

文章编号: 1674-5566(2023)03-0500-10

DOI:10.12024/jsou.20220303751

## TLR18 基因在鲤感染 CyHV-3 中的表达模式及信号通路

任婉莹<sup>1,2,3</sup>, 姜晓娜<sup>2</sup>, 葛彦龙<sup>2</sup>, 田立静<sup>2</sup>, 李 葵<sup>2</sup>, 李池陶<sup>2</sup>, 田景文<sup>2</sup>,  
胡雪松<sup>2</sup>, 石潇丹<sup>2</sup>, 石连玉<sup>2</sup>, 贾智英<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 农业农村部水产基因组学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 上海海洋大学 水产物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

**摘 要:** 以抗病镜鲤选育系 F<sub>4</sub> 和德国镜鲤选育系为实验材料, 通过 RT-PCR 技术确定鲤受 CyHV-3 感染过程两组鱼脾脏组织中 *TLR18*、接头蛋白 *MyD88* 及相应配体 *TRAF6*、下游因子 *IRF5* 及 *P65* 基因的表达模式, 并分析其在抗病镜鲤选育系 F<sub>4</sub> 中的相关抗病机制。结果显示: *TLR18*、*MyD88*、*TRAF6*、*IRF5* 基因在两组鱼间均呈先上升后下降并趋于平稳趋势, 在 48 h 达到最高, 而 *P65* 基因在未选育组呈先上升后下降并恢复初始水平趋势, 在 48 h 达到最高, 在选育组呈下降后恢复初始水平趋势。在未感染 CyHV-3 时, *TLR18* 与 *IRF5* 基因相对表达量在选育组极显著低于未选育组, *MyD88*、*TRAF6* 与 *P65* 基因相对表达量在选育组极显著高于未选育组; 到 CyHV-3 感染早期, *TLR18* 与 *P65* 基因相对表达量在选育组极显著低于未选育组, *MyD88*、*TRAF6* 及 *IRF5* 基因相对表达量在选育组显著高于未选育组。推测在 CyHV-3 感染过程中, *TLR18* 基因通过依赖 *MyD88* 途径产生 *IRF5* 基因清除病毒的同时激活 NF- $\kappa$ B 信号通路, 且选育组较未选育组通过产生较多 *IRF5* 基因清除病毒, 而未选育组较选育组显著激活 NF- $\kappa$ B 信号通路产生相关炎症因子, 这可能与选育组抗病性及抗病机制有关。该结果不仅验证了选育组在机体基础水平及先天免疫过程中对 CyHV-3 抗性的增强, 还为深入研究选育组抗病机制及鱼类 TLRs 在病毒感染过程中的作用及其相关信号通路奠定基础。

**关键词:** 鲤; *TLR18*; CyHV-3; 选育

**中图分类号:** S 917      **文献标志码:** A

鱼类作为低等脊椎动物, 先天免疫是机体抵御病毒的第一道防线<sup>[1]</sup>。Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLRs) 在先天免疫反应中具有重要的作用<sup>[2]</sup>。在硬骨鱼中已经发现至少 22 种 TLRs, 其中 TLR5S、TLR14、TLR18、TLR19、TLR20、TLR22-28 是鱼类所特有的<sup>[2-3]</sup>, *TLR18* 基因在多种硬骨鱼<sup>[4-11]</sup> 中被发现。研究<sup>[12-16]</sup> 表明 TLRs 介导多种病原体入侵并产生免疫应答反应的过程分为依赖 *MyD88* (Myeloid differentiation factor 88) 或不依赖 *MyD88* 途径。在依赖 *MyD88* 途径中, *MyD88* 基因与肿瘤坏死因子受体相关分子 6 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 结合后, 可以导致转录因子包括活化 B

细胞的核因子 (Nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 和/或干扰素调节因子 (Interferon regulatory factors, IRF) 的激活, 以诱导促炎细胞因子和/或 I 型干扰素 (Interferon, IFN) 的产生来抵抗病毒<sup>[17]</sup>。

镜鲤疱疹病毒 III 型 (CyHV-3) 的暴发导致鲤死亡率高达 90% ~ 100%<sup>[18]</sup>, 抗病育种是解决该问题的根本途径。本课题组对德国镜鲤选育系抗疱疹病毒 (CyHV-3) 新品种选育已进行到 F<sub>4</sub>, 其成活率、抗病性均显著高于德国镜鲤选育系<sup>[19]</sup>, 而病毒载量低于德国镜鲤选育系<sup>[20]</sup>。JIA 等<sup>[21]</sup> 实验结果显示经 CyHV-3 感染后, 抗病镜鲤选育系 F<sub>4</sub> 与德国镜鲤选育系均在 144 h 达到死亡高峰, 且德国镜鲤选育系产生了严重的炎症反

收稿日期: 2022-03-05      修回日期: 2022-05-16

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (TD2019C004); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目 (2020TD31); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (HSY202109Q); 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-45-06)

作者简介: 任婉莹 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为遗传育种与生物技术。E-mail: 1335798119@qq.com

通信作者: 贾智英, E-mail: zyjia2010@163.com

版权所有 © 《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

应。本研究以 JIA 等<sup>[21]</sup>对经 CyHV-3 感染后两组鱼的转录组测序分析差异表达 *TLR18*、*MyD88* 和 *TRAF6* 及下游 *IRF5* 和 *P65* 基因为目的基因,探讨差异基因在 CyHV-3 感染过程中的表达模式,并分析抗病镜鲤选育系 F<sub>4</sub> 相关的抗病机制,以期为深入研究 TLRs 在 CyHV-3 感染及抗病镜鲤选育系 F<sub>4</sub> 抗病机制提供理论基础,并为其他鱼类抗病选育提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

所选用实验鱼为抗病镜鲤选育系 F<sub>4</sub> 和德国镜鲤选育系,均来自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所宽甸水产试验站。德国镜鲤选育系是在引进德国镜鲤原种的基础上,采用群体和分子辅助选育方法得到遗传稳定和优良的池塘养殖品种。本课题组在德国镜鲤选育系的基础上开展抗 CyHV-3 选育,已选育到 F<sub>4</sub> 且抗病性状已稳定。

### 1.2 实验攻毒及样品采集

攻毒方法与 JIA 等<sup>[21]</sup>实验方法一致,分为 4 组,攻毒组(选育组与未选育组)、对照组(选育组与未选育组),其他实验条件均相同。取病鱼内脏器官匀浆溶液加入攻毒组的水箱中,在攻毒感染后,每隔 48 小时分别采集 4 组鱼的脾脏样品进行后续实验分析。

### 1.3 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 QIAGEN RNA 提取试剂盒 (RNeasy lipid tissue mini kit) 提取样品总 RNA,用 Nanovue 微量分光光度仪检测 RNA 浓度,1.5% 的琼脂糖凝胶检测 RNA 的质量。将 RNA 储存于 -80 °C 冰箱。采用 RNA 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,并根据荧光定量试剂盒要求稀释 cDNA,供后续 RT-PCR 使用。

### 1.4 实验方法

采用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 技术,以 *β-actin* 为内参基因,分析鲤经 CyHV-3 感染后, *TLR18*、*MyD88* 和 *TRAF6* 及 *IRF5* 和 *P65* 基因相对表达量。所有的实验均取 3 个样本做生物学重复。

使用 SYBR Green I 荧光染料试剂盒(康为科技 Ultra SYBR Mixture)在 Agilent Mx3005p 荧光定量 PCR 仪器进行反应。本实验所用的引物均由生工生物工程(上海)有限公司提供,引物信息见表 1。RT-PCR 反应体系为 20 μL:2 × Ultra SYBR Mixture 10.5 μL,上游引物(10 μmol/L)0.8 μL,下游引物(10 μmol/L)0.8 μL,基因组 cDNA 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。RT-PCR 程序:预变性 95 °C,30 s;95 °C,变性 5 s;退火 X °C,退火 34 s,40 个循环,循环结束后,绘制溶解曲线:95 °C,15 s;60 °C,1 min;95 °C,15 s。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers used in the present study

引物名称 Primers	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物序列(5'-3') Sequences(5'-3')	退火温度 T <sub>m</sub> /°C	用途 Application
PTLR18	MF579562.1	F:CAAGTGTACCATCCCCGAGCGTTG R:GCACAGAAGCGTCAGAGCAAGG	61.5	RT-PCR
PM <sub>y</sub> D88	HQ380208.1	F:GGCATCCAAGCTAAGTGTAGA R:CCACGGGGTTTGTGGATTC	62.5	RT-PCR
PTRAF6	HM535646.1	F:GGCATGCATGCTACGTGTAGG R:CCACGCCCTATGTCGGTTTG	62.0	RT-PCR
PIRF5	Kp979609.1	F:CGCTAAGTGGAGGACCAGGTTA R:TTAGGTTCATTGTGCTGCCGTCA	61.5	RT-PCR
P-P65	MN167531.1	F:TTGCGCTACAGCCCGAAACT R:GTACGGATGCCCTTGGGACA	61.0	RT-PCR
<i>β-actin</i>	M24113.1	F:GCCGTGACCTGACTGACTACCT R:GCCACATAGCAGAGCTTCTCCTTG	61.0	RT-PCR

### 1.5 数据分析

使用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法计算 RT-PCR 实验数据得出的相对表达量,采用 SPSS 19.0 和 Graphpad 8.0

分析软件对结果数据进行统计学分析,差异比较采用 One-way ANOVA 和 *t* 检验分析,结果值均以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

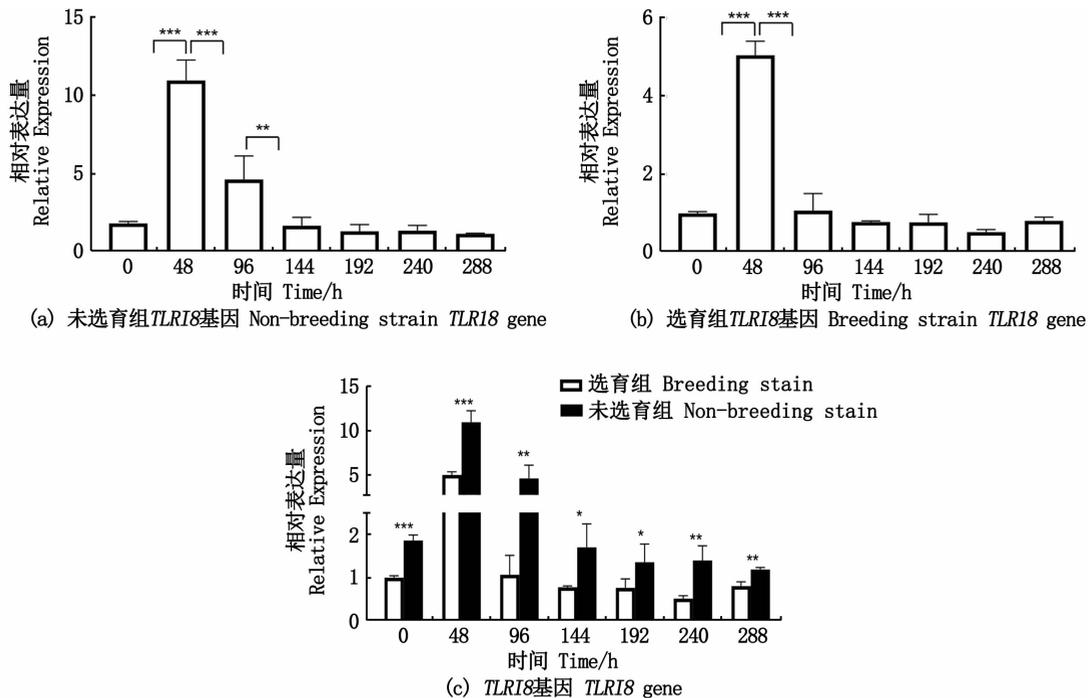
## 2 结果与分析

### 2.1 *TLR18* 基因在不同感染阶段及两组鱼间相对表达量情况

在 CyHV-3 感染后不同阶段, *TLR18* 基因表达呈先上升后下降趋于平稳趋势, 并在 48 h 达到了最高。如图 1(a) 所示, 未选育组在 48 h 与 0 h、96 h 相比达到极显著差异 ( $P < 0.001$ ), 在 96 h

与 144 h 相比达到极显著差异 ( $P < 0.01$ ); 如图 1(b) 所示, 选育组在 48 h 与 0 h、96 h 相比均达到极显著差异 ( $P < 0.001$ )。

在两组鱼间, 如图 1(c) 所示, 在未攻毒和 CyHV-3 感染后, 选育组均低于未选育组, 并在 0 h、48 h 达到极显著差异 ( $P < 0.001$ ), 在 96 h、240 h、288 h 达到极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 在 144 h、192 h 达到显著差异 ( $P < 0.05$ )。



标记 \* 表示组内存在显著性差异 ( $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ )。

The different \* indicate significant differences within groups ( $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ ).

图 1 不同感染阶段及两组鱼间 *TLR18* 基因相对表达量情况

Fig. 1 *TLR18* relative expression levels of fish at different infection stages and between two groups

### 2.2 接头蛋白 *MyD88* 及其配体 *TRAF6* 基因在不同感染阶段及两组鱼间相对表达量情况

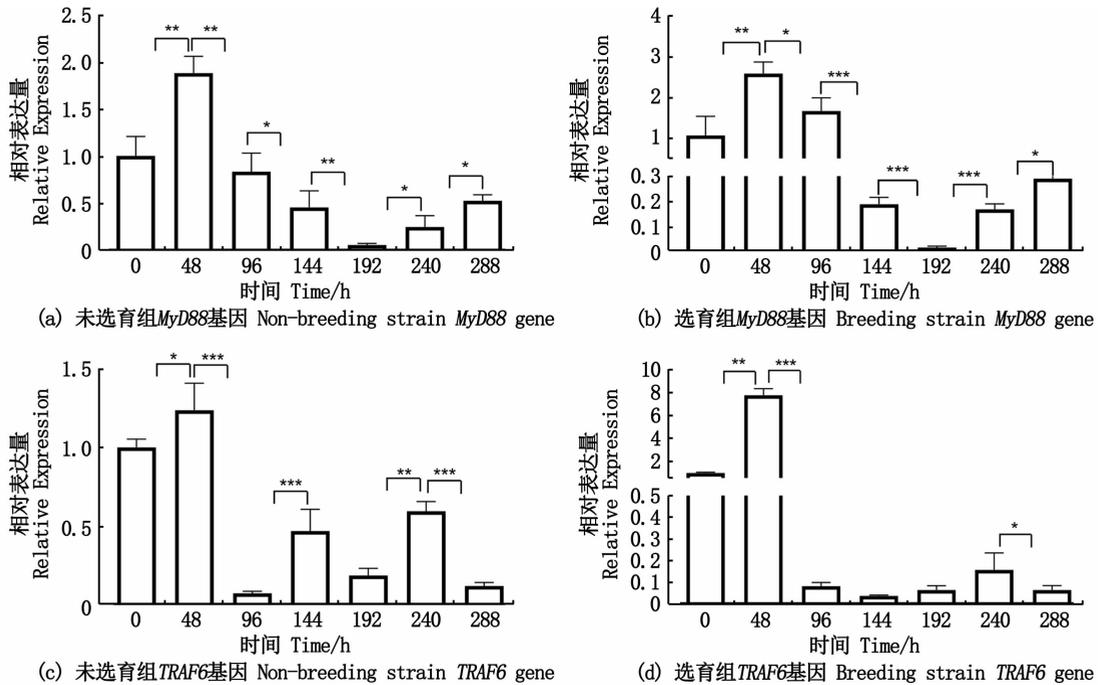
在 CyHV-3 感染后不同阶段, 如图 2(a)、2(c) 所示: 未选育组 *MyD88* 与 *TRAF6* 基因, 在 0 h 与 48 h 相比呈上升趋势, 分别达到极显著差异 ( $P < 0.01$ ) 和显著差异 ( $P < 0.05$ ); 在 48 h 与 96 h 相比呈下降趋势, 分别达到  $P < 0.01$  与  $P < 0.001$  极显著差异; 在 96 h 与 144 h 相比, *MyD88* 基因呈下降趋势, 达到显著差异 ( $P < 0.05$ ), *TRAF6* 基因呈上升趋势, 达到极显著差异 ( $P < 0.001$ ); 在 144 h 与 192 h 相比均呈下降趋势, *MyD88* 基因达到极显著差异 ( $P < 0.01$ ), *TRAF6* 基因无差异; 在 192 h 与 240 h 相比均呈上升趋势

势, 分别达到显著差异 ( $P < 0.05$ ) 与极显著差异 ( $P < 0.01$ ); 在 240 h 与 288 h 相比, *MyD88* 基因呈上升趋势达到显著差异 ( $P < 0.05$ ), *TRAF6* 基因呈下降趋势达到极显著差异 ( $P < 0.001$ )。

如图 2(b)、2(d) 所示: 选育组 *MyD88* 与 *TRAF6* 基因, 在 0 h 与 48 h 相比呈上升趋势, 均达到极显著差异 ( $P < 0.01$ ); 在 48 h 与 96 h 相比均呈下降趋势, 分别达到显著差异 ( $P < 0.05$ ) 与极显著差异 ( $P < 0.001$ ); 在 96 ~ 192 h, *MyD88* 基因呈下降趋势且达到极显著差异 ( $P < 0.001$ ), *TRAF6* 基因无差异变化; 在 192 h 与 240 h 相比均呈上升趋势, *MyD88* 基因达到极显著差异 ( $P < 0.001$ ), *TRAF6* 基因未达到差异水平; 在 240 h 与

288 h 相比,MyD88 基因呈上升趋势并达到显著差异( $P < 0.05$ ),TRAF6 基因呈下降趋势且达到

显著差异( $P < 0.05$ )。



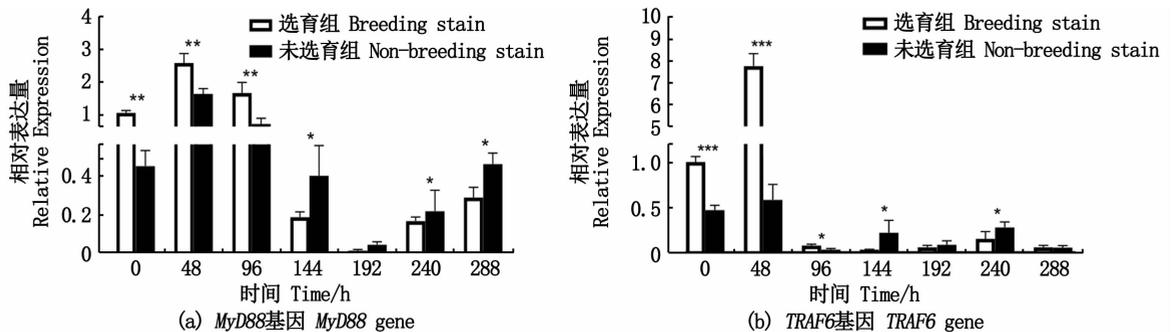
标记 \* 表示组内存在显著性差异 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )。 The different \* indicate significant differences within groups (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

图 2 不同感染阶段 MyD88 与 TRAF6 基因相对表达量情况

Fig. 2 Relative expression levels of MyD88 and TRAF6 at different stages of CyHV-3 infection

如图 3(a)、3(b)所示,在两组鱼间 MyD88 与 TRAF6 基因,在 0~96 h 选育组均高于未选育组,其中:MyD88 基因在 0~96 h 达到了极显著差异( $P < 0.01$ ),TRAF6 基因在 0 h、48 h 达到了极显著差异( $P < 0.001$ ),在 96 h 达到了显著差异

( $P < 0.05$ );在 144~288 h 选育组低于未选育组,其中 MyD88 基因在 144 h、240 h 及 288 h 达到显著差异( $P < 0.05$ ),TRAF6 基因在 144 h、240 h 达到显著差异( $P < 0.05$ )。



标记 \* 表示组内存在显著性差异 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )。 The different \* indicate significant differences within groups (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

图 3 选育组与未选育组 MyD88 与 TRAF6 基因相对表达量情况

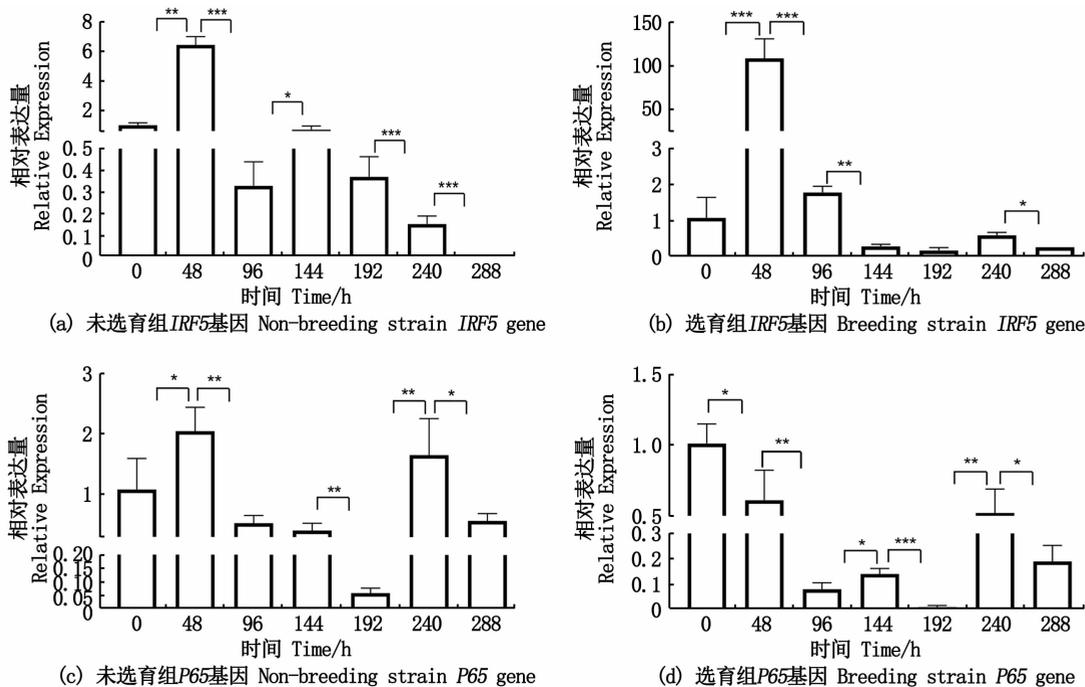
Fig. 3 Relative expression levels of MyD88 and TRAF6 in breeding and non-breeding strain

### 2.3 下游因子 *IRF5* 与 *P65* 基因在不同感染阶段及两组鱼间相对表达量情况

在 CyHV-3 感染后不同阶段,如图 4(a)、4(c)所示:未选育组 *IRF5* 与 *P65* 基因,在 0 h 与 48 h 相比均呈上升趋势,分别达到极显著差异 ( $P < 0.01$ ) 和显著差异 ( $P < 0.05$ );在 48 h 与 96 h 相比均呈下降趋势,且分别达到  $P < 0.001$  与  $P < 0.01$  极显著差异;在 96 h 与 144 h 相比,*IRF5* 基因呈升高趋势并达到显著差异 ( $P < 0.05$ ),*P65* 基因无差异;在 144 h 与 192 h 相比均呈下降趋势,*IRF5* 基因无差异,*P65* 基因达到极显著差异 ( $P < 0.01$ );在 192 h 与 240 h 相比,*IRF5* 基因显著下降,达到极显著差异 ( $P < 0.001$ ),*P65* 基因显著升高,达到极显著差异 ( $P < 0.01$ );在 240 h 与 288 h 相比均呈显著下降趋势,分别达到极显著差异 ( $P < 0.001$ ) 和显著差异 ( $P < 0.05$ )。

与 288 h 相比均呈显著下降趋势,分别达到极显著差异 ( $P < 0.001$ ) 和显著差异 ( $P < 0.05$ )。

如图 4(b)、4(d)所示:选育组 *IRF5* 与 *P65* 基因,在 0 h 与 48 h 相比,*IRF5* 基因呈上升趋势,并达到极显著差异 ( $P < 0.001$ ),*P65* 基因则呈下降趋势,达到显著差异 ( $P < 0.05$ );在 48 h 与 96 h 相比均呈下降趋势,分别达到  $P < 0.001$  与  $P < 0.01$  极显著差异;在 96 h 与 144 h 相比,*IRF5* 基因呈下降趋势,并达到极显著差异 ( $P < 0.01$ ),*P65* 基因呈上升趋势,达到显著差异 ( $P < 0.05$ );在 144 ~ 240 h,均呈先下降后上升趋势,*IRF5* 基因无显著差异,*P65* 基因分别达到  $P < 0.001$  与  $P < 0.01$  极显著差异;在 240 h 与 288 h 相比均呈下降趋势,均达到显著差异 ( $P < 0.05$ )。



标记 \* 表示组内存在显著性差异 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )。

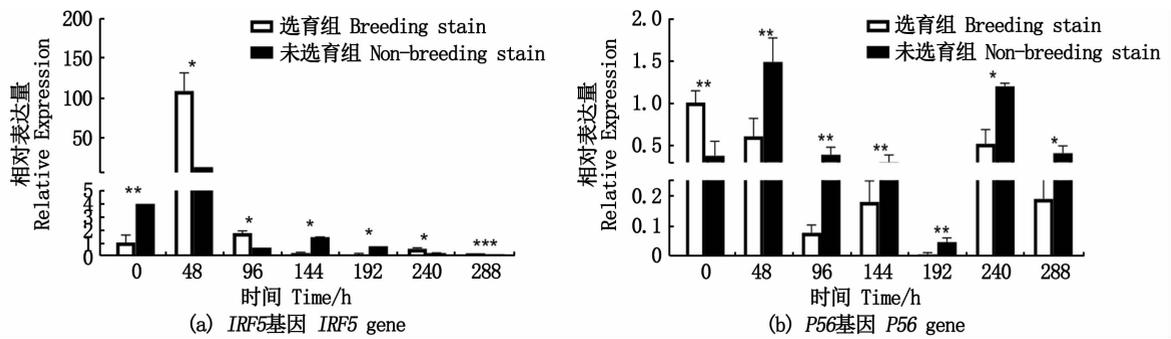
The different \* indicate significant differences with in groups (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

图 4 CyHV-3 感染不同阶段 *IRF5* 与 *P65* 基因相对表达量情况

Fig. 4 Relative expression levels of *IRF5* and *P65* at different stages of CyHV-3 infection

如图 5(a)、5(b)所示:两组鱼间,在 0 h 未攻毒感染时期,*IRF5* 基因选育组低于未选育组,*P65* 基因与其相反,均达到极显著差异 ( $P < 0.01$ );攻毒感染后,*IRF5* 基因在 48、96 h 选育组显著高于未选育组 ( $P < 0.05$ ),在 144、192 h 选育组显著低于未选育组 ( $P < 0.05$ ),在 240、288 h 选育组

高于未选育组,分别达到显著差异 ( $P < 0.05$ ) 与极显著差异 ( $P < 0.001$ );*P65* 基因在攻毒感染过程中,未选育组均高于选育组,并在 48 ~ 192 h 达到极显著差异 ( $P < 0.01$ ),在 240 ~ 288 h 达到显著差异 ( $P < 0.05$ )。



标记 \* 表示组内存在显著性差异 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )。

The different \* indicate significant differences with in groups (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

图5 选育组与未选育组 *IRF5* 与 *P65* 基因相对表达量情况

Fig. 5 Relative expression levels of *IRF5* and *P65* in breeding strain and non-breeding strain

### 3 讨论

TLRs 属于模式识别受体 (Pattern-recognition receptors, PRRs), 在先天免疫反应中具有重要的作用。除 TLR2/3/4 通过不依赖 MyD88 途径参与信号转导<sup>[22]</sup>外, 其他 TLRs 均通过 MyD88 途径进行信号转导<sup>[23]</sup>。在依赖 MyD88 途径中, *MyD88* 基因可以招募 *TRAF6* 基因, 从而后激活下游 NF- $\kappa$ B 和/或 IRFs 基因参与信号转导诱导炎症因子和 I 型干扰素的产生, 最终调控机体相关免疫反应<sup>[24-25]</sup>。目前关于 *TLR18* 基因在细菌感染过程中的模式已被研究证明, 但在 CyHV-3 感染过程中的免疫调节模式尚不明确。

有研究<sup>[7]</sup>发现草鱼 *TLR18* 基因相对表达量在受 GCRV 感染后在头肾及肠组织中显著上调, 在脾脏组织中却显著下调。鲤经 LPS 刺激后, *TLR18* 基因表达量显著升高<sup>[5]</sup>。梭鱼 *TLR18* 基因在停乳链球菌感染后, 在不同组织中的表达不尽相同<sup>[26]</sup>。上述研究表明 *TLR18* 基因参与鱼类相关免疫反应。本文发现镜鲤受 CyHV-3 感染后, 在脾脏组织中鲤 *TLR18* 基因相对表达量呈先升高后降低趋于平稳的趋势, 且在未攻毒感染时, 未选育组 *TLR18* 基因相对表达量极显著高于选育组 ( $P < 0.001$ ), 推测 *TLR18* 基因与 CyHV-3 感染有关。

*MyD88* 与 *TRAF6* 基因属于 TLRs 家族成员的关键衔接分子, 在哺乳动物中, *TRAF6* 基因的缺失会导致依赖 MyD88 途径的 TLRs 信号通路失活, 下调相关下游因子的表达<sup>[27-28]</sup>。在模式生物斑马鱼中, *MyD88* 基因与 *TRAF6* 基因已经被证实 TLRs 的先天免疫过程中具有重要的作用<sup>[29]</sup>。

同样在鱼类中, *MyD88* 基因与 *TRAF6* 基因在病原性入侵的免疫防御中发挥重要作用, 且在 TLRs 相关免疫应答反应中具有不可或缺的作用<sup>[30-33]</sup>。本研究发现, 在两组鱼感染 CyHV-3 早期, *MyD88*、*TRAF6* 基因相对表达量在选育组中均显著高于未选育组, 且在两组鱼间均呈先上升后降低并趋于平稳的趋势, 并在 48 h 达到了最高。由此推测鲤 *TLR18* 基因可能通过 *MyD88* 基因募集 *TRAF6* 基因参与 CyHV-3 感染的先天免疫反应过程。

在 TLRs-MyD88-TRAF6 途径被激活后, 可激活下游 IRFs 和/或 NF- $\kappa$ B 产生抗病毒反应和/或炎症反应参与机体应答<sup>[34-37]</sup>。*IRF5* 基因是 IRFs 家族的成员<sup>[38]</sup>, *P65* 基因是 NF- $\kappa$ B 的标志蛋白<sup>[39-40]</sup>, 二者在抗病毒反应<sup>[41-42]</sup>及炎症反应<sup>[43-44]</sup>中具有不可或缺的作用。本文发现经 CyHV-3 感染后, *IRF5* 基因相对表达量在两组鱼中均呈先升高后降低并恢复平稳的趋势, 并在 48 h 达到最高, *P65* 基因相对表达量在未选育组中呈先升高后降低并恢复到初始水平的趋势, 并在 48 h 达到了最高, 而在选育组中 *P65* 基因相对表达量呈先下降而后恢复到初始差异的趋势, 并在机体自身水平相对表达量最高。推测在 CyHV-3 感染过程中, 选育组和未选育组 *IRF5* 基因均被激活, 且均参与抗病毒反应, 而在 NF- $\kappa$ B 信号通路中, 未选育组被显著激活, 而在选育组中, NF- $\kappa$ B 信号通路未被激活。有研究<sup>[45]</sup>表明免疫基因的变化差异及表达量越高说明机体的免疫应答更为强烈。JIA 等<sup>[21]</sup>研究结果显示, 两组鱼在 CyHV-3 感染后, 未选育组中肾脏肿大程度明显高于选育组, 说明未选育组产生较为严重的炎症反应, 选育组

产生轻度的炎症反应;且未选育组死亡率极显著高于选育组,并均在 144 h 达到最高。本研究结果显示:两组鱼在未攻毒感染时,*IRF5* 基因相对表达量在选育组中低于未选育组,并达到了极显著差异( $P < 0.01$ ),而在 48 h、96 h,选育组中表达量反而高于未选育组,并达到显著差异( $P < 0.05$ );*P65* 基因相对表达量除 0 h 时选育组中极显著高于未选育组外( $P < 0.01$ ),其余时期均低于未选育组并达到差异水平。推测在 CyHV-3 感染过程中,在基因水平上,选育组较未选育组在先天免疫过程中通过 *IRF5* 基因产生抗病毒的过程更为强烈,同时未选育组较选育组通过 NF- $\kappa$ B 信号通路产生较为严重的炎症反应,这可能是选育组较未选育组病毒载量降低且抗病性提高的原因。

综上,本实验在基因水平上,推测鲤感染 CyHV-3 过程中 *TLR18* 基因通过 *MyD88* 基因招募 *TRAF6* 基因后在产生 *IRF5* 基因清除病毒的同时激活 NF- $\kappa$ B 信号通路使机体产生炎症反应,选育组比未选育组通过 *IRF5* 基因产生抗病毒的过程更为强烈,而未选育组比选育组通过 NF- $\kappa$ B 信号通路产生严重的炎症反应。研究结果不仅验证了本实验所用选育组在机体自身水平及先天免疫应答过程中对 CyHV-3 抗性的增强,还为进一步研究选育组抗病机制及鱼类 TLRs 在病毒感染中的相关表达模式及信号转导提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] MAGNADÓTTIR B. Innate immunity of fish (Overview)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 137-51.
- [2] ZHANG J, KONG X H, ZHOU C J, et al. Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: ligand specificity and signal pathways [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 380-388.
- [3] 龙钟明,王利,苟小兰,等. Toll 样受体在鱼类中的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(1): 191-193.  
LONG Z M, WANG L, GOU X L, et al. Research progress of Toll receptors in fish [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(1): 191-193.
- [4] RAJ K J, UMA A, REBECCA G, et al. Basal expression of toll-like receptor 18 (TLR18) mRNA in selected species of food fishes of India[J]. *Indian Veterinary Journal*, 2013, 90(7): 30109.
- [5] SHAN S J, LIU D Z, LIU R R, et al. Non-mammalian toll-like receptor 18 (Tlr18) recognizes bacterial pathogens in common carp (*Cyprinus carpio* L.): indications for a role of participation in the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 187-198.
- [6] MEIJER A H, KRENS S F G, RODRIGUEZ I A M, et al. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish [J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40(11): 773-783.
- [7] 黄文吉. 草鱼 TLR 基因鉴定及三个 TLR 基因免疫功能初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.  
HUANG W J. Identification of TLR genes and preliminary study on immune function of three TLR genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [8] ZHANG J R, LIU S K, RAJENDRAN K V, et al. Pathogen recognition receptors in channel catfish: III phylogeny and expression analysis of toll-like receptors [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 40(2): 185-194.
- [9] XIANG L X, HE D, DONG W R, et al. Deep sequencing-based transcriptome profiling analysis of bacteria-challenged *Lateolabrax japonicus* reveals insight into the immune-relevant genes in marine fish [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 472.
- [10] LEE P T, ZOU J, HOLLAND J W, et al. Identification and characterisation of *TLR18-21* genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 549-559.
- [11] QI Z T, XU Y, WANG X, et al. Structural analysis of toll-like receptor 18 from soiny mullet (*Liza haematocheila*): giving insights on the ligand binding mechanism of fish specific TLRs [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 107: 490-496.
- [12] 韦信贤. 鲤鱼 TLRs 功能及鲤春病毒血症病毒感染后免疫相关基因应激表达机制的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.  
WEI X X. Research on TLRs and immune-related genes expression profiles of common carp infected with spring viremia of carp virus [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [13] 陈晓慧. 草鱼 TLR8 基因的克隆及其功能表达的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.  
CHEN X H. Molecular cloning and functional expression of TLR8 gene from grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2014.
- [14] FRM, DWG, KPM, et al. Characterization of Toll-like Receptor 3 Gene in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Immunogenetics*, 2005, 57(7): 510-519.
- [15] DE MARCKEN M, DHALIWAL K, DANIELSEN A C, et al. TLR7 and TLR8 activate distinct pathways in monocytes during RNA virus infection [J]. *Science Signaling*, 2019, 12(605): eaaw1347.
- [16] TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 805-820.
- [17] 祝雅晨,张杰,赵贤亮,等. 鱼类 Toll 样受体对病毒的识

- 别、响应及信号传导[J]. 水产科学, 2019, 38(1): 135-144.
- ZHU Y C, ZHANG J, ZHAO X L, et al. Recognition, responses and signal transduction of Toll-like receptors in fish to virus[J]. Fisheries Science, 2019, 38(1): 135-144.
- [18] HEDRICK R P, GILAD O, YUN S, et al. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2000, 12(1): 44-57.
- [19] 白姗姗, 贾智英, 郎延贺, 等. CyHV-3 感染镜鲤选育世代免疫基因表达及抗病能力比较[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(5): 651-657.
- BAI S S, JIA Z Y, LANG Y H, et al. Comparisons of the immune gene expression and disease resistance between mirror carp breeding generations after CyHV-3 infection[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(5): 651-657.
- [20] 孙佳鑫, 石连玉, 姜晓娜, 等. 镜鲤抗疱疹病毒(CyHV-3) F<sub>4</sub> 抗病品系病毒表达量评估[J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(2): 258-265.
- SUN J X, SHI L Y, JIANG X N, et al. Research on expression of virus in Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) F<sub>4</sub> disease resistant strains [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2021, 30(2): 258-265.
- [21] JIA Z Y, WU N, JIANG X N, et al. Integrative transcriptomic analysis reveals the immune mechanism for a CyHV-3-resistant common carp strain[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 687151.
- [22] PÅLSSON-MCDERMOTT E M, O' NEILL L A J. The potential of targeting toll-like receptor 2 in autoimmune and inflammatory diseases[J]. Irish Journal of Medical Science, 2007, 176(4): 253-260.
- [23] 袁伟, 戴习林, 戈潘缘元, 等. RNA 干扰不同类型 TLR 基因对罗氏沼虾免疫相关基因表达的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(4): 590-600.
- YUAN W, DAI X L, GE-PAN Y Y, et al. Effects of RNA interferences with different Toll-like receptors on the expression of immune-related genes in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2021, 30(4): 590-600.
- [24] 邱丽梅. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) Toll 样受体及其信号传递相关基因的克隆与表达[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2006.
- QIU L M. Cloning and expression of Toll-like Receptor and its signaling related genes in *Chlamys farreri*[D]. Qingdao: Graduate University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2006.
- [25] 李育媚, 廖永冠, 鲍宝龙. 2-甲基异茨醇对斑马鱼氧化磷酸化及免疫相关基因表达的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(2): 309-317.
- LI Y M, LIAO Y G, BAO B L. Effects of exposure to 2-methylisoborneol on oxidative phosphorylation and immune-related genes expression in zebrafish[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(2): 309-317.
- [26] 王思思, 徐杨, 张启焕, 等. 梭鱼 TLR18 基因克隆及表达分析[J]. 海洋渔业, 2020, 42(4): 385-393.
- WANG S S, XU Y, ZHANG Q H, et al. Gene clone and expression analysis of TLR18 from *Liza haematocheila* [J]. Marine Fisheries, 2020, 42(4): 385-393.
- [27] LUTGENS E, LIEVENS D, BECKERS L, et al. Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile[J]. Journal of Experimental Medicine, 2010, 207(2): 391-404.
- [28] WU H, ARRON J R. TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology [J]. BioEssays, 2003, 25(11): 1096-1115.
- [29] 徐行, 王子睿, 刘何奕, 等. 斑马鱼 Myd88 和 Traf6 真核表达载体的构建[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(4): 1488-1496.
- XU X, WANG Z R, LIU H Y, et al. Construction of eukaryotic expression vectors for myd88 and traf6 from Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Genomics and Applied Biology, 2021, 40(4): 1488-1496.
- [30] DEEPIKA A, SREEDHARAN K, PARIJA A, et al. Toll-pathway in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) responds to white spot syndrome virus infection: evidence through molecular characterisation and expression profiles of MyD88, TRAF6 and TLR genes[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 41(2): 441-454.
- [31] TRAN N T, LIU H, JAKOVLIĆ I, et al. Blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) MyD88 and TRAF6: characterisation, comparative homology modelling and expression[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(4): 7077-7097.
- [32] KONGCHUM P, HALLERMAN E M, HULATA G, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of TLR9, MyD88 and TRAF6 genes in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(1): 361-371.
- [33] ZHANG J, ZHU Y C, CHEN Z, et al. Molecular cloning and expression analysis of MyD88 and TRAF6 in Qihe Crucian carp *Carassius auratus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 87: 829-838.
- [34] KAWAI T, AKIRA S. Signaling to NF- $\kappa$ B by Toll-like receptors [J]. Trends in Molecular Medicine, 2007, 13(11): 460-469.
- [35] 李银平. 草鱼 Traf6 通过激活 Irf5 上调 Ifn1 的表达[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- LI Y P. *Ctenopharyngodon idella* TRAF6 Up-regulates IFN1 expression by activating IRF5 [D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.
- [36] 高峰, 王兵, 赵瑞苓, 等. TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路在真菌性角膜炎中的表达和作用[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(2): 237-241.

- GAO F, WANG B, ZHAO R L, et al. Expression and role of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway in patients with fungal keratitis[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2022, 32(2): 237-241.
- [37] KAWAI T, SATO S, ISHII K J, et al. Interferon- $\alpha$  induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6 [J]. Nature Immunology, 2004, 5(10): 1061-1068.
- [38] D L, Y X, S Z. Interferon Regulatory Factor 5 Regulates the Neuro-Inflammatory Response by the MyD88/TRAF6 Signaling Pathway and Affects the Early Outcomes of Experimental Ischemic Stroke in Mice [C]. 第十七届国际免疫学大会, 北京, 2019.
- [39] YU G, MU H, ZHOU H Y, et al. MicroRNA-361 suppresses the biological processes of hepatic stellate cells in HBV-related hepatic fibrosis by NF-kappaB P65 [J]. Cells & Development, 2021, 167: 203711.
- [40] 姚昀, 刘克海, 胡晓倩. 紫檀芪影响脂多糖诱导巨噬细胞炎症因子的变化[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(1): 29-36.
- YAO Y, LIU K H, HU X Q. Effects of pterostilbene on lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine expression in macrophages[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(1): 29-36.
- [41] ZHAO F, LI Y W, PAN H J, et al. Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) TRAF6 and TAK1: molecular cloning and expression analysis after *Ichthyophthirius multifiliis* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(6): 1514-1523.
- [42] LYU H, LI J, CHE Y Q. MiR-31 from adipose stem cell-derived extracellular vesicles promotes recovery of neurological function after ischemic stroke by inhibiting TRAF6 and IRF5[J]. Experimental Neurology, 2021, 342: 113611.
- [43] LI C T, ZHANG M D, GUAN X M, et al. Herpes simplex virus type 2 glycoprotein D inhibits NF- $\kappa$ B activation by interacting with P65 [J]. Journal of Immunology, 2021, 206(12): 2852-2861.
- [44] IQUBAL A, SYED M A, ALI J, et al. Nerolidol protects the liver against cyclophosphamide-induced hepatic inflammation, apoptosis, and fibrosis via modulation of Nrf2, NF- $\kappa$ B P65, and caspase-3 signaling molecules in Swiss albino mice [J]. BioFactors, 2020, 46(6): 963-973.
- [45] 杨华, 杨永林. 基于主成分分析法建立绵羊一般抗病力的评估模型[J]. 中国草食动物科学, 2015, 35(3): 1-5.
- YANG H, YANG Y L. Assessment model of general disease resistance with principal component analysis in sheep [J]. China Herbivore Science, 2015, 35(3): 1-5.

## Expression pattern and related signal pathway of *TLR18* in CyHV-3 infection of cyprinid carp

REN Wanying<sup>1,2,3</sup>, JIANG Xiaona<sup>2</sup>, GE Yanlong<sup>2</sup>, TIAN Lijing<sup>2</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, LI Chitao<sup>2</sup>, TIAN Jingwen<sup>2</sup>, HU Xuesong<sup>2</sup>, SHI Xiaodan<sup>2</sup>, SHI Lianyu<sup>2</sup>, JIA Zhiying<sup>1,2</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Harbin 150070, Heilongjiang, China; 3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The expression patterns of *TLR18*, *MyD88*, and corresponding ligand *TRAF6*, downstream factor *IRF5*, and *P65* in spleen tissues of breeding strain F<sub>4</sub> and German mirror carp were determined by RT-PCR. The difference of related genes in disease resistance mechanism between breeding strain F<sub>4</sub> and German mirror carp was analyzed. The results show: the expression of *TLR18*, *MyD88*, *TRAF6*, and *IRF5* showed the same trend between the two groups, which increased first, then decreased and stabilized, and reached the highest at 48 h, while the relative expression of *P65* in non-breeding strain increased first, then decreased and recovered to the initial level, and reached the highest at 48 h. In breeding strain, the expression trend decreased and then recovered to the initial level. The relative expression of *TLR18* and *IRF5* in breeding strain was significantly lower than that in the non-breeding strain without CyHV-3 infection. The relative expression levels of *MyD88*, *TRAF6*, and *P65* in breeding strain were significantly higher than those in non-breeding strain. At the early stage of CyHV-3 infection, the relative expression levels of *TLR18* and *P65* in breeding strain were significantly lower than those in non-breeding strain, while the relative expression levels of *MyD88*, *TRAF6*, and *IRF5* in breeding strain were significantly higher than those in non-breeding strain. It is speculated that during CyHV-3 infection, *TLR18* generated *IRF5* by binding to *TRAF6* through the *MyD88* pathway, which cleared the virus and activated the NF- $\kappa$ B signaling pathway to produce inflammatory factors. In breeding strain, more *IRF5* was produced and the NF- $\kappa$ B signaling pathway was not significantly activated to resist the virus. This result may be related to breeding. These results not only verified the improvement of CyHV-3 resistance in breeding strain in the body basic condition and innate immunity but also laid a foundation for further study of the role of fish TLRs in the process of virus infection and related signaling pathways.

**Key words:** common carp; *TLR18*; CyHV-3; breeding