



叶剑敏, 华南师范大学教授、博士研究生导师, 现任广东省水产健康安全养殖重点实验室主任, 广东省优质环保水产养殖工程技术研究中心主任。兼任中国水产学会鱼病专业委员会委员, 中国水产学会《水产学报》编委, *Frontiers in Immunology* 通讯编委和特刊主编, 广东水产学会常务理事, 入选国家海外高层次人才计划。目前主要从事水产经济动物免疫调控机制研究和健康养殖技术研发, 包括鱼类IgM抗体结构和功能的关系、免疫B细胞体液免疫记忆机制及水产动物生态防控技术等研究。发表国内外学术论文80多篇, 授权专利5项, 并主持和参与多项科技部、基金委及广东省科技厅项目。

尼罗罗非鱼鼠李糖凝集素 (RBL-1) 在非特异性细胞防御病原菌感染中的功能

木亮亮, 白皓, 李嘉东, 邱丽, 尹晓雪*, 叶剑敏*

(华南师范大学生命科学学院, 广东省水产健康与安全养殖重点实验室,
广东省水产优质环保养殖工程技术研究中心, 广东广州 510631)

摘要: 为了探究鼠李糖凝集素 (RBL) 在硬骨鱼非特异性细胞防御病原菌感染中的作用, 实验以尼罗罗非鱼为研究模型, 首先通过分离头肾单核/巨噬细胞进行体外菌应激实验, 结果发现, 尼罗罗非鱼在 2 种致病菌即无乳链球菌和嗜水气单胞菌应激后, 尼罗罗非鱼 *L*-鼠李糖凝集素 1 基因 (*Onrbl-1*) 的表达量显著上调。然后, 通过荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测发现, OnRBL-1 重组蛋白能够调节病原菌诱导细胞炎症因子的表达, 包括显著抑制细菌诱导的 *il-6*、*il-8* 和 *tnf-α* 的表达, 促进 *il-10* 和 *tgf-β* 的表达。此外, 通过流式细胞术检测证实 OnRBL-1 重组蛋白具有促进单核/巨噬细胞的吞噬作用, 同时增强呼吸爆发水平和上调活性氧的释放。以上研究表明, OnRBL-1 在尼罗罗非鱼单核/巨噬细胞炎症因子表达、吞噬作用、呼吸爆发和活性氧释放等非特异性细胞免疫防御中发挥调节作用。本研究为探讨 RBL-1 在硬骨鱼宿主防御病原菌感染中的功能提供了参考, 并有助于完善和丰富硬骨鱼类 RBL 的功能和在抗菌免疫应答中的基础理论体系, 具有重要的科学意义。

关键词: 尼罗罗非鱼; *L*-鼠李糖凝集素; 病原菌; 单核/巨噬细胞; 吞噬

中图分类号: S 942

文献标志码: A

与适应性免疫相比, 先天免疫系统是进化上相对古老的一种防御体系, 在抵御病原微生物感染中发挥第一道防线的作用^[1]。绝大多数硬骨鱼自胚胎时期就生活在水环境中, 在长期的生物进化中, 它们具备了多样的有效机制来保护机体不

受微生物的侵害, 特别是高度发达和有效的先天免疫系统^[2-3]。动物凝集素作为先天免疫系统的关键组成部分, 不仅能够通过与碳水化合物相互作用识别丰富的病原微生物, 还能够参与到下游效应功能的发挥, 比如凝集、中和、调理吞噬和杀

收稿日期: 2021-12-20 修回日期: 2022-03-06

资助项目: 国家自然科学基金 (32102826, 31902396, 31972818); 中国博士后科学基金 (2019M652942)

第一作者: 木亮亮 (照片), 从事水产动物先天免疫研究, E-mail: lianglaingmu@m.scnu.edu.cn

通信作者: 尹晓雪, 从事水产动物免疫研究, E-mail: sheilayin@m.scnu.edu.cn;

叶剑敏, 从事水产动物免疫研究, E-mail: jmye@m.scnu.edu.cn



伤等^[4-5]。根据结构和碳水化合物结合基序的特点, 动物凝集素可以分为多种类型, 包括鼠李糖凝集素 (rhamnose-binding lectins, RBLs)、C-型凝集素、半乳糖凝集素、F-型凝集素、I-型凝集素、P-型凝集素和正五聚蛋白等^[4-5]。

RBLs 主要由一个或多个碳水化合物识别区结构域 (carbohydrate-recognition domain, CRD) 组成^[6]。通过其 CRD 结构域识别和结合多种微生物表面糖结构, 特别是 L-鼠李糖和 D-半乳糖, RBLs 在宿主防御中发挥重要作用^[4,6]。早期的研究主要是从动物的卵和卵巢中分离出 RBLs, 如紫海胆 (*Anthocidaris crassispina*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、大麻哈鱼 (*O. keta*) 等^[7-10]。研究发现, RBLs 主要是在肝细胞和卵母细胞中合成, 且广泛分布于脾脏、肾脏、肠、鳃和外周血等组织中^[4,6]。近些年, 在许多硬骨鱼中发现和鉴定了 RBLs, 如香鱼 (*Plecoglossus altivelis*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 和大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 等^[11-14], 并发现香鱼 RBL 具有凝集香鱼格留虫 (*Glugea plecoglossi*) 的功能^[11]。海鲈 RBL 不仅具有凝集病原菌的活性, 还具有增强巨噬细胞吞噬病菌的功能^[13]。然而, 目前这些研究主要集中在 *rbl* 的鉴定、生物信息学分析和组织定量表达分析方面, 对其生物学功能的研究还相对较少。

尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 是世界范围内广泛分布的经济养殖品种, 而中国是全球罗非鱼养殖第一大国。近年来, 在集约化水产养殖过程中, 罗非鱼链球菌病等大规模暴发, 对罗非鱼养殖行业造成巨大冲击。因此, 开展其免疫系统抗病防御机制的研究是水产绿色养殖产业的迫切需求。前期, 我们已经从尼罗罗非鱼中鉴定出一种 L-鼠李糖凝集素 (OnRBL-1), 发现在病原菌应激后其表达量显著上调, 并且具有结合和凝集病原菌的功能^[15]。然而, 硬骨鱼鼠李糖凝集素 RBL 参与机体防御病原菌侵染的途径和特点, 尤其是在非特异性细胞防御中的作用, 尚不清楚。本研究主要利用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和流式细胞术等技术对 OnRBL-1 在尼罗罗非鱼单核/巨噬细胞炎症反应、吞噬病菌活性、呼吸爆发水平和活性氧的释放中的作用进行了研究, 解析 OnRBL-1 在尼罗罗非鱼非特异性细胞防御病原菌感染中的作用, 为开展罗非鱼细菌性疾病的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

尼罗罗非鱼购买自广东省罗非鱼良种场, 并饲养于华南师范大学生物系试验场的半自动罗非鱼循环养殖系统内。饲养期间, 保持正常饲料投喂、充足的溶解氧和水质干净。实验中的无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*, ZQ0910) 来自于广东海洋大学, 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, BYK00810) 来自于上海海洋大学。

1.2 单核/巨噬细胞的分离和细菌应激实验

尼罗罗非鱼头肾单核/巨噬细胞的分离方法参照已有文献^[16-19]。将剖取出的尼罗罗非鱼头肾组织经过清洗、匀浆和过滤后得到细胞悬液, 轻缓加在提前配置好的 51% 和 34% Percoll 细胞分离液 (Sigma, 美国) 上。以 $500 \times g$ 离心 40 min, 离心结束后收集 54% 与 31% Percoll 液面交汇处的细胞, 加入 1640 基础培养基清洗 3 次, 用培养基将分离后的细胞稀释至 5×10^6 CFU/mL, 96 孔细胞培养板 (Thermo, 美国) 进行铺板, 每孔加入 100 μ L。培养 3 d 后去除非贴壁细胞, 用 1640 基础培养基洗涤 3 次。最后使用培养基将细胞浓度稀释调整至 1×10^6 CFU/mL, 每孔加入 100 μ L, 置于细胞培养箱内, 温度为 25 $^{\circ}$ C 培养。

为探究病原菌对尼罗罗非鱼单核/巨噬细胞中 *Onrbl-1* 表达量的影响, 实验通过细胞体外应激实验进行分析。实验中无乳链球菌和嗜水气单胞菌提前采用 1% 甲醛溶液灭活处理^[20]。将处理后的病原菌以 10 mmol/L 无菌磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 清洗 4 次, 最终稀释至 1×10^7 CFU/mL, 加入到单核/巨噬细胞培养板内, 100 μ L/孔 (1×10^7 CFU), 对照组中只加入 PBS。分别在应激后的第 3、6、12、24、48 和 72 小时收集细胞, 并迅速置于液氮中冷冻, 然后转移至 -80° C 冰箱内保存备用。

1.3 qRT-PCR 检测

将上述保存于 -80° C 冰箱内的尼罗罗非鱼细胞样品采用 TRIzol (Thermo, 美国) 裂解法提取 RNA。提取的 RNA 通过 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测纯度和浓度。按照 PrimeScriptTMRT 反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本) 说明书将提取的 RNA 进行 cDNA 合成。获得的 cDNA 模板保存在 -20° C 备用。

利用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 系统 (Life Technologies, 美国) 检测细菌应激单核/巨噬细胞后 *Onrbl-1* 表达量的动态变化。反应体系: 10 μ L 2 \times SYBR Premix 预混合液 (TaKaRa, 日本)、qRBL-1-F 上下游引物各 2 μ L (表 1)、0.4 μ L Rox reference Dye II 染料 (TaKaRa, 日本)、2 μ L cDNA 模板和 3.6 μ L 无核糖核酸酶水。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。以尼罗罗非鱼 β -actin 作为内参基因, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行数据分析^[21]。数据以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 进行表示。

表 1 本研究使用的引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primers	序列 (5'-3') sequences (5'-3')	目的 purpose
β -actin-F	CGAGAGGGAAATCGTGCGTGACA	qRT-PCR
β -actin-R	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGGGC	qRT-PCR
qRBL-1-F	AGCAGCACGCTCTTGTGGC	qRT-PCR
qRBL-1-R	GACTCCTGGACACGAATCACT	qRT-PCR
IL-6-F	ACAGAGGAGGCGGAGATG	qRT-PCR
IL-6-R	GCAGTGCTTCGGGATAGAG	qRT-PCR
IL-8-F	GATAAGCAACAGAATCATTGTCAGC	qRT-PCR
IL-8-R	CCTCGCAGTGGGAGTTGG	qRT-PCR
TNF- α -F	GCTGAGGCTCCTGGACAAAA	qRT-PCR
TNF- α -R	TCTGCCATTCCTGAGGCTCTT	qRT-PCR
IL-10-F	TGGAGGGCTTCCCCGTCAG	qRT-PCR
IL-10-R	CTGTCGGCAGAACCGTGTC	qRT-PCR
TGF- β -F	CAAACACGCTGAAGGACAAAATG	qRT-PCR
TGF- β -R	CGTTATTGCCGATTCACAG	qRT-PCR

1.4 炎症因子基因的表达检测

为了探究 OnRBL-1 重组蛋白对尼罗罗非鱼单核/巨噬细胞中炎症因子基因表达量的影响, 实验通过 qRT-PCR 进行相关因子基因的检测分析。尼罗罗非鱼头肾单核/巨噬细胞的分离参照“单核/巨噬细胞的分离和细菌应激实验”中的步骤。将尼罗罗非鱼 OnRBL-1 重组蛋白 [(r)OnRBL-1, 5 μ g/mL]、载体蛋白 Trx-pET-32a (Trx, 5 μ g/mL) 和 PBS 分别与细胞预孵育 30 min, 然后加入灭活的无乳链球菌或嗜水气单胞菌 (1×10^7 CFU/mL)。在 25 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内静置培养 24 h, 收集细胞并进行 RNA 的提取和反转录。其中, 未进行任何处理的细胞样品为空白对照组。最后通过 qRT-PCR 检测炎症因子 *il-6* (LOC102077017)、*il-8* (XM_019359413.2)、

tnf- α (XM_025902124.1)、*il-10* (XM_003441366.3) 和 *tgf- β* (NM_001311325.1) 的表达量。所用引物是使用 Primer premier 5.0 软件设计 (表 1), 送至华大基因科技有限公司合成。本实验中所用的 (r)OnRBL-1 和 Trx 蛋白为实验室前期表达纯化获得^[15,22]。

1.5 吞噬活性的检测

为了探究 (r)OnRBL-1 对尼罗罗非鱼单核/巨噬细胞吞噬病原菌能力的影响, 实验通过流式细胞术进行检测分析^[18,22]。将分离的单核/巨噬细胞 (1×10^6 CFU/mL) 与 PBS、Trx (20 μ g/mL) 和 (r)OnRBL-1 (20 μ g/mL) 共 200 μ L 置于 1.5 mL 无菌离心管, 于室温避光孵育 30 min。然后将 FITC 标记的无乳链球菌和嗜水气单胞菌 (1×10^7 CFU/mL) 分别加入预孵育的细胞中, 轻轻混匀, 室温孵育 1 h, 每隔 10 min 轻轻摇晃以防细胞沉降。无菌 PBS (含 3% BSA 和 4.5% D-葡萄糖) 洗涤 3 次, 100 \times g 离心, 每次 10 min。最后, 每个样品中加 1 μ L 台盼蓝 (浓度为 0.4%, 提前预冷) 使吞噬细胞外壁荧光淬灭, 流式细胞仪中进行检测分析。

1.6 呼吸爆发和活性氧 (ROS) 的检测

通过流式细胞术检测分析 (r)OnRBL-1 对尼罗罗非鱼单核/巨噬细胞呼吸爆发水平的影响。参照已有文献^[23], 按照呼吸爆发定量检测试剂盒 abs50002 (Absin Bioscience, 中国) 说明书进行操作。将分离的单核/巨噬细胞 (1×10^7 CFU/mL) 分别与 PBS、Trx (20 μ g/mL) 和 (r)OnRBL-1 (20 μ g/mL) 混合, 室温孵育 1 h。然后加入 50 μ L 激活剂佛波酯 PMA (100 μ g/mL)。孵育 15 min 后, 再加入 25 μ L 二氢若丹明 DHR (10 mg/mL), 避光孵育 5 min。最后 PBS 洗涤 3 次, 流式细胞仪中进行检测分析。

通过 ROS 检测试剂盒 S0033S (Beyotime, 中国) 分析 (r)OnRBL-1 对尼罗罗非鱼单核/巨噬细胞 ROS 释放水平的影响。将分离的单核/巨噬细胞 (1×10^7 CFU/mL) 与荧光探针 DCFH-DA (2 μ mol/L) 孵育 20 min。洗涤 4 次后, 装载探针的细胞分别与 PBS、Trx (20 μ g/mL) 和 (r)OnRBL-1 (20 μ g/mL) 混合, 室温孵育 30 min, 流式细胞仪中进行检测分析。

1.7 数据统计分析

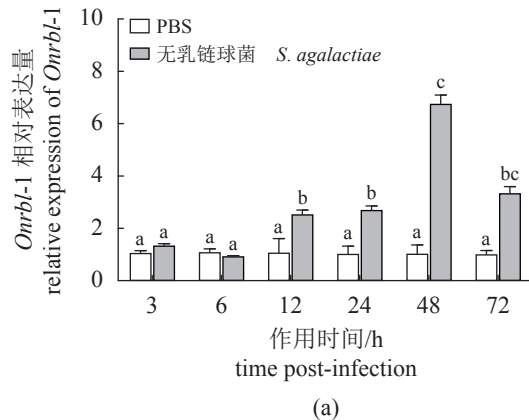
所有实验每个样品独立重复 3 次, 收集实验数据进行统计学分析。数据通过 SPSS 17.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 同时伴随

Tukey 测试和 t 检验。数据表示为平均值 \pm 标准差 (SD)。统计显著性以不同小写字母 ($P < 0.05$) 表示。所有图表均由 GraphPad 17.0 软件绘制。

2 结果

2.1 *Onrbl-1* 在病原菌应激下的体外表达分析

通过 qRT-PCR 检测分析体外病原菌应激后单核/巨噬细胞中 *Onrbl-1* 表达量的变化趋势。结



果显示, 在灭活的无乳链球菌和嗜水气单胞菌应激后, 细胞中 *Onrbl-1* 的表达量均出现显著上调 (图 1)。其中, 无乳链球菌应激后, *Onrbl-1* 的表达量在 48 h 达到峰值, 上调了 6.77 倍 (图 1-a)。嗜水气单胞菌应激后, *Onrbl-1* 的表达量和无乳链球菌应激后的类似, 但上调相对平缓, 在 48 h 上调了 3.29 倍 (图 1-b)。2 种病原菌刺激后的 *Onrbl-1* 在细胞中的表达模式均呈现先上升、后下降的变化趋势。

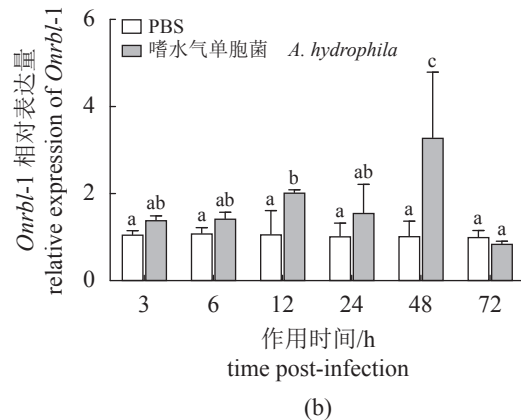


图 1 无乳链球菌 (a) 和嗜水气单胞菌 (b) 应激后头肾单核/巨噬细胞中 *Onrbl-1* 的相对表达量

Fig. 1 The mRNA expression of *Onrbl-1* in head kidney monocytes/macrophages (MO/M Φ) after treated with *S. agalactiae* (a) and *A. hydrophila* (b)

2.2 (r)OnRBL-1 对细胞中菌诱导的炎症因子表达的影响

为了探究 OnRBL-1 参与调节炎症, 本研究通过 qRT-PCR 分析了 (r)OnRBL-1 对细菌诱导单核/巨噬细胞中炎症因子表达的影响。结果显示, 在无乳链球菌和嗜水气单胞菌与 (r)OnRBL-1 和细胞共同孵育 24 h 后, (r)OnRBL-1 相对于 PBS 组能够显著抑制促炎因子基因 *il-6*、*il-8* 和 *tnf- α* 的表达, 并显著促进抑炎因子基因 *il-10* 和 *tgf- β* 的表达 ($P < 0.05$, 图 2)。然而, 空载蛋白 Trx 组相对于 PBS 组对炎症因子的表达无显著性影响 ($P > 0.05$, 图 2)。

2.3 (r)OnRBL-1 对单核/巨噬细胞吞噬病菌的影响

通过流式细胞仪检测进一步分析 (r)OnRBL-1 对单核/巨噬细胞吞噬活性的影响。结果显示, (r)OnRBL-1 实验组中单核/巨噬细胞吞噬无乳链球菌和嗜水气单胞菌的吞噬百分比 (%) 和平均荧光强度 (MFI) 都显著高于其他各组 ($P < 0.05$, 图 3)。Trx 组中单核/巨噬细胞吞噬这 2 种菌的吞噬百分比 (%) 和平均荧光强度 (MFI) 与 PBS 组相比无显

著性影响 ($P > 0.05$, 图 3)。可见 (r)OnRBL-1 能够显著促进单核/巨噬细胞吞噬病原菌。

2.4 (r)OnRBL-1 对单核/巨噬细胞呼吸爆发的影响

为了进一步探究 (r)OnRBL-1 对单核/巨噬细胞杀伤作用的影响, 本研究通过流式细胞仪对细胞呼吸爆发水平进行检测分析。结果显示, 加入 (r)OnRBL-1 后单核/巨噬细胞的荧光细胞百分比 (%) 和 MFI 都显著高于 PBS 组和 Trx 组 ($P < 0.05$, 图 4), 表明 (r)OnRBL-1 可增强单核/巨噬细胞的呼吸爆发。此外, Trx 不影响单核/巨噬细胞的呼吸爆发 ($P > 0.05$, 图 4)。

2.5 (r)OnRBL-1 对单核/巨噬细胞活性氧释放的影响

为了分析 (r)OnRBL-1 对单核/巨噬细胞呼吸爆发过程中活性氧释放水平的影响, 实验通过流式细胞仪进行检测分析。结果显示, (r)OnRBL-1 能够明显促进单核/巨噬细胞活性氧的释放, 并且该组的平均荧光强度 MFI 显著高于 PBS 组和 Trx

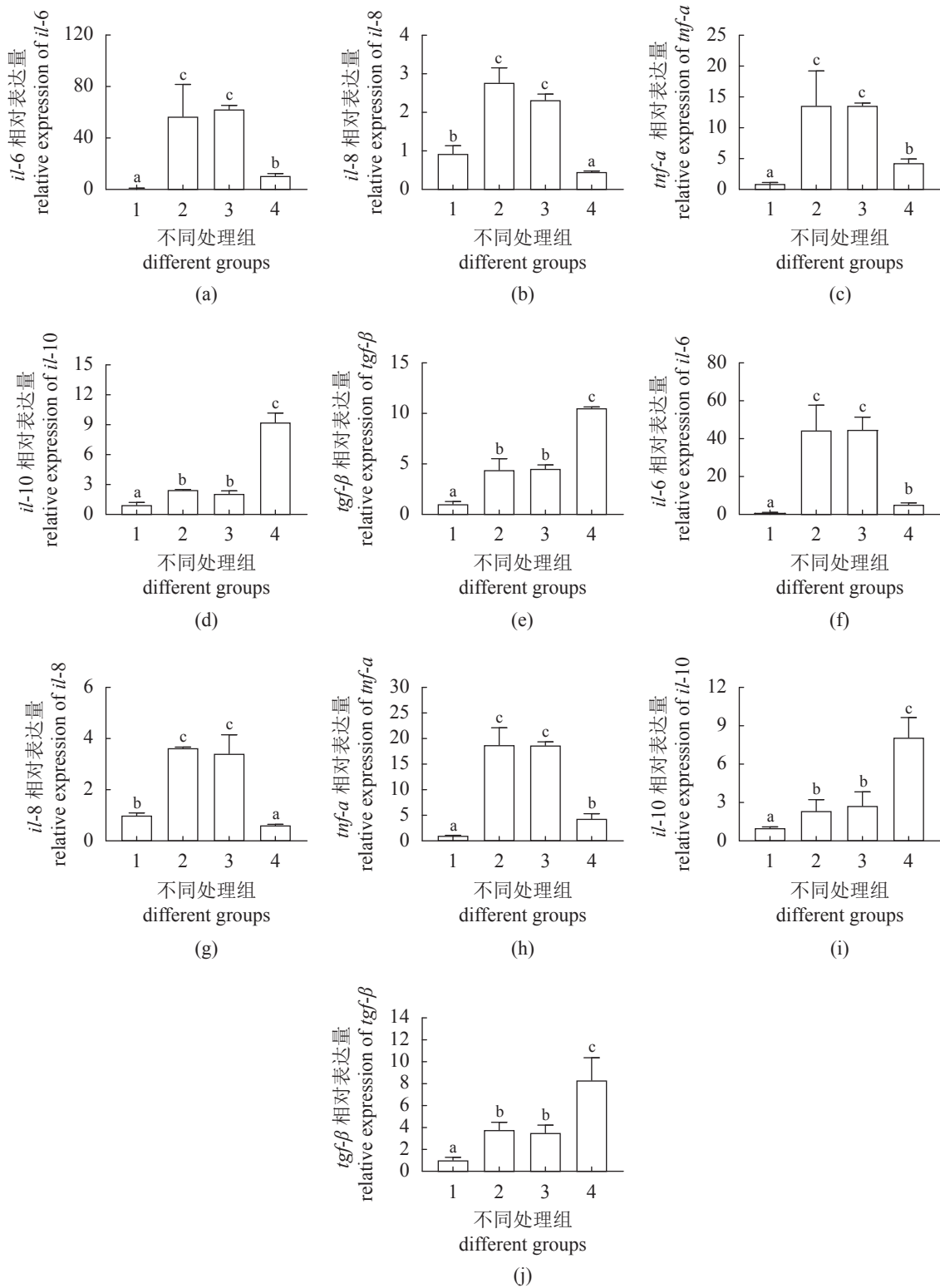


图 2 (r)OnRBL-1 影响单核/巨噬细胞中病原菌诱导炎症因子的相对表达量

(a)~(e). 无乳链球菌, (f)~(j). 嗜水气单胞菌; 1. 空白对照组, 2. PBS 组, 3. Trx 组, 4. (r)OnRBL-1 组

Fig. 2 Relative expression of pathogen-induced inflammatory factors in MO/MΦ effected by (r)OnRBL-1

(a)~(e). *S. agalactiae*, (f)~(j). *A. hydrophila*; 1. control group, 2. PBS group, 3. Trx group, 4. (r)OnRBL-1 group

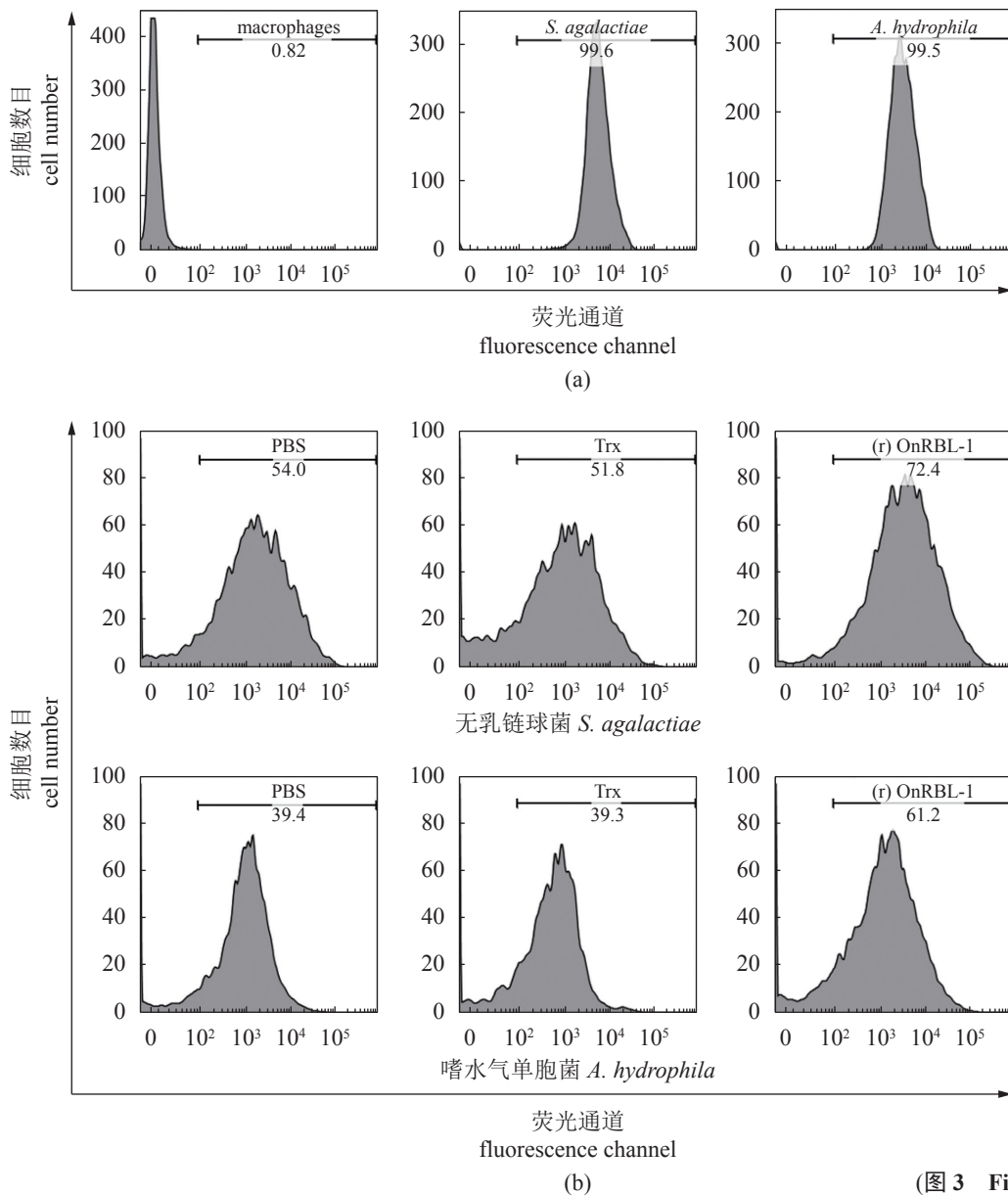
组 ($P < 0.05$, 图 5)。此外, Trx 不影响单核/巨噬细胞的活性氧的释放 ($P > 0.05$, 图 5)。

3 讨论

凝集素作为先天免疫系统的重要组成部分, 在宿主抵御入侵微生物感染的第一道防线中发挥重要作用^[4]。在脊椎动物和无脊椎动物中, 凝集素具有基因和结构多样性, 这极大地扩展了碳水化合物配体的范围, 进一步增强了其功能发挥的多样性^[4,6]。前期研究发现, 尼罗罗非鱼 OnRBL-1 具有结合和凝集病原菌的功能, 通过病原菌体内感染实验发现 OnRBL-1 很可能参与到机体的先天免疫防御^[15]。本实验进一步对 OnRBL-1 的功能特

征进行探究, 发现其能够参与调节炎症因子的表达、增强吞噬作用和呼吸爆发等非特异性细胞防御。综上所述 OnRBL-1 在宿主先天免疫防御病原菌感染中很可能发挥重要作用。

在机体抵御病原微生物感染的过程中, 吞噬细胞是清除病原微生物的一类重要效应细胞, 包括中性粒细胞和单核/巨噬细胞。当微生物入侵时, 吞噬细胞能够迅速响应, 通过定向迁移、识别、吞噬和杀伤等发挥吞噬作用, 从而在先天免疫中起着重要作用。其中, 巨噬细胞更持久, 通过吞噬和产生许多活性的反应性中间体迅速杀死病原体, 是主要的效应细胞, 在宿主免疫保护中起关键作用^[24-25]。研究发现, 硬骨鱼中的单核/巨噬细胞也



(图 3 Fig. 3)

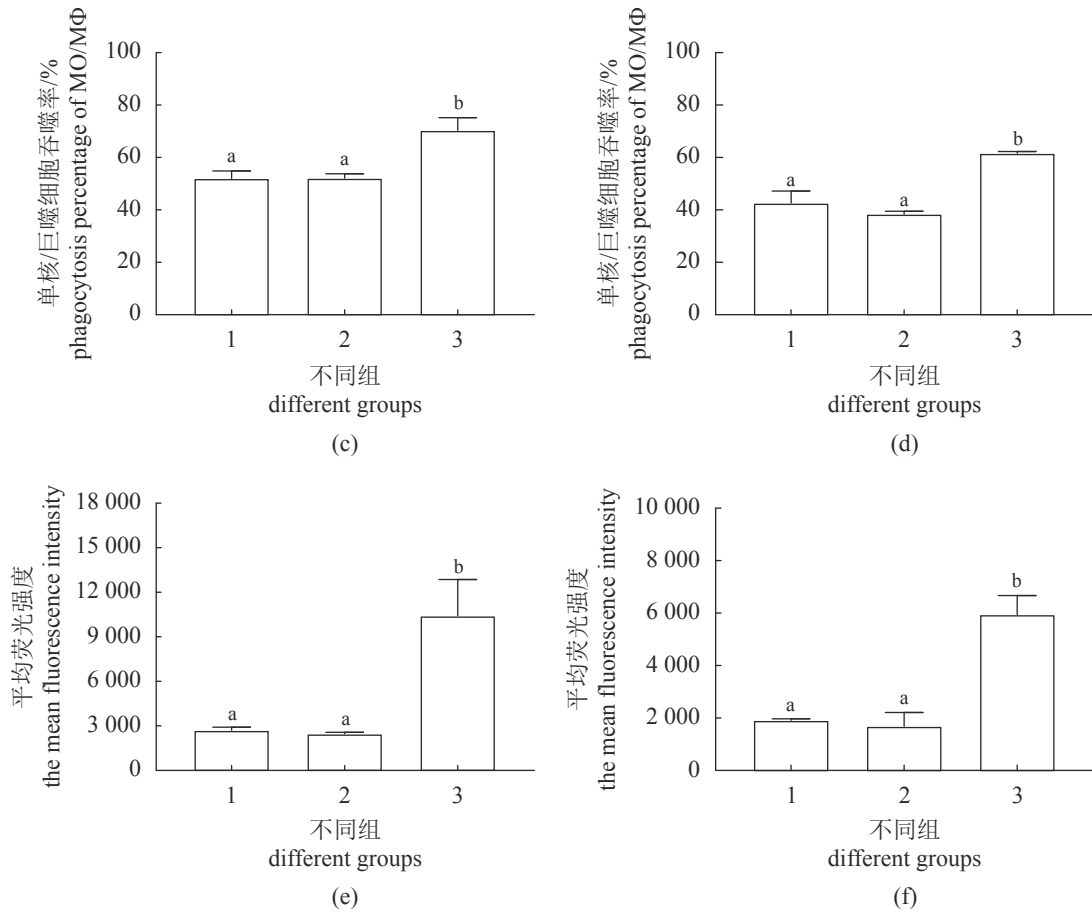


图3 (r)OnRBL-1对单核/巨噬细胞吞噬病原菌的影响

(a)~(b). 不同组的流式直方图, (c)~(d). 不同组中单核/巨噬细胞吞噬无乳链球菌 (c)和嗜水气单胞菌 (d)的吞噬率, (e)~(f). 不同组中单核/巨噬细胞吞噬无乳链球菌 (e)和嗜水气单胞菌 (f)的平均荧光强度; 1. PBS组, 2. Trx组, 3. (r)OnRBL-1组; 下同

Fig. 3 Effects of (r)OnRBL-1 on phagocytosis of MO/MΦ

(a)~(b). the flow histogram of different groups, (c)~(d). the phagocytosis percentage of MO/MΦ phagocytic *S. agalactiae* (c) and *A. hydrophila* (d) in different groups, (e)~(f). the mean fluorescence intensity of MO/MΦ phagocytic *S. agalactiae* (e) and *A. hydrophila* (f) in different groups; 1. PBS group, 2. Trx group, 3. (r)OnRBL-1 group; the same below

可以特征表达许多模式识别受体和凝集素^[23,26-27]。本研究选择尼罗罗非鱼2种重要的致病菌(无乳链球菌和嗜水气单胞菌)对单核/巨噬细胞进行体外应激,结果显示 *Onrbl-1* 的表达在应激后显著上调。这表明 *Onrbl-1* 能够在单核/巨噬细胞中表达,并且会受到病原菌的诱导,可能参与宿主对细菌感染的防御。

非特异性细胞防御是硬骨鱼类先天防御系统的重要组成部分,主要包括炎症、迁移、吞噬和杀伤等作用,涉及单核细胞、巨噬细胞和粒细胞等多种细胞^[23,28]。其中,单核/巨噬细胞作为先天免疫防御中的主要效应细胞,也能够引发炎症反应,表达和分泌多种细胞因子,并招募其他免疫细胞,在非特异性细胞免疫防御中发挥重要作用^[23,26,28]。在病原微生物入侵的过程中,机体为了

更有效的抵御,会产生和激活许多相关的免疫分子,从而增强和扩大效应作用。凝集素作为硬骨鱼类先天免疫的关键组成部分,通过模式识别、凝集、调节炎症、调理吞噬和杀伤等作用,在宿主防御中发挥重要作用^[4]。前期研究中也发现一些凝集素分子,比如甘露糖结合凝集素 MBL、胶原凝集素 CL-K1 和 B-型凝集素 BML,在单核/巨噬细胞等非特异细胞防御中发挥调节炎症和促进吞噬的作用^[23,29-30]。本研究中发现一定浓度的 (r)OnRBL-1 蛋白能够抑制病原菌诱导的单核/巨噬细胞中促炎因子基因(如 *il-6*、*il-8* 和 *tnf-α*)的表达,并且促进抑炎因子基因(如 *il-10* 和 *tgf-β*)的表达,这与草鱼中 MBL 和尼罗罗非鱼中 RBL-like 的研究结果一致^[31-32]。病原菌感染后可触发炎症反应,一定的炎症反应有利于机体的防御,但是

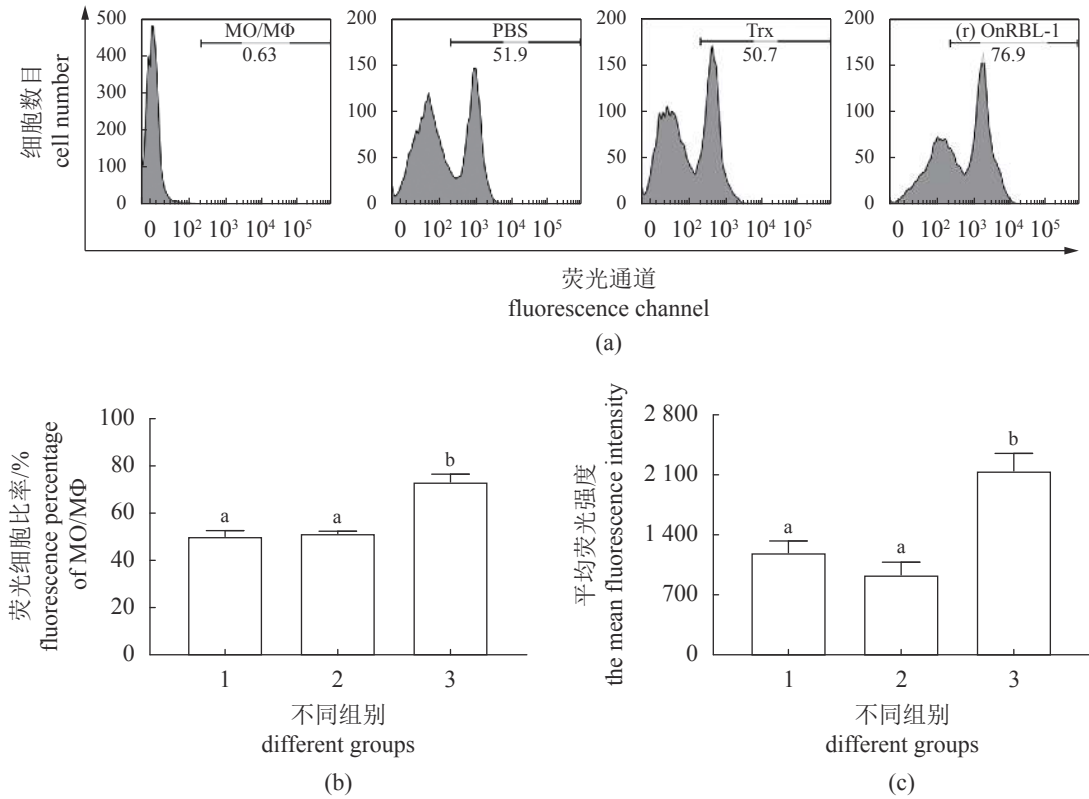


图 4 (r)OnRBL-1 对单核/巨噬细胞呼吸爆发的影响

(a) 单核/巨噬细胞分别与 PBS、Trx 和 (r)OnRBL-1 孵育后, 流式分析呼吸爆发的直方图, (b) 不同组中荧光细胞的比率, (c) 不同组中细胞的平均荧光强度

Fig. 4 Effects of (r)OnRBL-1 on respiratory burst of the MO/MΦ

(a) the histogram of flow cytometric analyses of the MO/MΦ respiratory burst pre-incubated with PBS, Trx or (r)OnRBL-L, respectively, (b) fluorescence percentage in different groups, (c) the mean fluorescence intensity of MO/MΦ in different groups

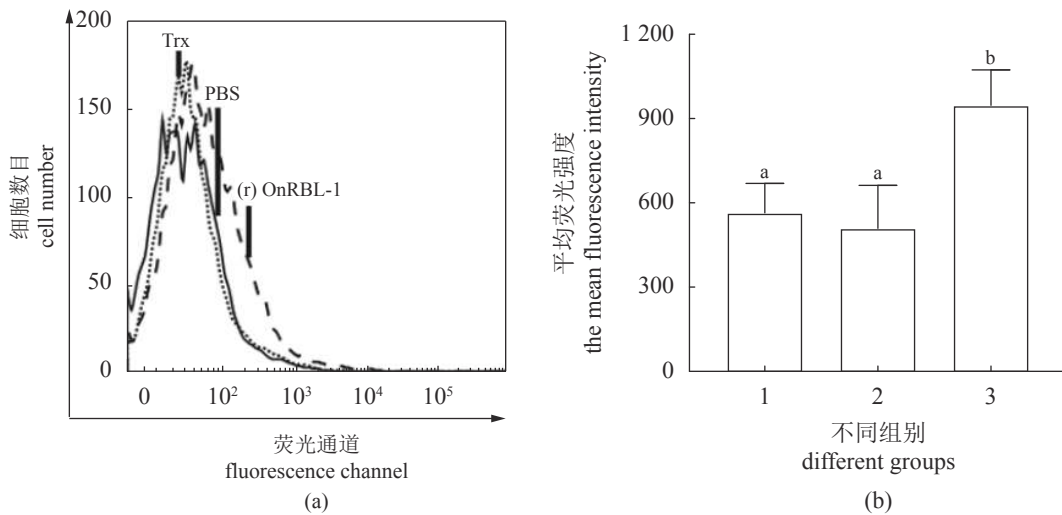


图 5 (r)OnRBL-1 对单核/巨噬细胞活性氧的影响

(a) 流式分析单核/巨噬细胞活性氧释放水平的直方图, (b) 不同组中细胞的平均荧光强度

Fig. 5 Effects of (r)OnRBL-1 on ROS of MO/MΦ

(a) the flow cytometric histogram of ROS release levels in MO/MΦ, (b) the mean fluorescence intensity of MO/MΦ in different groups

过度或持续的炎症反应可以导致组织损伤和病变, 对机体造成严重危害, 甚至死亡。可见, OnRBL-

1 很可能在病原菌感染的过程中发挥潜在有效的调节炎症作用, 减少致病菌造成的损伤。

吞噬作用是吞噬细胞发挥免疫作用的重要途径,是细胞内在化、杀死和消化入侵微生物的过程^[28]。为了更有效地促进吞噬细胞的吞噬作用,机体内存在许多的调理素及相关分子,如补体、抗体、急性期蛋白和C-型凝集素等^[33-34]。硬骨鱼中关于吞噬作用的研究,C-型凝集素和半乳糖凝集素的相关报道较多,而鼠李糖凝集素的报道较少。前期研究中,尼罗罗非鱼鼠李糖凝集素RBL-like分子具有促进单核/巨噬细胞吞噬病原菌的作用^[32]。本实验发现OnRBL-1也具有增强尼罗罗非鱼单核/巨噬细胞的吞噬作用,这与海鲈中鼠李糖凝集素DIRBL分子的研究结果类似^[13]。可见,OnRBL-1能够发挥类似调理素的功能,促进吞噬细胞的吞噬作用。此外,实验发现OnRBL-1能够显著提高单核/巨噬细胞的呼吸爆发水平,增强活性氧的释放。呼吸爆发在入侵微生物的杀灭过程中起着至关重要的作用,同时也是重要的非特异性细胞防御机制之一。吞噬细胞在呼吸爆发时会产生许多氧和氮的自由基,比如活性氧和活性氮,对病原微生物起毒杀作用。在先天免疫防御中,机会通过一些分泌蛋白与吞噬细胞相互作用,增强呼吸爆发,释放大量的活性氧,从而扩大病原菌杀灭效应,比如转铁蛋白TF和C-型凝集素MBL^[23,31,35]。因此,OnRBL-1在非特异性细胞防御中很可能发挥类似调理素的功能,促进单核/巨噬细胞吞噬病原菌,提高呼吸爆发水平,增强活性氧的释放,从而扩大杀伤效应。

综上所述,本研究首先通过细胞体外表达模式,发现OnRBL-1能够响应病原菌的刺激;其次发现OnRBL-1参与调节病原菌诱导部分细胞炎症因子的表达;然后通过流式细胞术检测发现OnRBL-1具有促进吞噬和增强呼吸爆发的作用。同时,也意识到体外实验研究具有一定的局限性,后续会借助RNA干扰、过表达等体内实验进一步探究相关的功能及调控的分子机制。本研究结果为探讨RBL-1在硬骨鱼宿主防御病原菌感染中的功能和阐释硬骨鱼RBL参与机体防御病原菌侵染的机制和特点提供了一定的参考,并有助于完善和丰富硬骨鱼类RBL的功能和在抗菌免疫应答中的基础理论体系,具有重要的科学意义。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Hoffmann J A, Kafatos F C, Janeway C A, *et al.* Phylo-
<https://www.china-fishery.cn>

genetic perspectives in innate immunity[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1313-1318.

- [2] Trede N S, Langenau D M, Traver D, *et al.* The use of zebrafish to understand immunity[J]. *Immunity*, 2004, 20(4): 367-379.
- [3] Uribe C, Folch H, Enriquez R, *et al.* Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review[J]. *Veterinami Medicina*, 2011, 56(10): 486-503.
- [4] Vasta G R, Nita-Lazar M, Giomarelli B, *et al.* Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: relevance to innate and adaptive immunity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1388-1399.
- [5] Dos Santos Silva P M, De Oliveira W F, Albuquerque P B S, *et al.* Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 234-244.
- [6] Ogawa T, Watanabe M, Naganuma T, *et al.* Diversified carbohydrate-binding lectins from marine resources[J]. *Journal of Amino Acids*, 2011, 2011: 838914.
- [7] Ozeki Y, Matsui T, Suzuki M, *et al.* Amino acid sequence and molecular characterization of a D-galactoside-specific lectin purified from sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) eggs[J]. *Biochemistry*, 1991, 30(9): 2391-2394.
- [8] Tateno H, Saneyoshi A, Ogawa T, *et al.* Isolation and characterization of rhamnose-binding lectins from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologous to low density lipoprotein receptor superfamily[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(30): 19190-19197.
- [9] Lam Y W, Ng T B. Purification and characterization of a rhamnose-binding lectin with immunoenhancing activity from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) ovaries[J]. *Protein Expression and Purification*, 2002, 26(3): 378-385.
- [10] Shiina N, Tateno H, Ogawa T, *et al.* Isolation and characterization of L-rhamnose-binding lectins from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) eggs[J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(6): 1352-1366.
- [11] Watanabe Y, Shiina N, Shinozaki F, *et al.* Isolation and characterization of L-rhamnose-binding lectin, which binds to microsporidian *Glugea plecoglossi*, from ayu (*Plecoglossus altivelis*) eggs[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(5): 487-499.

- [12] Thongda W, Li C, Luo Y P, *et al.* L-rhamnose-binding lectins (RBLs) in channel catfish, *Ictalurus punctatus*: characterization and expression profiling in mucosal tissues[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 44(2): 320-331.
- [13] Cammarata M, Parisi M G, Benenati G, *et al.* A rhamnose-binding lectin from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) plasma agglutinates and opsonizes pathogenic bacteria[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 44(2): 332-340.
- [14] Gao C B, Su B F, Zhang D D, *et al.* L-rhamnose-binding lectins (RBLs) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.): characterization and expression profiling in mucosal tissues[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 264-273.
- [15] Mu L L, Yin X X, Bai H, *et al.* Expression and functional characterization of an L-rhamnose-binding lectin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in host defense against bacterial infection[J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737195.
- [16] Zhang J, Zhang S C. Lipovitellin is a non-self recognition receptor with opsonic activity[J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(3): 441-450.
- [17] Yin X X, Wu H R, Mu L L, *et al.* Identification and characterization of calreticulin (CRT) from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection[J]. *Aquaculture*, 2020, 529: 735706.
- [18] Mu L L, Yin X X, Wu H R, *et al.* Mannose-binding lectin possesses agglutination activity and promotes opsonophagocytosis of macrophages with calreticulin interaction in an early vertebrate[J]. *The Journal of Immunology*, 2020, 205(12): 3443-3455.
- [19] Kong L H, Wu L T, Guo Z, *et al.* A siglec-1-like lectin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) possesses functions of agglutination and mediation of macrophage phagocytic activity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 102: 203-210.
- [20] 尹晓雪, 綦伟伟, 木亮亮, 等. 尼罗罗非鱼铁调素调节蛋白在宿主抵御病原菌感染和调节铁稳态中的功能[J]. *水产学报*, 2021, 45(9): 1530-1544.
- Yin X X, Qi W W, Mu L L, *et al.* Functional characterization of hemojuelin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in host defense against bacterial infection and regulation of iron homeostasis[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(9): 1530-1544 (in Chinese).
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Wynn T A, Chawla A, Pollard J W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 445-455.
- [25] Hodgkinson J W, Grayfer L, Belosevic M. Biology of bony fish macrophages[J]. *Biology*, 2015, 4(4): 881-906.
- [26] Grayfer L, Kerimoglu B, Yaparla A, *et al.* Mechanisms of fish macrophage antimicrobial immunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1105.
- [27] Cai S Y, Nie L, Chen J. C-reactive protein/serum amyloid P promotes pro-inflammatory function and induces M1-type polarization of monocytes/macrophages in mudskipper, *Boleophthalmus pectinirostris* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 318-326.
- [28] 林浩然. 鱼类生理学 [M]. 广州: 中山大学出版社, 2011: 372-380.
- Lin H R. *Fish physiology* [M]. Guangzhou: Sun Yat-sen University Press, 2011: 375-380 (in Chinese).
- [29] Mu L L, Yin X X, Bian X, *et al.* Expression and functional characterization of collection-K1 from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in host innate immune defense[J]. *Molecular Immunology*, 2018, 103: 21-34.
- [30] 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.
- [31] Dang Y F, Meng X Z, Lu J F, *et al.* Role of mannose-binding lectin in regulating monocytes/macrophages functions during *Aeromonas hydrophila* infection in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 99: 103408.

- [32] Mu L L, Yin X X, Qi W W, *et al.* An *L*-rhamnose-binding lectin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) possesses agglutination activity and regulates inflammation, phagocytosis and respiratory burst of monocytes/macrophages[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2022, 126: 104256.
- [33] 刘娜, 刘治, 刘玲, 等. 调理素的研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2016, 50(7): 62-65.
- Liu N, Liu Z, Liu L, *et al.* Research advances in opsonins[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2016, 50(7): 62-65 (in Chinese).
- [34] Uribe-Querol E, Rosales C. Phagocytosis: our current understanding of a universal biological process[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1066.
- [35] Yin X X, Yang Y J, Han K L, *et al.* Purification and functional characterization of serum transferrin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 88: 36-46.

Functional characterization of RBL-1 from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in non-specific cell defense against pathogen infection

MU Liangliang, BAI Hao, LI Jiadong, QIU Li, YIN Xiaoxue*, YE Jianmin*

(Guangdong Key Laboratory of Aquaculture Health and Safety, Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center for Environmentally-Friendly Aquaculture, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: In order to explore the role of rhamnose-binding lectin (RBL) in the non-specific cell defense of bony fishes against pathogen infection. The head kidney monocytes/macrophages from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) were isolated to conduct a bacterial stimulation experiment *in vitro*. The expression of *Onrbl-1* was significantly up-regulated following challenges with two important pathogens, *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas hydrophila*. Meanwhile, OnRBL-1 recombinant protein could participate in the regulation of the expression of pathogen-induced cell inflammatory factors by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), including significantly inhibiting the expression of *il-6*, *il-8* and *tnf- α* , and promoting the expression of *il-10* and *tgf- β* . In addition, the results showed that OnRBL-1 could promote the phagocytosis, enhance the level of respiratory burst and the release of reactive oxygen species in monocytes/macrophages through flow cytometry analysis. Taken together, the results indicated that OnRBL-1 plays an important regulatory role in the non-specific cellular defense of monocytes/macrophages from *O. niloticus*. This study provides a reference for exploring the function of RBL-1 in host defense against pathogen infection, which helps to explain the action mechanism of bony fish RBL in the defense against pathogen infection and improve the basic theoretical system of its participation in immune response, with great significance in science.

Key words: *Oreochromis niloticus*; *L*-rhamnose-binding lectin; pathogen bacteria; monocytes/macrophages; phagocytosis

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 (32102826, 31902396, 31972818); China Postdoctoral Science Foundation (2019M652942)