

文章编号: 1674-5566(2020)02-0171-09

DOI:10.12024/jso.20190302560

斑马鱼肿瘤坏死因子(*tnf α*)及其受体(*tnfrsf1a*)应答细菌和病毒感染的表达

田佳音, 陈康勇, 张 畅, 宋云杰, 高 谦, 邹 钧

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘 要: 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, Tnf)作为重要的炎症因子,在抵抗细菌和病毒感染以及清除被感染的细胞等方面发挥着重要的作用。对斑马鱼进行腹腔注射免疫刺激物、细菌和病毒病原,并采用荧光定量 PCR 技术分析 *tnf α* 及其受体[*tnf* receptor superfamily(*tnfrsf*) member 1a]在肾脏和脾脏中的表达。实验结果显示:*tnf α* 和 *tnfrsf1a* 在斑马鱼各组织中均有常量表达。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和聚肌苷酸-聚胞苷酸[polyinosinic acid-polycytidylic acid, poly(I:C)]能够调控肾脏和脾脏中 *tnf α* 和 *tnfrsf1a* 的表达。腹腔注射嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染斑马鱼后, *tnf α* 在脾脏(48 h 和 72 h)和肾脏(72 h)中表达显著升高; *tnfrsf1a* 在脾脏(48 h)表达水平也有显著上调。在注射迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)的斑马鱼中,肾脏的 *tnf α* 表达显著增加,但在脾脏的表达则完全被抑制; *tnfrsf1a* 基因在脾脏和肾脏(6 h 和 72 h)有明显上调。鲤春病毒血症病毒(spring viraemia of carp virus, SVCV)感染斑马鱼后, *tnf α* 和 *tnfrsf1a* 在感染早期表达量有显著升高;而且在感染 1~7 d 中,肾脏的 *tnfrsf1a* 始终维持高水平诱导表达。实验结果表明: *tnf α* 和 *tnfrsf1a* 在鱼类抵抗细菌和病毒感染过程中发挥重要作用。

关键词: 斑马鱼; 肿瘤坏死因子; 肿瘤坏死因子受体超级家族成员 1a; 表达; 细菌; 病毒

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, Tnf)是 40 年前 CARSWELL 等^[1]在接种卡介苗(BCG)的小鼠注射 LPS 的血清中分离的一种能够杀伤肿瘤细胞或使体内肿瘤组织出现坏死的细胞因子,多年的研究表明, Tnf 在机体的防御反应、炎症反应、促进细胞增殖分化以及杀伤或抑制肿瘤细胞中发挥重要作用^[1-3]。 Tnf 通过激活细胞膜上的特异性受体发挥生物学功能。目前 Tnf 受体超家族(Tnf receptor superfamily, Tnfrsf)在高等脊椎动物中得到了广泛研究,研究^[4]表明人类含有 29 个 Tnfrsf 成员, *tnf α* 的信号传导由 Tnfr1(Tnfrsf1a)或 Tnfr2(Tnfrsf1b)两个受体完成。 *Tnfrsf1a* 几乎在所有细胞中表达,而 *tnfrsf1b* 仅限于在一些免疫细胞中表达。 Tnfrsf1a 胞内含有一个典型的死亡结构域(death domain),被 *Tnf α* 激活后能够招募下游信号因子,调控 NF-KB 和 JNK/SAPK 途径促

进细胞增殖^[5-6]。另一方面, Tnfrsf1a 能够激活 Tnf 受体相关死亡结构域(Tnf receptor-associated death domain, TRADD)和 Fas 相关死亡结构域(Fas-associated death domain, FADD)介导的死亡诱导信号,激活 caspase 3、6 和 7,诱导细胞凋亡^[7-9]。与 Tnfrsf1a 相比, Tnfrsf1b 只在部分信号通路中发挥作用。

目前 *tnf α* 基因在多种鱼类中得到了克隆和鉴定^[10-16]。研究^[17]表明,鱼类的 *tnf α* 基因结构与哺乳动物同源基因基本一致,蛋白结构也具有 Tnf 家族的典型特征^[18];而且,鱼类 Tnf α 与哺乳动物的 Tnf α 在生物学功能上存在许多相似之处^[10]。功能实验表明 Tnf α 重组蛋白可以诱导鱼类细胞凋亡^[9,17],增强白细胞的迁移与吞噬活性^[11,19],诱导促炎症因子的表达,促进胸腺细胞的增殖和一氧化氮(NO)的生成和细胞增

收稿日期: 2019-03-19 修回日期: 2019-08-23

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0900302-4)

作者简介: 田佳音(1990—),女,硕士研究生,研究方向为鱼类免疫学与病害防控。E-mail: jytian123@126.com

通信作者: 邹 钧, E-mail: jzhou@shou.edu.cn

殖^[11-12,20]。*Tnf α* 在细菌和病毒感染后呈现差异表达^[10,21-23],表明其在免疫防御中发挥重要作用。如将斑马鱼的 *tnf* 基因敲除后,其对分枝杆菌的易感性增加^[24];病毒性出血败血症病毒(viral haemorrhagic septicemia virus, VHSV)和传染性造血器官坏死病毒(infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV)能够诱导 *tnf α* 表达^[25]。本研究通过腹腔注射免疫刺激物和病原,比较分析 LPS、胞内菌迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、胞外菌嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、poly(I:C)和鲤春病毒血症病毒(spring viraemia of carp virus, SVCV)对斑马鱼 *tnf α* 和 *tnfrsf1a* 在免疫器官(肾脏和脾脏)中的动态表达,为进一步研究宿主应答细菌和病毒感染的免疫反应机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物

AB 品系野生型斑马鱼购自中国科学院水生生物研究所斑马鱼资源中心,在本实验室斑马鱼养殖系统 28 °C 饲养 1 个月。所有动物实验严格遵守国家和上海市有关实验动物工作管理法规并通过上海海洋大学动物实验伦理委员会审核批准。

1.1.2 菌株和毒株

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购买自北京全式金生物技术有限公司,SVCV 由中国科学院水生生物研究所昌鸣先老师赠送^[26],迟缓爱德华氏菌由中国科学院水生生物研究所谢海侠老师赠送^[27],嗜水气单胞菌由中国科学院水生生物研究所李爱华老师赠送^[28]。

1.1.3 主要试剂

ExTaq Mix、PMD19-T 和 DNA marker 购自 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶和 DNA 回收试剂盒购自 Omega 公司;异丙醇、氯仿和乙醇购自国药集团化学试剂有限公司;Trizol 购自 Invitrogen;逆转录试剂盒[Hifair[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA digester plus)]和 qPCR 试剂盒(UNICON[®] qPCR SYBR Green Master MixqPCR)购自上海翊圣生物科技有限公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、聚肌苷酸-聚胞苷酸[polyinosinic acid-polycytidylic acid, poly(I:C)]、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)和

间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(3-Aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate, MS-222) 购自 Sigma 公司。

1.2 方 法

1.2.1 斑马鱼攻毒实验

斑马鱼(体长约 3 cm,体质量约 0.25 g)在 28 °C 养殖系统中饲养 1 个月,实验前 1 天停止喂食。斑马鱼在 0.05% MS-222 的水中进行麻醉后,每尾鱼注射 10 μ L 刺激物或病原,分别在不同的时间点解剖取脾脏和肾脏组织,并将组织置于 1 mL Trizol 中,用组织破碎仪(QIAGEN)破碎,放置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 引物设计与合成

根据美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库公布的斑马鱼 *tnf α* (NCBI 登录号:NM_212859.2)和 *tnfrsf1a* 基因(NCBI 登录号:NM_213190.1)顺序,在编码区设计跨内含子的引物用于检测基因表达,进行荧光定量 PCR(qPCR)分析(表 1)。引物合成和基因测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2.3 斑马鱼 *tnf α* 和 *tnfrsf1a* 基因的组织表达分析

取 30 尾健康斑马鱼,随机分成 3 组,每组 10 尾鱼。解剖后分别取肾脏、脾脏、鳃、肠、皮肤和肝组织,置于 1 mL Trizol 溶液中,用组织破碎仪破碎 2 min,用 Trizol 试剂提取总 RNA,按照 Hifair[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书制备 cDNA 模板。用 qPCR 检测 *tnf α* 和 *tnfrsf1a* 基因在各组织的表达情况。

1.2.4 LPS 和 poly(I:C)刺激实验

注射处理预准备详见 1.2.1 节,分别用 10 μ L 100 μ g/mL LPS 或 poly(I:C)对斑马鱼进行腹腔注射^[29-30],对照组注射 10 μ L PBS。在注射后 12、24、48 和 72 h 分别取脾脏和肾脏,放于 1 mL Trizol 中,每个时间点设计 3 个生物学重复样本,每个样本为 10 尾鱼的组织混合。有机溶剂法提取总 RNA,严格按照 Hifair[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书制备 qPCR 模板,qPCR 检测 *tnf α* 和 *tnfrsf1a* 基因的表达情况。

1.2.5 迟缓爱德华氏菌感染实验

将迟缓爱德华氏菌菌种从 -80 °C 冰箱中取出,用枪头挑取少量菌液放入 1 mL 胰蛋白胨大

豆肉汤培养基(TSB)中,28 ℃振荡活化2 h,涂平板(胰蛋白胨大豆琼脂培养基,TSA),挑取单克隆,通过DNA促旋酶B亚单位蛋白(*gyrB*)验证(表1)^[31]。将阳性菌落接种到1 mL TSB培养基中,在28 ℃培养箱中160 r/min振荡培养过夜。按照1:100转接至新鲜TSB培养基中,在培养箱中振荡培养至OD₆₀₀为0.6~0.8,4 000 r/min离心5 min,弃上层清液,用无菌PBS洗涤1次,加入5 mL PBS悬浮细菌,并用PBS稀释菌液,稀释梯度为10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷和10⁻⁸,分别取0.2 mL菌液涂平板,每个梯度5个重复(剩余PBS悬浮菌液放入4 ℃冰箱)。取菌落数在10~100之间的平板进行计数,计算原菌液浓度为4.6 × 10⁷ CFU/mL。经预实验选取感染且不致死的菌液浓度,感染过程中实验组鱼未出现明显的感染症状。取10 μL稀释梯度为10⁻²的菌液(4.6 × 10⁵ CFU/mL)对斑马鱼进行腹腔注射,对照组注射相同体积的PBS。在12、24、48和72 h时取肾脏和脾脏组织,放入1 mL Trizol中,提取总RNA,按照Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书制备cDNA模板,利用qPCR检测*tnf α* 和*tnfrsf1a*基因的表达。

1.2.6 嗜水气单胞菌感染实验

实验前处理详见1.2.1节,菌落计数确定原菌液浓度步骤同1.2.5节。取10 μL菌液浓度为4.5 × 10⁴ CFU/mL的嗜水气单胞菌,对斑马鱼进行腹腔注射,对照组注射相同体积的PBS,实验过程中实验组鱼未出现明显的感染症状。在6、12、24和48 h时取肾脏和脾脏组织,放入1 mL Trizol中,提取总RNA,按照Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书制备cDNA模板,利用qPCR检测*tnf α* 和*tnfrsf1a*基因的表达。

1.2.7 鲤春病毒血症病毒感染实验

实验前处理详见1.2.1节,每条成年斑马鱼腹腔注射10 μL浓度为1 × 10⁷ TCID₅₀/mL的SVCV,对照组用相同体积的DMEM处理,实验组鱼在感染5 d后出现脾脏充血肿大,且伴有内脏出血现象。分别在1、3、5、7和15 d取肾脏和脾脏组织,放于1 mL Trizol中,提取总RNA,按照Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书制备qPCR模板,qPCR检测*tnf α* 和*tnfrsf1a*基因的表达情况。

1.2.8 荧光定量数据处理

根据基因的编码开放阅读框和基因组序列设计跨外显子的qPCR引物(表1),用ExTaq酶扩增基因片段,琼脂糖凝胶DNA回收(严格按照Omega公司试剂盒说明书操作),用Nanodrop 2 000超微量紫外分光光度计(Thermo Scientific)测定核酸浓度,进行10倍连续稀释8个梯度。采用荧光SYBR Green核酸染色方法测定基因的Ct值(按照UNICON® qPCR SYBR Green Master Mix说明书操作)。qPCR在荧光定量仪器LightCycler® 96(Roche)上进行,程序如下:1个循环:95 ℃/30 s;40个循环:变性95 ℃/5 s,退火62 ℃/30 s,延伸72 ℃/10 s;1个循环:95 ℃/10 s,65 ℃/60 s,97 ℃/20 s。以log₁₀(拷贝数)为横坐标,Ct值为纵坐标制作目标基因和内参基因(Elongation factor 1 alpha,*ef1 α*)的标准曲线。计算实验组与对照组mRNA拷贝数的比值(fold change),用T检验法进行分析数据间差异性的显著程度,*P* < 0.01(用*表示)和*P* < 0.001(用**表示)分别表示差异显著和差异极显著。采用Graphpad prism软件进行图片制作和编辑。

2 结果

2.1 斑马鱼*tnf α* 、*tnfrsf1a*的组织表达分析

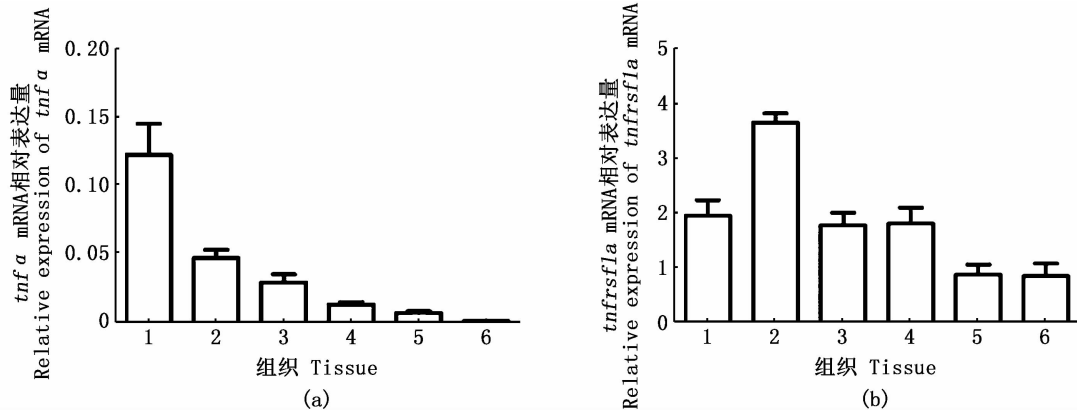
本研究选用*ef1 α* 为内参基因进行荧光定量分析,计算目的基因相对表达量(图1)。结果显示*tnf α* 和*tnfrsf1a*基因在健康斑马鱼的肾脏、脾脏、皮肤、肠、鳃和肝6个组织中均有表达;*tnf α* 基因在肠和肝脏两组织中表达量极低,在肾脏、鳃和皮肤3个组织中高量表达。*tnfrsf1a*在所有组织中的表达量均显著高于*tnf α* ,其中在鳃中表达量最高。

2.2 LPS和poly(I:C)刺激实验

本研究用10 μL 100 μg/mL LPS或poly(I:C)对斑马鱼进行腹腔注射,在12、24、48和72 h取脾脏和肾脏,荧光定量检测*tnf α* 和*tnfrsf1a*基因的表达情况(图2)。结果显示,通过LPS刺激后,肾脏*tnf α* 表达在24 h和72 h有显著上调;脾脏*tnf α* 表达在24 h和48 h下降,但在72 h显著上升。肾脏*tnfrsf1a*表达量在12 h相对于对照组上升了7倍,但随后下降;脾脏*tnfrsf1a*表达除24 h出现下降外,在其他时间点均有显著升高。在poly(I:C)刺激后,肾脏*tnf α* 在所有取样时间

点均显著上调;脾脏 *tnfα* 表达在刺激 12 h 和 72 h 显著上调,在 24 h 和 48 h 显著下调。肾脏

tnfrsf1a 表达在感染前期(12 h 和 24 h)受到抑制,在 48 h 和 72 h 显著升高。



1. 肾脏; 2. 鳃; 3. 皮肤; 4. 脾脏; 5. 肝; 6. 肠
1. Kidney; 2. Gill; 3. Skin; 4. Spleen; 5. Liver; 6. Intestine

图 1 斑马鱼 *tnfα* 和 *tnfrsf1a* 基因在不同组织中的表达 (n = 3)

Fig. 1 Expression of *tnfα* and *tnfrsf1a* in zebrafish tissues (n = 3)

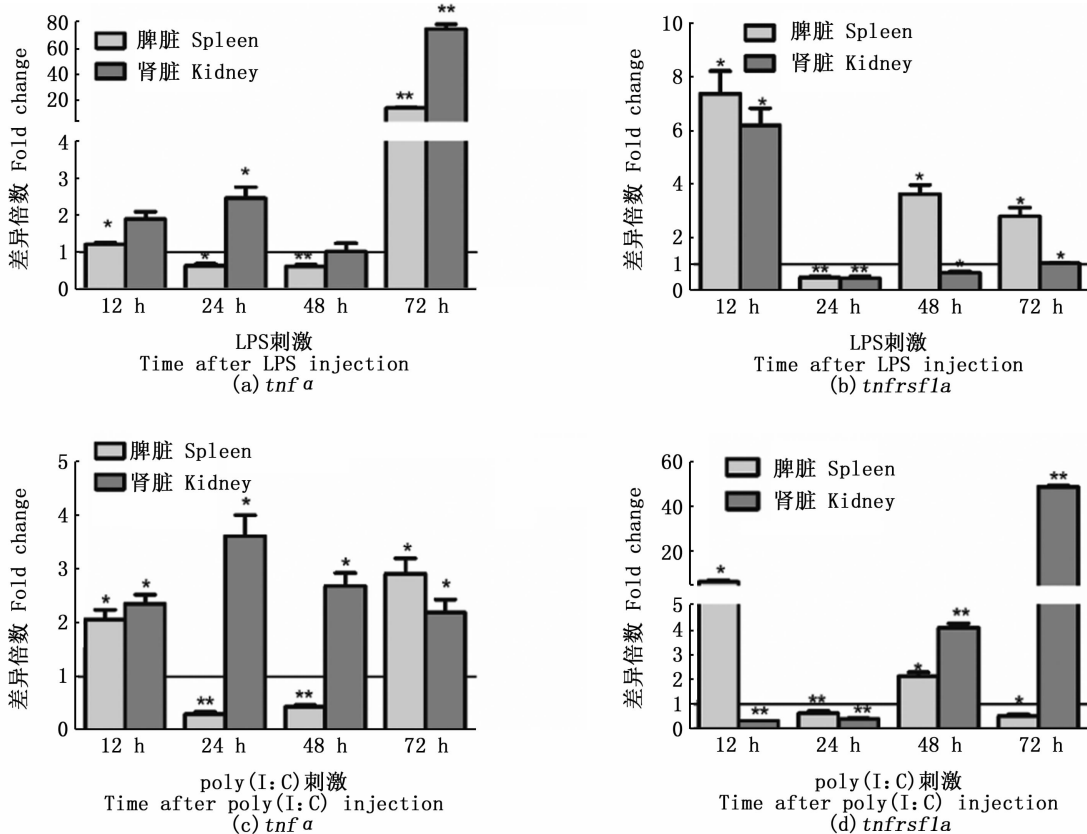
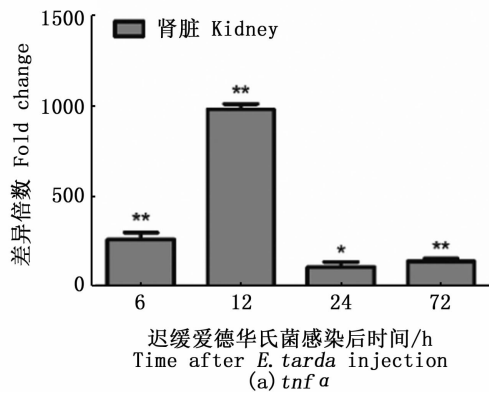


图 2 LPS 和 poly(I:C) 刺激斑马鱼后 *tnfα* 和 *tnfrsf1a* 在脾脏和肾脏中的表达

Fig. 2 Expression of *tnfα* and *tnfrsf1a* in spleen and kidney after i. p. injection with LPS or poly(I:C)

2.3 迟缓爱德华氏菌感染实验

用浓度为 4.6×10^5 CFU/mL 的迟缓爱德华氏菌液腹腔注射斑马鱼 (10 μ L), 对照组注射相同体积的 PBS。在 6、12、24 和 72 h 取肾脏和脾脏组织, 荧光定量检测 *tnfα* 和 *tnfrsf1a* 基因的表达, 结果表明, 在被感染的斑马鱼脾脏中无法检测到 *tnfα* 的表达。但在肾脏中 *tnfα* 表达在各个时间点都显著升高, 在 12 h 升高达 1 000 倍。*tnfrsf1a* 基因在脾脏和肾脏中 6 h 和 72 h 均明显上调。在肾脏中上调倍数远大于脾脏, 在肾脏中最高上调倍数近 1 600 倍。见图 3。



2.4 嗜水气单胞菌感染实验

用 10 μ L 浓度为 4.5×10^4 CFU/mL 的嗜水气单胞菌腹腔注射斑马鱼, 在 6、12、24 和 48 h 取肾脏和脾脏组织, 荧光定量检测 *tnfα* 和 *tnfrsf1a* 基因的表达情况, 结果表明在感染 24 h 和 48 h 后, *tnfα* 基因在脾脏中表达水平显著上调, 在肾脏中仅 48 h 有显著上调; 在脾脏中的上调倍数远大于在肾脏中的上调倍数, 在脾脏中最高 (上调 18 倍)。*tnfrsf1a* 基因在脾脏 (12 h) 和肾脏 (24 h) 有显著上调。在脾脏中有较高上调倍数, 上调的最大倍数是 8 倍。见图 4。

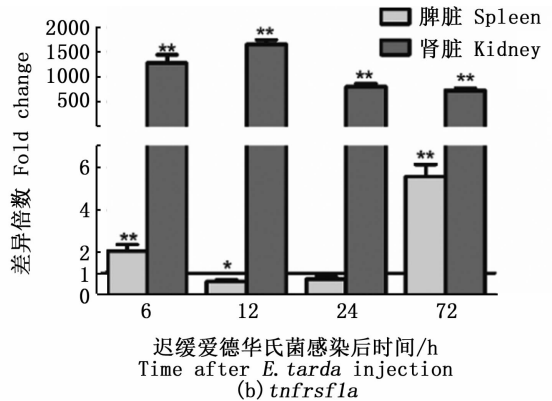


图 3 迟缓爱德华氏菌感染斑马鱼后, *tnfα* (a) 和 *tnfrsf1a* (b) 基因在脾脏和肾脏中的表达

Fig. 3 Expression of *tnfα* (a) and *tnfrsf1a* (b) in spleen and kidney after i. p. injection with *E. tarda*

2.5 鲤春病毒血症病毒感染实验

用 10 μ L 浓度为 1×10^7 TCID₅₀/mL 的 SVCV 病毒腹腔注射斑马鱼, 分别在 1、3、5、7 和 15 d 取肾脏和脾脏组织, 荧光定量检测 *tnfα* 和 *tnfrsf1a*

基因的表达。实验结果表明: 在肾脏中 *tnfα* 和 *tnfrsf1a* 表达在第 1~15 天均有明显上调, 而脾脏中 *tnfα* 表达只在第 1 天升高, *tnfrsf1a* 表达在第 1 天、第 3 天和第 15 天有明显上调。见图 5。

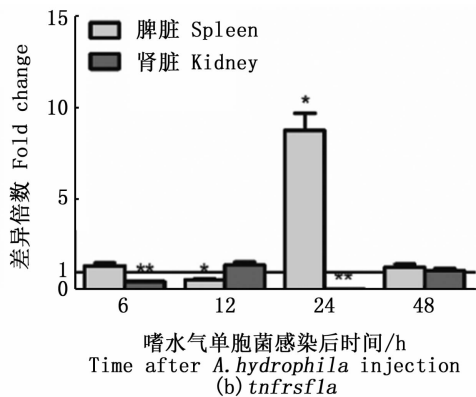
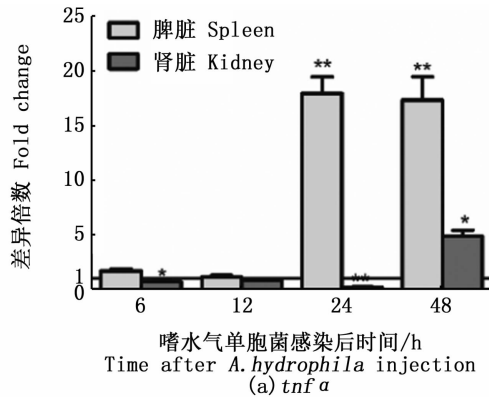


图 4 嗜水气单胞菌感染斑马鱼后, *tnfα* (a) 和 *tnfrsf1a* (b) 基因在脾脏和肾脏中的表达

Fig. 4 Expression of *tnfα* (a) and *tnfrsf1a* (b) in spleen and kidney after i. p. injection with *A. hydrophila*

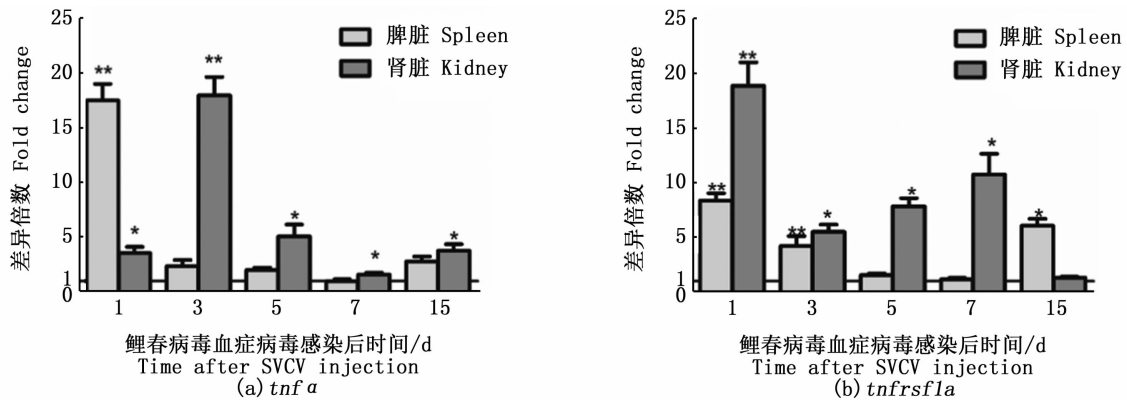


图5 鲤春病毒血症病毒感染斑马鱼后, *tnfa* (a) 和 *tnfrsf1a* (b) 基因在脾脏和肾脏中的表达

Fig. 5 Expression of *tnfa* (a) and *tnfrsf1a* (b) in spleen and kidney after i. p. injection with SVCV

3 讨论

已有的研究表明,鱼类 *tnfa* 基因在不同鱼类组织中呈现差异表达^[11,14,17,32],例如 *tnfa* 在鲶鱼中呈组成型表达,在虹鳟中呈诱导性表达。本研究分析了斑马鱼 *tnfa* 和 *tnfrsf1a* 基因在健康鱼不同组织中的表达情况,发现 *tnfa* 和 *tnfrsf1a* 在正常鱼组织(如肾脏、脾脏、皮肤、鳃、肝脏和肠)中均呈组成型表达;通过腹腔注射 LPS、poly (I:C)、细菌和病毒可调控 *tnfa* 和 *tnfrsf1a* 在免疫组织中的表达,但调控模式存在差异。实验结果表明斑马鱼 Tnfa 和 Tnfrsf1a 参与宿主防御细菌和病毒感染的免疫反应。

硬骨鱼类含有多个 *tnfa* 基因,分为 *tnfa* I 型和 II 型两大类^[21]。在过去 20 年中,*tnfa* 基因的表达得到了较为深入的研究^[21,33-34],研究结果表明它们在表达应答细菌和病毒时存时空差异。斑马鱼含有 2 个同源 *tnfa* 基因;BATES 等^[34]用 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理 7 d 的斑马鱼胚胎,能够诱导 *tnfa* 基因表达;通过腹腔注射感染斑马鱼,LPS 能诱导 *tnfa* 和 *tnfb* 的表达,且在刺激 4 h 后达到高峰。本研究发现,斑马鱼在注射 LPS 和 poly (I:C) 后,肾脏和脾脏的 *tnfa* 和 *tnfrsf1a* 表达明显上升,LPS 和 poly (I:C) 为典型的细菌和病毒病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs),大量研究显示它们能激活 Toll 类受体 (Toll-like receptor, TLR),由此推测,斑马鱼 *tnfa* 的表达受到识别 LPS 和 poly (I:C) 的 Toll 受体的调控。已有研究^[35]表明,鱼类存在识别 poly (I:C) 的 TLR 受体 (TLR3 和 TLR22);

TLR4 在哺乳类中为识别 LPS 的主要受体,但鱼类 TLR4 跟 LPS 结合力极弱^[36]。

本研究发现斑马鱼 *tnfa* 对 *A. hydrophila* 和 *E. tarda* 的表达应答存在差异。*A. hydrophila* 在肾脏和脾脏中上调 *tnfa* 的表达;在注射 *E. tarda* 的斑马鱼中,肾脏的 *tnfa* 表达显著增加,但脾脏的 *tnfa* 表达完全被抑制(40 个 PCR 循环内检测不到),与已发表的结果类似。例如, PURCELL 等^[25]现在用海豚链球菌感染的斑马鱼中,*tnfa* 也没有表现出明显的变化。*A. hydrophila* 为胞外病原,而 *E. tarda* 则可进入宿主细胞内繁殖,为胞内感染细菌,鱼类 *tnfa* 是否在胞外和胞内细菌感染过程中受到不同调控还需要进一步的研究。另外,*tnfa* 对 *A. hydrophila* 和 *E. tarda* 的表达差异也可能与病原的感染剂量有关。

tnfa 在调控宿主应答病毒感染的免疫反应过程中起着非常重要的作用。在病毒感染后,鱼类 *tnfa* 表达得到明显上调,已经知道传染性脾肾坏死病毒 (infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)、病毒性出血败血症病毒 (VSHV) 和传染性造血器官坏死病毒 (IHNV) 均可诱导宿主 *tnfa* 表达^[18,25];与此类似,在本实验中,SVCV 感染斑马鱼初期(1 d 和 3 d),脾脏和肾脏中 *tnfa* 和 *tnfrsf1a* 基因表达均呈现显著上调。这些结果证明 *tnfa* 在鱼类应答病毒感染的免疫反应中起着非常重要的作用。

综上所述,鱼类 *tnfa* 在抵御外界细菌和病毒感染中可能发挥重要作用。本研究初步分析了斑马鱼 *tnfa* 及其受体 *tnfrsf1a* 对应答细菌和病毒感染的转录表达,其结果为进一步研究 Tnfa 及其

受体 *Tnfrsf1a* 的功能,阐明其作用机理、信号通路和宿主的防御机制奠定基础。

参考文献:

- [1] CARSWELL E A, OLD L J, KASSEL R L, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1975, 72(9): 3666-3670.
- [2] BAUD V, KARIN M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives[J]. Trends in Cell Biology, 2001, 11(9): 372-377.
- [3] BEMELMANS M H, VAN TITS L J, BUURMAN W A. Tumor necrosis factor: function, release and clearance [J]. Critical Reviews in Immunology, 2017, 37(2/6): 249-259.
- [4] XIANG Z M, XIAO S, WANG F X, et al. Cloning, characterization and comparative analysis of four death receptor TNFRs from the oyster *Crassostrea hongkongensis* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 59: 288-297.
- [5] ZHANG J Y, ADAMS A T, RIDKY T W, et al. Tumor necrosis factor receptor 1/c-Jun-NH₂-kinase signaling promotes human neoplasia[J]. Cancer Research, 2007, 67(8): 3827-3834.
- [6] TESZ G J, GUILHERME A, GUNTUR K V P, et al. Tumor necrosis factor α (TNF α) stimulates Map4k4 expression through TNF α receptor 1 signaling to c-Jun and activating transcription factor 2 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(27): 19302-19312.
- [7] TAKADA Y, SUNG B, SETHI G, et al. Evidence that genetic deletion of the TNF receptor p60 or p80 inhibits Fas mediated apoptosis in macrophages [J]. Biochemical Pharmacology, 2007, 74(7): 1057-1064.
- [8] SHEIKH M S, HUANG Y. Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1 [J]. Cell Cycle, 2003, 2(6): 549-551.
- [9] WERTZ I E. TNFR1-activated NF- κ B signal transduction: regulation by the ubiquitin/proteasome system [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2014, 23: 71-77.
- [10] ZHANG A Y, CHEN D Y, WEI H, et al. Functional characterization of TNF- α in grass carp head kidney leukocytes: induction and involvement in the regulation of NF- κ B signaling [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(5): 1123-1132.
- [11] ZOU J, SECOMBES C J, LONG S, et al. Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2003, 27(10): 845-858.
- [12] KADOWAKI T, HARADA H, SAWADA Y, et al. Two types of tumor necrosis factor- α in bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) genes: molecular cloning and expression profile in response to several immunological stimulants [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(5): 585-594.
- [13] EIMON P M, KRATZ E, VARFOLOMEEV E, et al. Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish [J]. Cell Death & Differentiation, 2006, 13(10): 1619-1630.
- [14] LAING K J, WANG T H, ZOU J, et al. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumor necrosis factor- α [J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(5): 1315-1322.
- [15] PLEIĆ I L, SECOMBES C J, BIRD S, et al. Characterization of three pro-inflammatory cytokines, TNF α 1, TNF α 2 and IL-1 β , in cage-reared Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 36(1): 98-112.
- [16] ZOU J, SECOMBES C J. The function of fish cytokines [J]. Biology, 2016, 5(2): 23.
- [17] PRAVEEN K, EVANS D L, JASO-FRIEDMANN L, et al. Constitutive expression of tumor necrosis factor-alpha in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity [J]. Molecular Immunology, 2006, 43(3): 279-291.
- [18] ORDÁS M C, COSTA M M, ROCA F J, et al. Turbot TNF α gene: molecular characterization and biological activity of the recombinant protein [J]. Molecular Immunology, 2007, 44(4): 389-400.
- [19] GRAYFER L, WALSH J G, BELOSEVIC M, et al. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor-alpha [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2008, 32(5): 532-543.
- [20] SAEIJ J P J, STET R J M, DE VRIES B J, et al. Molecular and functional characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypanotolerance? [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2003, 27(1): 29-41.
- [21] HONG S, LI R G, XU Q Q, et al. Two types of TNF- α exist in teleost fish: phylogeny, expression, and bioactivity analysis of type-II TNF- α 3 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. The Journal of Immunology, 2013, 191(12): 5959-5972.
- [22] KIM M S, HWANG Y J, YOON K J, et al. Molecular cloning of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) tumor necrosis factor- α and its effect on the respiratory burst activity of phagocytes [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(5): 618-624.
- [23] ROHER N, CALLOL A, PLANAS J V, et al. Endotoxin recognition in fish results in inflammatory cytokine secretion not gene expression [J]. Innate Immunity, 2011, 17(1): 16-28.
- [24] 谢玲玲, 王风华, 王德成, 等. 肿瘤坏死因子 α 突变型斑马鱼在海分枝杆菌感染中的应用研究 [J]. 微生物与感染, 2017, 12(3): 156-163.

XIE L L, WANG F H, WANG D C, et al. Application of tumor necrosis factor α mutant zebrafish in *Mycobacterium marinum* infection [J]. Journal of Microbes and Infections,

- 2017, 12(3): 156-163.
- [25] PURCELL M K, KURATH G, GARVER K A, et al. Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 17(5): 447-462.
- [26] WU X M, HU Y W, XUE N N, et al. Role of zebrafish NLRC5 in antiviral response and transcriptional regulation of MHC related genes [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 68: 58-68.
- [27] XIE H, NIE P, SUN B. Characterization of two membrane-associated protease genes obtained from screening out-membrane protein genes of *Flavobacterium columnare* G (4) [J]. *Journal Fish Diseases*, 2004, 27 (12): 719-729.
- [28] JI C, LI A H, XIE J, et al. Bactericidal activity of grass carp *Ctenopharyngodon idella* C9-deficient serum against *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2011, 79 (7): 2083-2086.
- [29] CUI Z, SAMUEL-SHAKER D, WATRAL V, et al. Attenuated *Mycobacterium marinum* protects zebrafish against mycobacteriosis [J]. *Journal of Fish Disease*, 2010, 33(4): 371-375.
- [30] NOVOA B, BOWMAN T V, ZON L, et al. LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(2): 326-331.
- [31] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 斑马鱼迟缓爱德华氏菌的鉴定、致病性及药物敏感性 [J]. *华中农业大学学报*, 2013, 5(3): 105-111.
- LIU C, LI K B, WANG Q, et al. Identification, pathogenicity and drug sensitivity of *Edwardsiella tarda* from *Danio rerio* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 5(3): 105-111.
- [32] HIRONO I, NAM B H, KUROBE T, et al. Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *The Journal of Immunology*, 2000, 165(8): 4423-4427.
- [33] ZOU J, WANG T, HIRONO I, et al. Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2002, 26(2): 161-172.
- [34] BATES J M, AKERLUND J, MITTGE E, et al. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota [J]. *Cell Host & Microbe*, 2007, 2(6): 371-382.
- [35] PALTÍ Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1263-1272.
- [36] SEPULCRE M P, ALCARAZ-PÉREZ F, LÓPEZ-MUÑOZ A, et al. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- κ B activation [J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(4): 1836-1845.

Expression analysis of zebrafish tumor necrosis factor (*tnf α*) and its receptor (*tnfrsf1a*) in response to bacterial and viral infections

TIAN Jiayin, CHEN Kangyong, ZHANG Chang, SONG Yunjie, GAO Qian, ZOU Jun
(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Tumor necrosis factor (*tnf*) is a pro-inflammatory factor and plays an important role in immune response to bacterial and viral infections and clearance of infected cells. In this study, zebrafish were intraperitoneally (i. p.) injected with immunostimulants, bacterial or viral pathogens, and the expression of *tnf α* and its receptor (tnf receptor superfamily (tnfrsf) member 1 a) was analyzed by real-time PCR in kidney and spleen. The results showed that *tnf α* and *tnfrsf1a* were constitutively expressed in all the tissues analyzed. Lipopolysaccharide (LPS) and polyinosinic acid-polycytidylic acid (poly(I:C)) modulated the expression of *tnf α* and *tnfrsf1a*. Intraperitoneal injection of *Aeromonas hydrophila* led to significant increases of *tnf α* expression in spleen (at 48 h and 72 h) and kidney (at 72 h) and that of *tnfrsf1a* in spleen (at 48 h). In contrast, in fish i. p. injected with *Edwardsiella tarda*, the *tnf α* expression increased significantly at all the time points whilst totally inhibited in spleen. Increase of *tnfrsf1a* expression was also seen in both tissues at 6 h and 72 h. The expression levels of *tnf α* and *tnfrsf1a* were significantly elevated at the early stage of infection with SVCV, with that of *tnfrsf1a* detected significantly higher in kidney of infected fish than that in the control group throughout the infection period (1 - 7 d). The results indicate that *tnf α* and *tnfrsf1a* play important roles in immune defence against bacterial and viral infections.

Key words: zebrafish; tumor necrosis factor; tumor necrosis factor receptor superfamily member 1a; expression; bacteria; virus