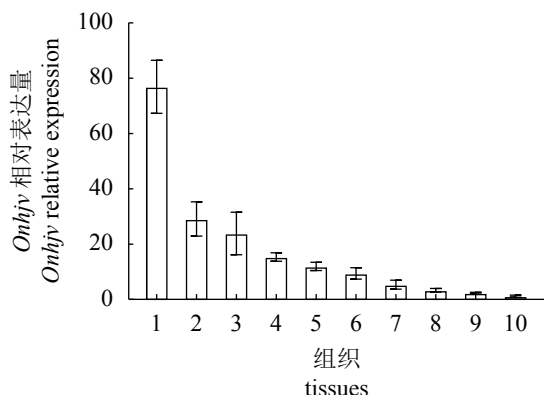


图3 健康尼罗罗非鱼 *Onhvj* mRNA 的组织分布

1. 肝脏, 2. 外周血, 3. 肠, 4. 鳃, 5. 后肾, 6. 脾脏, 7. 胸腺, 8. 皮肤, 9. 头肾, 10. 肌肉; 图中显示的组织中 *Onhvj* 表达量是相对于肌肉计算的, 以 β -肌动蛋白为基准计算得出; 结果是3个重复样品的平均值 \pm 标准差

Fig. 3 Tissue distribution of *Onhvj* mRNA in healthy *O. niloticus*

1. liver, 2. peripheral blood, 3. intestines, 4. gills, 5. hind kidney, 6. spleen, 7. thymus, 8. skin, 9. anterior kidney, 10. muscle; the ratio refers to the gene expression in different tissues relative to that in muscle and target gene expression is normalized against β -actin, the results were mean \pm SD of three replicate samples

势 ($P < 0.05$)。所有组织中 *Onhvj* 表达量的变化趋势呈先上升后下调的特点。

此外, 通过向腹腔中注射 $1 \mu\text{mol/L}$ 与 $10 \mu\text{mol/L}$ FeCl_3 溶液的方式应激尼罗罗非鱼, 分析应激后 *Onhvj* 的表达量。结果显示, 以 $1 \mu\text{mol/L}$ FeCl_3 应激后, 肝脏中 *Onhvj* 表达量有所上调, 并在应激后 48 h 达到峰值 ($P < 0.05$); 而以 $10 \mu\text{mol/L}$ FeCl_3 应激后, *Onhvj* 的表达量上升较快并在 12~24 h 达到峰值 (图 5-a)。 $1 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ FeCl_3 应激后, 脾脏中 *Onhvj* 表达量有所上调, 并都在应激后 48 h 达到峰值, 但 $10 \mu\text{mol/L}$ FeCl_3 处理并未使 *Onhvj* 的表达量出现浓度依赖性的显著上调 (图 5-b)。以 $1 \mu\text{mol/L}$ FeCl_3 应激后, 肠中 *Onhvj* 表达量在 24 h 达到峰值; 以 $10 \mu\text{mol/L}$ FeCl_3 应激后, 且同样在应激后 24 h 达到峰值 (图 5-c)。然而, 鳃中 *Onhvj* 表达量并未在这 2 种浓度 FeCl_3 溶液应激下出现显著性的表达上调 (图 5-d)。

2.3 *Onhvj* 体外表达分析

利用 qRT-PCR 分析体外病原菌应激后, 单核/巨噬细胞及肝细胞中 *Onhvj* 表达量的变化趋势。结果表明, 在无乳链球菌及嗜水气单胞菌

体外应激后, 单核/巨噬细胞的 *Onhvj* 表达均出现显著上调, 其表达量在应激后 3~24 h 逐渐升高, 并在 24 h 达到峰值 (图 6-a, $P < 0.05$)。肝细胞在无乳链球菌及嗜水气单胞菌应激后, 其 *Onhvj* 表达量的变化趋势与体外单核/巨噬细胞规律相似, 但其表达量的峰值出现在应激后的 12 h (图 6-b, $P < 0.05$)。2 种病原菌刺激后的 *Onhvj* 在细胞中的表达模式均呈现先上升, 后下降的变化趋势。

通过腹腔注射 $1 \mu\text{mol/L}$ 与 $10 \mu\text{mol/L}$ FeCl_3 应激罗非鱼后, 分析单核/巨噬细胞和肝细胞中 *Onhvj* 表达量的动态变化。结果表明, *Onhvj* 表达水平在 $1 \mu\text{mol/L}$ FeCl_3 应激后 12 h 出现显著上调, 并在 48 h 达到峰值; 另外 $10 \mu\text{mol/L}$ FeCl_3 应激后也于 48 h 达到峰值 (图 7-a, $P < 0.05$)。肝细胞中 *Onhvj* 表达水平分析表明, 铁离子浓度对 *Onhvj* 表达量上调的效果并不显著; 尽管整个应激过程中出现了 *Onhvj* 表达量的升高, 但是未呈现出明显的变化规律和显著的铁离子浓度依赖性 (图 7-b)。

2.4 炎症因子对 *Onhvj* 表达水平的调节作用

OnIL-6 因子是代表性的炎症因子, 本研究采用重组 OnIL-6 [(r)OnIL-6] 蛋白应激罗非鱼头肾单核/巨噬细胞, 来分析其对细胞中 *Onhvj* 表达量的调节作用。结果表明, (r)OnIL-6 在 $5 \mu\text{g/mL}$ 浓度下可以在体外显著上调头肾单核/巨噬细胞 *Onhvj* 的表达量, 并且在应激后的 12 h 达到峰值, 其表达量比 PBS 对照组增加了约 45 倍。随后呈现出下降趋势, 在 (r)OnIL-6 蛋白应激后的 72 h, *Onhvj* mRNA 的表达量与对照组相比不具备显著性差异。研究发现 Trx 空载蛋白对 *Onhvj* 的表达量上升也产生了影响, 但是这种影响显著低于 (r)OnIL-6 蛋白所发挥的作用效果 ($P < 0.05$)。以上结果充分表明, 炎症因子 IL-6 对 *Onhvj* 的表达量具有显著上调作用, 推测 *Onhvj* 在炎症反应中可能发挥作用 (图 8)。

3 讨论

铁调素调节蛋白 (HJV) 是排斥性指导分子 (RGM) 家族的成员之一, 可以诱导铁调素 (hepcidin) 的表达, 在调节铁稳态和免疫过程中发挥重

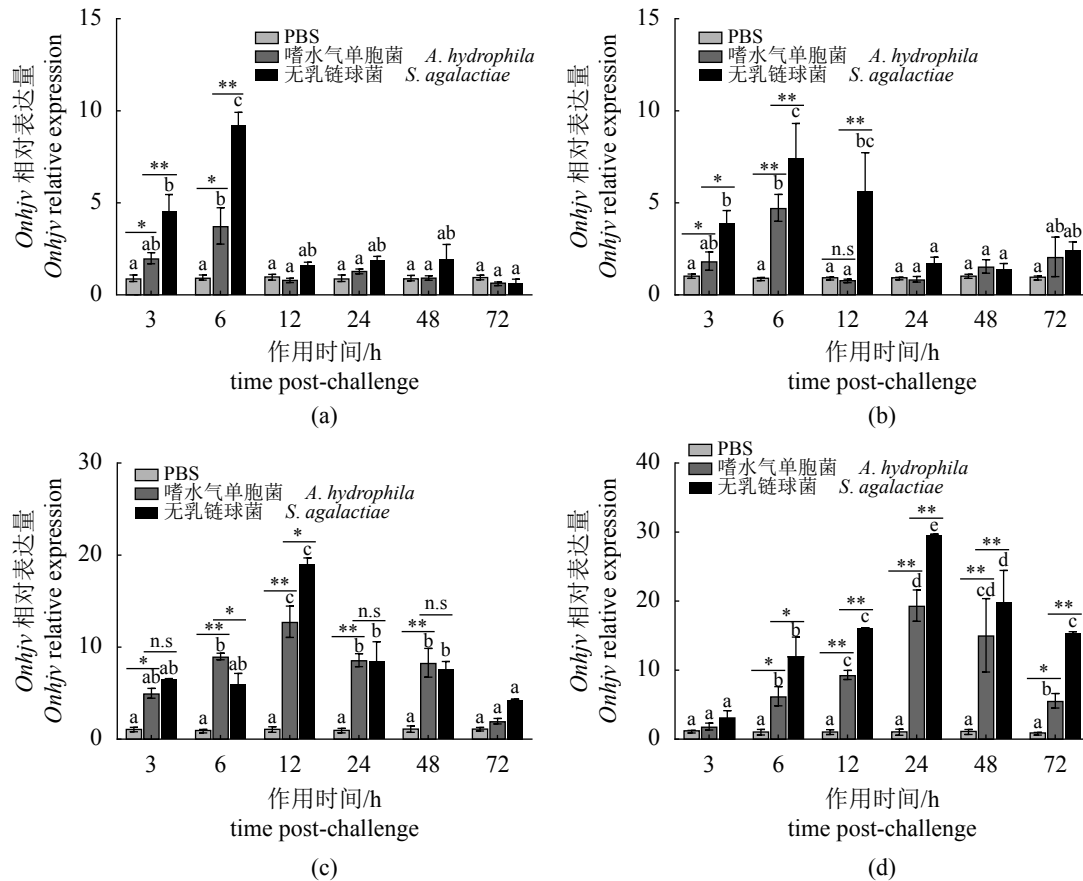


图4 无乳链球菌与嗜水气单胞菌感染后尼罗罗非鱼肝脏 (a)、脾脏 (b)、肠 (c) 和鳃 (d) 中 *Onhvj* 的相对表达量 *Onhvj* 表达量是以 β -肌动蛋白为内参基因, 表达量的倍数变化以 PBS 对照组作为标准; 误差线表示标准方差 ($n=3$), 显著性用星号标注 (* $0.01 \leq P < 0.05$, ** $P < 0.01$); 不同字母表示组内差异显著, n.s. 表示组间不存在显著性差异; 下同

Fig. 4 Temporal mRNA expression of *Onhvj* transcripts in the liver (a), spleen (b), intestine (c) and gills (d) of *O. niloticus* after *S. agalactiae* and *A. hydrophila* challenges

The mRNA level of *Onhvj* gene was normalized to that β -actin and fold units were calculated deciding the values of the vaccinated tissues by PBS; the error bars represent standard deviation ($n=3$) and significant difference was indicated by asterisks (* $0.01 \leq P < 0.05$, ** $P < 0.01$); different letters indicate significant differences within group, n.s. indicate no significant difference between the groups; the same below

要作用^[12-13,18]。HJV 会受到 HFE、TFR2 和 TMPRSS 6 等蛋白的调节^[22-24]。HJV 功能的异常造成与铁过载相关的疾病, 如青少年血色素沉着症、促红细胞增多症等。但是, 目前关于 HJV 在硬骨鱼免疫功能方面的研究则鲜有报道。本研究扩增了尼罗罗非鱼 *hemojuvelin* 的基因序列, 翻译后的氨基酸序列比对结果表明, HJV 在众多物种中相对保守。组织分布的结果显示, *Onhvj* 广泛分布于健康尼罗罗非鱼各组织中, 其在肝脏中表达最高, 与人和小鼠中 *hvj* 的分布模式相一致, 这可能与 *hvj* 在进化过程中功能上的适应性存在一定联系^[13,45]。

在硬骨鱼中, 肝脏是铁调素合成的主要部位^[46], 而 HJV 主要在肝脏中作为 BMP6 的共受体通过 BMP 信号传导途径促进铁调素的表达。脾

脏是重要的淋巴器官, 也是重要免疫细胞包括 B 细胞、T 细胞和巨噬细胞成熟和发挥功能的主要场所, 在抵抗病原体感染的免疫反应中发挥重要作用^[47-48]。肠是鱼类重要的黏膜免疫器官, 同时也是铁吸收和运输的主要器官^[8, 49-50]。另外, 鳃是具有较大黏膜面积的免疫组织, 在气体交换、维持电解质和酸碱平衡中起重要作用^[51]。因此, 探讨尼罗罗非鱼经无乳链球菌和嗜水气单胞菌感染后 *Onhvj* 表达量的动态变化规律时, 选择了肝脏、脾脏、肠和鳃等 4 个组织。研究结果表明, 病原菌感染后上述 4 个组织中的 *Onhvj* 表达量均出现显著上调, 表明 *Onhvj* 可能参与机体抵抗病原菌侵染的过程。本研究中同时选用无乳链球菌和嗜水气单胞菌对尼罗罗非鱼进行体外感染, 主要涉及以下两个原因, 其一为无乳

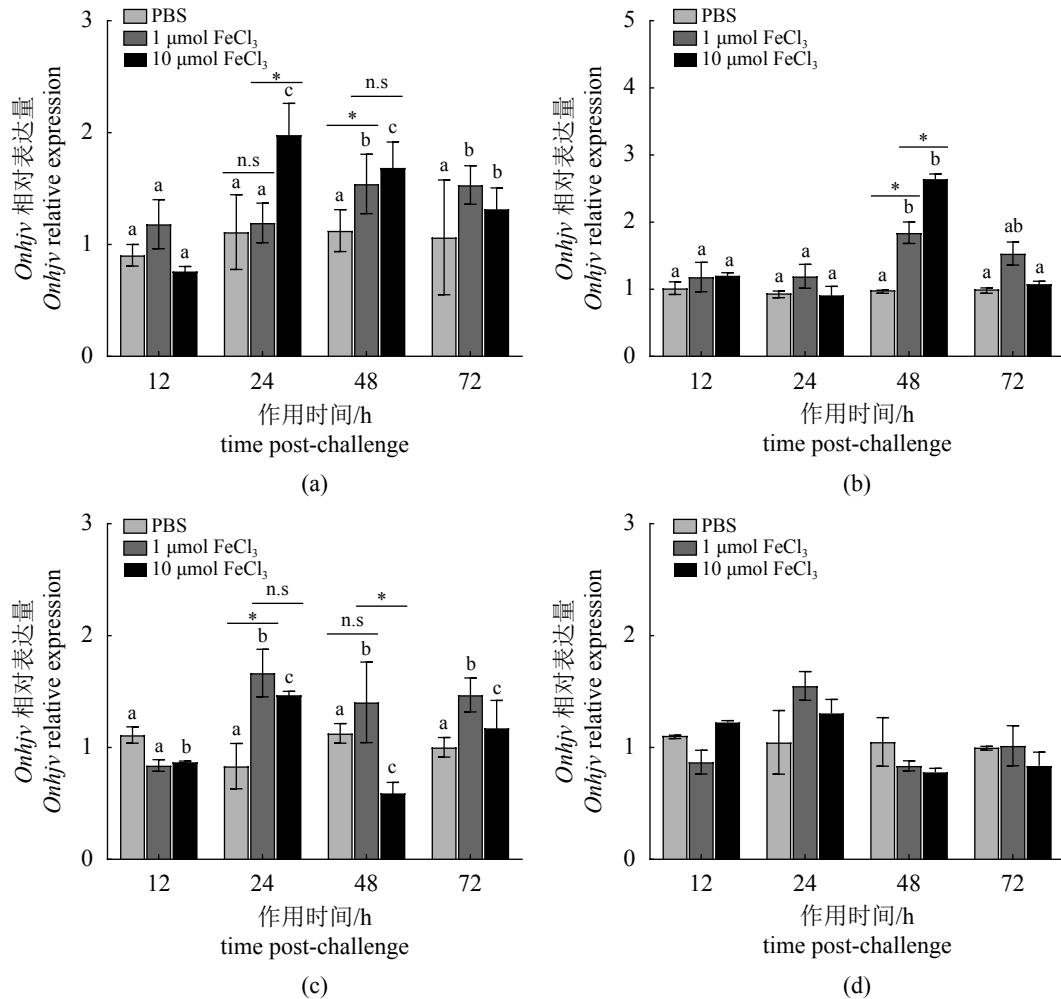


图 5 1 μmol/L 和 10 μmol/L FeCl₃ 应激后, 肝脏 (a)、脾脏 (b)、肠 (c) 和鳃 (d) 中 *Onhvj* 的相对表达量

Onhvj 表达量以 β -actin 为内参基因, 表达量的倍数变化以 PBS 对照组作为标准; 下同

Fig. 5 Temporal mRNA expression of *Onhvj* transcripts in the liver (a), spleen (b), intestine (c) and gills (d) after 1 μmol/L and 10 μmol/L FeCl₃ challenges

The mRNA level of *Onhvj* gene was normalized to that β -actin and fold units were calculated deciding the values of the vaccinated tissues by PBS; the same below

链球菌是典型的革兰氏阳性菌, 而嗜水气单胞菌是典型的革兰氏阴性菌, 以二者作为代表性菌株进行研究有助于我们分析不同属性的病菌在引起尼罗罗非鱼细菌疾病上是否存在典型的差异。其二为无乳链球菌一直被认为是引起尼罗罗非鱼细菌性疾病的主要病原菌, 在早期研究中已经有大量相关报道, 本实验室也一直从事相关工作的研究^[35-38], 证实无乳链球菌感染会引起尼罗罗非鱼出现炎性浸润、组织坏死、严重时会导致罗非鱼死亡等现象^[52]。此外, 近些年关于嗜水气单胞菌引起尼罗罗非鱼细菌疾病方面的研究工作也在逐渐展开^[53-55], 研究均指出, 嗜水气单胞菌作为革兰氏阴性菌同样可以激活

尼罗罗非鱼免疫系统, 感染嗜水汽单胞菌较严重的情况下同样也会引起尼罗罗非鱼死亡等现象^[52]。比较 2 种病原菌感染后的不同组织中 *Onhvj* 的表达模式发现, 二者的作用效果存在一定的差异, 无乳链球菌的作用效果更加显著, 作用效果也更加持久, 在感染后期组织中的相对表达量要明显高于嗜水气单胞菌组。此外, 经 1 μmol/L 和 10 μmol/L FeCl₃ 溶液刺激后 *Onhvj* 的表达也呈现上调趋势, 说明 *Onhvj* 在调节机体铁平衡的过程中发挥作用^[56]。但通过比较发现, 高浓度 10 μmol/L FeCl₃ 应激后 *Onhvj* 峰值表达量仅比低浓度 1 μmol/L 的增加了约 1 倍, 表明 *Onhvj* 在铁过载的情况下保持一个相对稳定的变化范

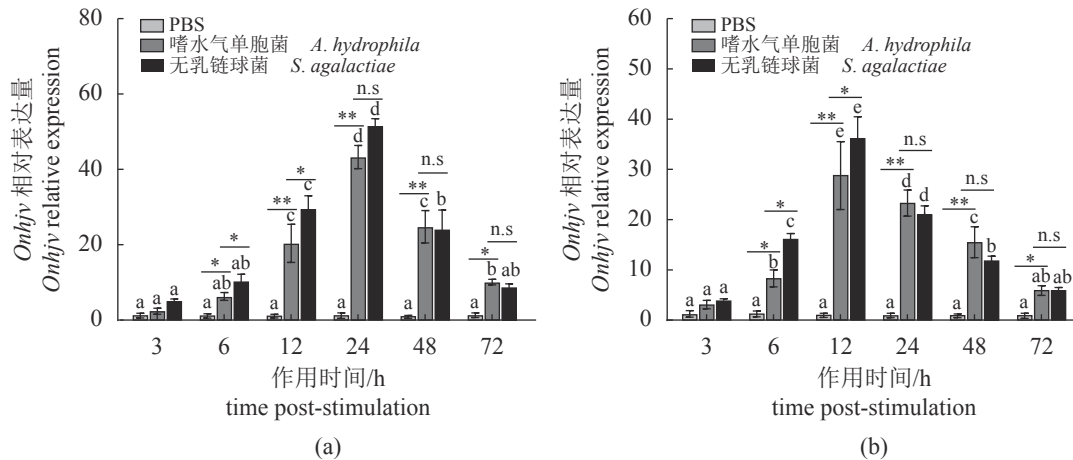


图 6 无乳链球菌 (1×10^7 CFU/mL) 和嗜水气单胞菌 (1×10^7 CFU/mL) 应激后, 头肾单核/巨噬细胞 (a) 和肝细胞 (b) 中 *Onhjv* 的相对表达量

Fig. 6 The mRNA expression of *Onhjv* in head kidney monocytes/macrophages (a) and the hepatocytes (b) after being treated with *S. agalactiae* (1×10^7 CFU/mL) and *A. hydrophila* (1×10^7 CFU/mL)

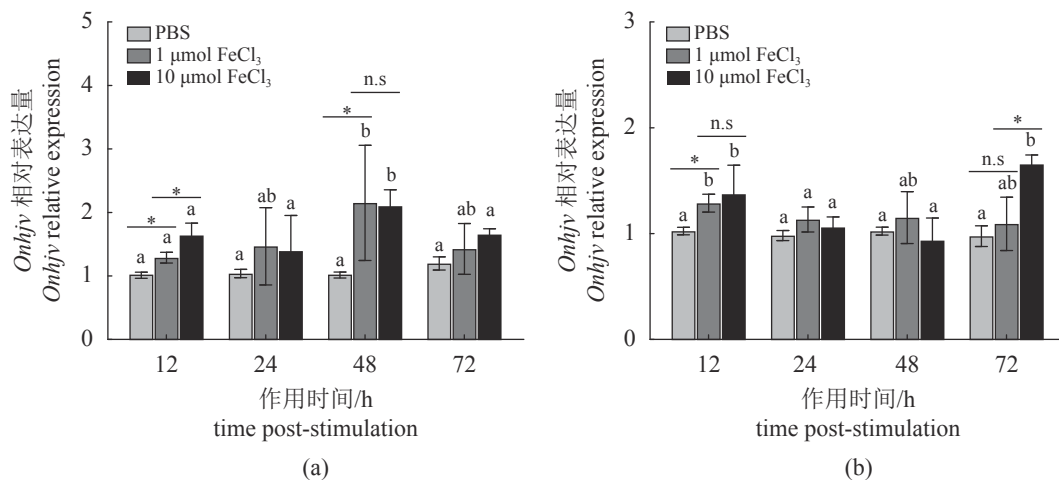


图 7 $1 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L FeCl}_3$ 应激后, 头肾单核/巨噬细胞 (a) 和肝细胞 (b) 中 *Onhjv* 的相对表达量

Fig. 7 The mRNA expression of *Onhjv* in head kidney monocytes/macrophages (a) and the hepatocytes (b) after being treated with $1 \mu\text{mol/L}$ and $10 \mu\text{mol/L FeCl}_3$

围, 不会出现铁离子浓度的强依赖性。因此, 推测机体铁离子的稳定很可能是通过 *hepcidin* 表达量的动态变化来实现迅速的调节^[15,57]。

单核/巨噬细胞在宿主抵御病原菌感染的先天免疫防御中具有重要作用, 在清除外界病原微生物, 抗原呈递和激活适应性免疫反应中具有重要作用^[58-59]。HJV 主要在肝脏中产生, 进而调节机体免疫及铁水平。在本研究中发现, 体外分离的尼罗罗非鱼单核/巨噬细胞和肝细胞中 *Onhjv* 的表达在经过病原菌应激后显著上调。尽管 2 种病原菌具有本质上的结构差异与生存方式

的不同, 但在体外应激的情况下, 都能够迅速显著上调 *Onhjv* 的表达; 我们推测, 这种短效、迅速的 *Onhjv* 的大量合成的主要作用是促进相关细胞合成铁调素, 在促进机体抵御和迅速清除病原菌方面具有重要作用。至于在清除革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌的作用机制上是否存在一定差异, 有待于进一步的深入探究。无论是体内感染和体外应激的细胞中 *Onhjv* 表达趋势都呈现先上升后下降的变化特点, 产生这种现象的原因可能是在抵御病原菌感染的急性阶段, *Onhjv* 的大量上调是为了促进机体更多的合成铁

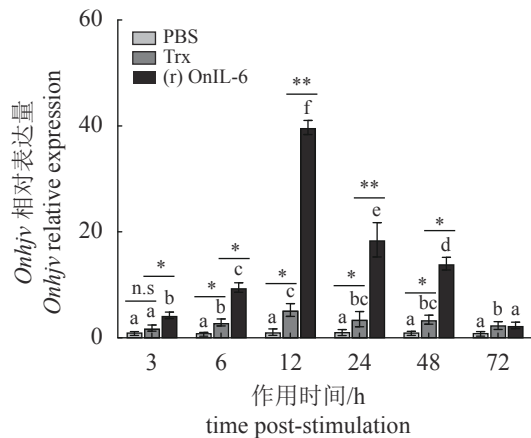


图 8 (r)OnIL-6 蛋白应激后, 头肾单核/巨噬细胞中 *Onhvj* 的相对表达量

阴性对照组用 Trx 蛋白处理, 空白对照组用等量 PBS 处理; *Onhvj* 表达量以 β -actin 为内参基因, 表达量的倍数变化以 PBS 对照组作为标准

Fig. 8 The mRNA expression of *Onhvj* in head kidney monocytes/macrophages after treated with (r)OnIL-6 protein

The negative control group was treated with Trx protein and the blank control group was treated with equal quantity PBS; the mRNA level of *Onhvj* gene was normalized to that β -actin and fold units were calculated deciding the values of the PBS treated cells

调素, 以实现维持铁离子平衡和抵御病原菌感染的作用。当铁调素的含量达到一定稳定状态时, 不再需要大量合成铁调素调节蛋白, *Onhvj* mRNA 的表达量开始下调。此外, 单核/巨噬细胞 *Onhvj* 表达水平对铁离子应激也具有一定的敏感度。单核/巨噬细胞和肝细胞在鱼类的先天免疫和调节铁稳态中至关重要, *Onhvj* 表达响应细菌感染和铁超负荷的研究结果符合理论预期^[20,60]。

IL-6 是一种多功能细胞因子, 在炎症、代谢和再生中发挥重要作用, 例如中枢神经系统中 IL-6 水平升高与脑损伤或脑炎症相关的神经系统疾病有关^[61]。据报道, IL-6 是体内和体外 *hepcidin* 表达的主要诱导剂, 并发现 STAT3 是负责通过炎症期间的 IL-6 转导途径上调 *hepcidin* 的主要转录因子^[62]。研究表明, 抑制 *hvj* 会降低 *hepcidin* 表达, 但不影响 *hepcidin* 被 IL-6 诱导, 表明 IL-6 和 HJV 可独立发挥作用调节 *hepcidin* mRNA 的表达水平^[15]。本研究结果发现, (r)OnIL-6 可刺激诱导单核/巨噬细胞 *Onhvj* 表达量上升, 表明炎症反应可能促进 *Onhvj* 的表达, 从而发挥 OnHJV 在尼罗罗非鱼抵御病原菌侵染的先天免疫防御

中的作用。但是, 目前关于 HJV 在硬骨鱼抵御病原菌感染的先天免疫中的功能有待于进一步深入探究。

目前, 关于硬骨鱼铁调素调节蛋白的相关研究鲜有报道, 本研究首次在尼罗罗非鱼中开展了关于铁调素调节蛋白在抵御细菌感染方面相关功能的研究。以比较容易实现的 mRNA 水平的研究工作阐明 *Onhvj* 在尼罗罗非鱼抵御病原菌感染中具有重要作用。同时, 也意识到 mRNA 水平上的研究具有一定的局限性, 从 mRNA 到蛋白质的功能发挥具有一定时空上的差异性, 更多后续研究内容已经在本实验室展开。今后期待从 mRNA、蛋白质以及与 *Onhvj* 互作的分子及发挥相关作用的信号通路等全面揭示 HJV 在硬骨鱼类先天免疫防御中的重要作用。但本研究的重要意义也不可忽视, 研究证实受病原菌和 FeCl₃ 溶液刺激后, 尼罗罗非鱼体内和体外 *Onhvj* 表达量均出现显著上调, 表明 *hvj* 可能参与宿主抵御病原菌感染和调节铁平衡的过程。另外, 炎症因子 IL-6 参与调节 *Onhvj* 的表达, 并发挥显著的上调作用。以上研究结果为探讨 HJV 在硬骨鱼宿主防御中的功能提供了参考, 并有助于丰富 HJV 调控鱼类铁平衡的机制理论。

参考文献 (References):

- [1] Mu Q D, Chen L Y, Gao X T, *et al.* The role of iron homeostasis in remodeling immune function and regulating inflammatory disease[J]. *Science Bulletin*, 2021, 66(17): 1806-1816.
- [2] Nairz M, Dichtl S, Schroll A, *et al.* Iron and innate antimicrobial immunity-depriving the pathogen, defending the host[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2018, 48: 118-133.
- [3] Fleischhacker A S, Kiley P J. Iron-containing transcription factors and their roles as sensors[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, 15(2): 335-341.
- [4] Nakamura T, Naguro I, Ichijo H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2019, 1863(9): 1398-1409.
- [5] Wardman P, Candeias L P. Fenton chemistry: an introduction[J]. *Radiation Research*, 1996, 145(5): 523-531.
- [6] Ohgami R S, Campagna D R, Greer E L, *et al.* Identific-

- ation of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells[J]. *Nature Genetics*, 2005, 37(11): 1264-1269.
- [7] Fleming M D, Trenor C C III, Su M A, *et al.* Microcytic anaemia mice have a mutation in *Nramp2*, a candidate iron transporter gene[J]. *Nature Genetics*, 1997, 16(4): 383-386.
- [8] Gunshin H, Mackenzie B, Berger U V, *et al.* Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter[J]. *Nature*, 1997, 388(6641): 482-488.
- [9] Gomme P T, McCann K B, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions[J]. *Drug Discovery Today*, 2005, 10(4): 267-273.
- [10] Park C H, Valore E V, Waring A J, *et al.* Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(11): 7806-7810.
- [11] Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later[J]. *Blood*, 2011, 117: 4425-4433.
- [12] Nemeth E, Tuttle M S, Powelson J, *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization[J]. *Science*, 2004, 306(5704): 2090-2093.
- [13] Papanikolaou G, Samuels M E, Ludwig E H, *et al.* Mutations in *HFE2* cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis[J]. *Nature Genetics*, 2004, 36(1): 77-82.
- [14] Babitt J L, Huang F W, Wrighting D M, *et al.* Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression[J]. *Nature Genetics*, 2006, 38(5): 531-539.
- [15] Lin L, Goldberg Y P, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin[J]. *Blood*, 2005, 106(8): 2884-2889.
- [16] 刘宗涵, 袁慧美, 周越, 等. 铁调素调节蛋白研究进展及其在航天医学中的作用[J]. *航天医学与医学工程*, 2020, 33(4): 370-376.
- Liu Z H, Yuan H M, Zhou Y, *et al.* Advances in research of hemojuvelin and its role in space medicine[J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2020, 33(4): 370-376(in Chinese).
- [17] Chen W J, Huang F W, De Renshaw T B, *et al.* Skeletal muscle hemojuvelin is dispensable for systemic iron homeostasis[J]. *Blood*, 2011, 117(23): 6319-6325.
- [18] Schmidtmer J, Engelkamp D. Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick Rgm[J]. *Gene Expression Patterns*, 2004, 4(1): 105-110.
- [19] Siebold C, Yamashita T, Monnier P P, *et al.* RGMs: structural insights, molecular regulation, and downstream signaling[J]. *Trends in Cell Biology*, 2017, 27(5): 365-378.
- [20] Truksa J, Peng H F, Lee P, *et al.* Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(27): 10289-10293.
- [21] Chen J X, Chloupková M, Gao J W, *et al.* HFE modulates transferrin receptor 2 levels in hepatoma cells via interactions that differ from transferrin receptor 1-HFE interactions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(51): 36862-36870.
- [22] Goswami T, Andrews N C. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(39): 28494-28498.
- [23] D'Alessio F, Hentze M W, Muckenthaler M U. The hemochromatosis proteins HFE, Tfr2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation[J]. *Journal of Hepatology*, 2012, 57(5): 1052-1060.
- [24] Ganz T. Iron homeostasis: Fitting the puzzle pieces together[J]. *Cell Metabolism*, 2008, 7(4): 288-290.
- [25] Silvestri L, Pagani A, Nai A, *et al.* The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin[J]. *Cell Metabolism*, 2008, 8(6): 502-511.
- [26] Lanzara C, Roetto A, Daraio F, *et al.* Spectrum of hemojuvelin gene mutations in 1q-linked juvenile hemochromatosis[J]. *Blood*, 2004, 103(11): 4317-4321.
- [27] Tolosano E. Increasing serum transferrin to reduce tissue iron overload due to ineffective erythropoiesis[J]. *Haematologica*, 2015, 100(5): 565-566.
- [28] Core A B, Canali S, Babitt J L. Hemojuvelin and bone

- morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2014, 5: 104.
- [29] Yang F, West A P, Bjorkman P J. Crystal structure of a hemojuvelin-binding fragment of neogenin at 1.8Å[J]. *Journal of Structural Biology*, 2011, 174(1): 239-244.
- [30] Krijt J, Fujikura Y, Ramsay A J, *et al.* Liver hemojuvelin protein levels in mice deficient in matriptase-2 (Tmprss6)[J]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2011, 47(2): 133-137.
- [31] Neves J V, Caldas C, Wilson J M, *et al.* Molecular mechanisms of hepcidin regulation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 1154-1161.
- [32] Gibert Y, Lattanzi V J, Zhen A W, *et al.* BMP signaling modulates hepcidin expression in zebrafish embryos independent of hemojuvelin[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(1): e14553.
- [33] China fishery statistical yearbook fisheries and fisheries administration of the ministry of agriculture and rural affairs, prepared by the national fisheries technology extension station, China Fisheries Society China Agriculture Press, Beijing, 2019.
- [34] Ahmed S A A, Ibrahim R E, Farroh K Y, *et al.* Chitosan vitamin E nanocomposite ameliorates the growth, redox, and immune status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under different stocking densities[J]. *Aquaculture*, 2021, 541: 736804.
- [35] Gan Z, Wang B, Lu Y S, *et al.* Molecular characterization and expression of CD2BP2 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to *Streptococcus agalactiae* stimulus[J]. *Gene*, 2014, 548(1): 126-133.
- [36] Yin X X, Mu L L, Bian X, *et al.* Expression and functional characterization of transferrin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 530-539.
- [37] Mu L L, Yin X X, Yang Y J, *et al.* Functional characterization of a mannose-binding lectin (MBL) from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in non-specific cell immunity and apoptosis in monocytes/macrophages[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 265-274.
- [38] Yin X X, Mu L L, Li Y, *et al.* Identification and characterization of a B-type mannose-binding lectin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 91-99.
- [39] Ghasemi M, Dehpour A R. Ethical considerations in animal studies[J]. *Journal of Medical Ethics and History of Medicine*, 2009, 2: 12.
- [40] Mu L L, Yin X X, Liu J, *et al.* Identification and characterization of a mannose-binding lectin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 244-253.
- [41] Tang J F, Cai J, Liu R, *et al.* Immunostimulatory effects of artificial feed supplemented with a Chinese herbal mixture on *Oreochromis niloticus* against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 401-406.
- [42] Wang B, Jian J C, Lu Y S, *et al.* Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* ZQ0910, a pathogen causing meningoencephalitis in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(18): 5132-5133.
- [43] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [44] Zhang Z G, Li X B, Gao L, *et al.* An updated method for the isolation and culture of primary calf hepatocytes[J]. *The Veterinary Journal*, 2012, 191(3): 323-326.
- [45] Niederkofler V, Salie R, Arber S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(8): 2180-2186.
- [46] Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2006, 1763(7): 690-699.
- [47] Swirski F K, Nahrendorf M, Etzrodt M, *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites[J]. *Science*, 2009, 325(5940): 612-616.
- [48] Grove S, Johansen R, Reitan L J, *et al.* Immune and enzyme histochemical characterisation of leukocyte populations within lymphoid and mucosal tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(5): 693-708.

- [49] McKie A T, Barrow D, Latunde-Dada G O, *et al.* An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron[J]. *Science*, 2001, 291(5509): 1755-1759.
- [50] Andrews N C. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2000, 1(3): 208-217.
- [51] Olsen M M, Kania P W, Heinecke R D, *et al.* Cellular and humoral factors involved in the response of rainbow trout gills to *Ichthyophthirius multifiliis* infections: molecular and immunohistochemical studies[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(3): 859-869.
- [52] Yin X X, Li X Y, Chen N, *et al.* Hemopexin as an acute phase protein regulates the inflammatory response against bacterial infection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 187: 166-178.
- [53] Li J Q, Liang W, Li K, *et al.* ZAP70 activation is an early event of T cell immunity that involved in the anti-bacterial adaptive immune response of Nile tilapia[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 124: 104177.
- [54] Monir M S, Yusoff M S M, Zulperi Z M, *et al.* Immunoprotective efficiency of feed-based whole-cell inactivated bivalent vaccine against *Streptococcus* and *Aeromonas* infections in red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 113: 162-175.
- [55] Zhang Y, Li K, Li C, *et al.* An atypical KLRG1 in Nile tilapia involves in adaptive immunity as a potential marker for activated T lymphocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 113: 51-60.
- [56] Zhang A S, Anderson S A, Meyers K R, *et al.* Evidence that inhibition of hepcidin shedding in response to iron is mediated through neogenin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(17): 12547-12556.
- [57] Mohammad G, Matakidou A, Robbins P A, *et al.* The kidney hepcidin/ferroportin axis controls iron reabsorption and determines the magnitude of kidney and systemic iron overload[J]. *Kidney International*, 2021.
- [58] Furci L, Schena E, Miotto P, *et al.* Alteration of human macrophages microRNA expression profile upon infection with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *International Journal of Mycobacteriology*, 2013, 2(3): 128-134.
- [59] Zhang L G, Wang C, Liu H, *et al.* The important role of phagocytosis and interleukins for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to defense infection of *Aeromonas hydrophila* based on transcriptome analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 54-63.
- [60] Zhang J, Yu L P, Li M F, *et al.* Turbot (*Scophthalmus maximus*) hepcidin-1 and hepcidin-2 possess antimicrobial activity and promote resistance against bacterial and viral infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 38(1): 127-134.
- [61] Kishimoto T. IL-6: From its discovery to clinical applications[J]. *International Immunology*, 2010, 22(5): 347-352.
- [62] Verga Falzacappa M V, Vujic Spasic M, Kessler R, *et al.* STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation[J]. *Blood*, 2007, 109(1): 353-358.

Functional characterization of hemojuvelin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in host defense against bacterial infection and regulation of iron homeostasis

YIN Xiaoxue^{*}, QI Weiwei, MU Liangliang, WANG Anli, YE Jianmin^{*}

(Guangdong Key Laboratory of Aquaculture Health and Safety, Institute of Modern Aquaculture Science and Engineering, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: In order to study the role of *hemojuvelin* (*hvj*) in the process of resisting pathogen infection and maintaining its iron homeostasis in teleost fish, the present study amplified the open reading frame (ORF) of *Oreochromis niloticus hvj* (*Onhvj*), and analyzed its distribution pattern in various tissues of healthy tilapia and its related role in resisting pathogen infection and regulating iron homeostasis. The ORF of *Onhvj* was 1 248 bp, encoding 415 amino acids, which was conserved among different species. The results of quantitative real-time PCR (qRT-PCR) showed that *Onhvj* was widely distributed in all detected tissues of *O. niloticus*, and the highest expression level was found in liver. The expression of *Onhvj* was significantly up-regulated in the liver, spleen, intestine and gills after being challenged by *Streptococcus agalactiae* or *Aeromonas hydrophila*. The *Onhvj* expression in monocytes/macrophages (MO/M ϕ) and hepatocytes was also up-regulated after being stimulated by these two pathogens. In addition, the expression of *Onhvj* also showed an up-regulation trend in the liver, spleen, intestine, and gills, and head kidney MO/M ϕ and hepatocytes after stimulation with 1 $\mu\text{mol/L}$ or 10 $\mu\text{mol/L}$ FeCl₃ solution. After stimulation with recombinant *O. niloticus* IL-6 protein [(r)OnIL-6], the expression of *Onhvj* in head kidney MO/M ϕ was significantly up-regulated, indicating that inflammatory factors could promote the expression of *Onhvj*. In this study, the results indicate that the *hemojuvelin* in *O. niloticus* plays an important role in host resistance to pathogen infection and maintenance of iron homeostasis.

Key words: *Oreochromis niloticus*; hemojuvelin; pathogen bacteria; iron homeostasis; inflammatory factors

Corresponding authors: YIN Xiaoxue. E-mail: sheilayin@m.scnu.edu.cn;

YE Jianmin. E-mail: jmye@m.scnu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31902396, 31972818); China Postdoctoral Science Foundation (2019M652942)