

# 无乳链球菌感染对卵形鲳鲹脾脏的损伤及细胞凋亡相关基因表达的影响

高杰<sup>1,2,3</sup>, 郭华阳<sup>2,3</sup>, 刘明鉴<sup>2,3</sup>, 刘宝锁<sup>2,3</sup>, 朱克诚<sup>2,3</sup>, 张楠<sup>2,3</sup>, 郭梁<sup>2,3</sup>, 张殿昌<sup>2,3,4</sup>

1. 河北农业大学海洋学院, 河北秦皇岛 066003

2. 三亚热带水产研究院, 海南三亚 572019

3. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300

4. 广东省海洋生物种业工程技术研究中心, 广东广州 510300

**摘要:** 为了探究卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 感染无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 后脾脏的应答机制, 对卵形鲳鲹人工感染无乳链球菌后的脾脏组织进行了病理学观察, 检测了感染前后鱼体血液常规指标及感染后不同时间 (第0、第6、第12、第24、第48、第72、第96和第120小时) 血清乳酸脱氢酶 (LDH) 以及脾脏碱性磷酸酶 (ALP)、酸性磷酸酶 (ACP) 的变化趋势, 并对 *Caspase-3*、*Caspase-8* 和 *Caspase-9* 基因进行定量分析。结果显示, 卵形鲳鲹经无乳链球菌人工感染后其机体出现明显病变, 主要表现为眼睛突出、浑浊并伴有出血; 组织病理学观察发现脾脏组织产生了炎症病变; 较对照组而言, 感染组血液中红细胞数量 (RBC)、血红蛋白浓度 (HGB) 和红细胞比容 (HCT) 明显降低, 白细胞 (WBC)、嗜中性粒细胞 (NE)、淋巴细胞 (LYM) 数量升高, 平均红细胞体积 (MCV) 增大; 血清 LDH 和脾脏 ALP、ACP 活性随时间延长均上调; 脾脏中 *Caspase-3*、*Caspase-8* 和 *Caspase-9* 表达量均显著上调。结果表明卵形鲳鲹受无乳链球菌感染后其机体产生了明显的免疫反应。

**关键词:** 无乳链球菌; 卵形鲳鲹; 生理生化; 基因表达; 细胞凋亡

中图分类号: S 941.42<sup>†9</sup>

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



## Response of caspase genes to *Streptococcus agalactiae* in cells of spleen of golden pompano (*Trachinotus ovatus*)

GAO Jie<sup>1,2,3</sup>, GUO Huayang<sup>2,3</sup>, LIU Mingjian<sup>2,3</sup>, LIU Baosuo<sup>2,3</sup>, ZHU Kecheng<sup>2,3</sup>, ZHANG Nan<sup>2,3</sup>, GUO Liang<sup>2,3</sup>, ZHANG Dianchang<sup>2,3,4</sup>

1. College of Oceanography, Hebei Agricultural University, Qinhuangdao 066003, China

2. Sanya Tropical Fisheries Research Institute, Sanya 572019, China

3. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China

4. Guangdong Provincial Engineer Technology Research Center of Marine Biological Seed Industry, Guangzhou 510300, China

**Abstract:** In order to explore the response of apoptosis related genes in the spleen of *Trachinotus ovatus* infected by *Streptococcus agalactiae*, we infected the spleen tissues of *T. ovatus* by *S. agalactiae* for a pathological observation. The blood routine indexes of the fish before and after infection, as well as different times (0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h) after infection,

收稿日期: 2022-04-11; 修回日期: 2022-05-05

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0900301); 国家自然科学基金项目 (U20A2064); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2021SD12); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2022TD29)

作者简介: 高杰 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产遗传育种。E-mail: gjie1996@126.com

通信作者: 张殿昌 (1977—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为水产种质资源与遗传育种。E-mail: zhangdch@scsfri.ac.cn

the serum lactate dehydrogenase (LDH), spleen alkaline phosphatase (ALP), and acid phosphatase (ACP) and quantitative analysis of *Caspase-3*, *Caspase-8*, and *Caspase-9* genes. The results reveal that after artificial infection with *S. agalactiae*, the body of *T. ovatus* showed obvious pathological changes, mainly manifested as protruding eyes, turbidity and bleeding. Histopathological observation shows that the spleen tissue had inflammatory lesions. Compared with the control group, the number of red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (Hgb) and hematocrit (HCT) in the infected group decreased significantly, while the number of white blood cells (WBC), neutrophils (NE) and lymphocytes (LYM) increased, and the mean red blood cell volume (MCV) increased. The activities of serum LDH, spleen ALP and ACP were up-regulated with time. The expressions of *Caspase-3*, *Caspase-8* and *Caspase-9* were significantly up-regulated in spleen. The results show that the body of *T. ovatus* infected by *S. agalactiae* had an obvious immune response.

**Keywords:** *Streptococcus agalactiae*; *Trachinotus ovatus*; Physiological biochemistry; Gene expression; Cell apoptosis

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 也称 B 族链球菌 (Group B *Streptococcus*, GBS), 是一种人、鱼共患的革兰氏阳性菌<sup>[1]</sup>。与许多其他致病菌一样, 无乳链球菌具有许多毒力因子可提高病原体感染或破坏宿主的能力<sup>[2]</sup>, 其毒力因子可通过影响宿主细胞的黏附和侵袭以逃避宿主免疫<sup>[3]</sup>, 从而有效削弱机体免疫系统和新陈代谢过程中诱发的生理变化<sup>[4]</sup>, 严重时会降低机体的先天防御力, 进而诱导机体死亡。作为一种由病原菌引起的常见疾病, 链球菌病在罗非鱼养殖中具有破坏性影响<sup>[5]</sup>。2019年, 无乳链球菌和海豚链球菌 (*S. iniae*) 给罗非鱼养殖业造成的经济损失约达 25 亿元<sup>[6]</sup>。此外, 无乳链球菌感染还可导致斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[7]</sup> 在内的多种鱼体患病并大量死亡。硬骨鱼感染无乳链球菌的典型症状包括鱼体表变黑、眼球突出或混浊、发白、出血、腹部斑点和鳃盖内侧出血等<sup>[8]</sup>。目前已有学者从菌株的分离鉴定和分型、防治链球菌感染的药物筛选、疫苗研制等方面进行了无乳链球菌感染鱼体的研究报道<sup>[9]</sup>。关于无乳链球菌感染卵形鲳鲆 (*Trachinotus ovatus*) 的发病机理和调节机制方面的研究仍有不足。

卵形鲳鲆作为我国南方深远海养殖的主要品种, 年产量近 20 万吨<sup>[10]</sup>。近年来, 随着养殖环境变化以及养殖密度增加, 导致卵形鲳鲆病害频发, 给养殖产业造成严重的经济损失。Cai 等<sup>[11]</sup>2016 年首次报道了无乳链球菌感染卵形鲳鲆, 感染后可导致其大量死亡, 死亡率最高可达每天 2%<sup>[12]</sup>。有研究报道, 无乳链球菌侵袭生物体主要通过血流和主要器官在全身传播。作为鱼类的重要免疫调节器官, 肝脏、脾脏和肾脏是病原菌入侵鱼体时的广泛研究对象。例如, 罗非鱼感染无乳链球菌后可导致其肝脏、肠、鳃、脾、头肾和脑发生不同程度的病变, 其中在肾脏和脾脏中检测到较高的细菌密

度<sup>[5]</sup>。杂交蛇头鱼 (*Channa maculata*♀ × *C. argus*♂) 脾脏中存在的免疫和凋亡相关通路在舒伯特气单胞菌 (*Aeromonas schubert*) 感染中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。爱德华氏菌 (*Edwardsiella*) 感染可诱导许氏平鲷 (*Sebastes schlegeli*) 脾、肝和头肾中钙网蛋白的显著上调, 从而减少病原体在其体内的传播和复制<sup>[14]</sup>。然而, 对卵形鲳鲆脾脏在无乳链球菌入侵后的调控机制研究仍有不足。

因此, 本研究在已有研究基础上, 通过酶活性测定、组织病理学观察和实时定量 PCR 探究了卵形鲳鲆脾脏在无乳链球菌感染后的生理生化反应和凋亡诱导机制, 以期对卵形鲳鲆抗病育种及长期健康养殖提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼和细菌

实验所用卵形鲳鲆均来自中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地, 平均体质量为 31.15 g。实验开始前, 选取无病原感染、健壮的 500 尾卵形鲳鲆, 转入与实验条件一致的实验桶进行暂养, 养殖水温为 (27±0.5) °C, 盐度 25‰, 溶解氧质量浓度保持在 5.5 mg·L<sup>-1</sup> 以上。每天投喂 2 次, 饲喂量约占体质量的 4%。选用的无乳链球菌菌株 2021 年分离自中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地的患病卵形鲳鲆。

### 1.2 感染预实验

实验开始前, 将细菌接种于 BHI 液体培养基中, 并在 180 r·min<sup>-1</sup>、27 °C 的摇床上孵育 24 h。将 BHI 液体培养物在 8 000 r·min<sup>-1</sup><sup>[15]</sup> 的条件下离心 8 min, 收集沉淀物。然后用无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤沉淀 4 次, 用不同浓度 (1.0×10<sup>10</sup>、1.0×10<sup>9</sup>、1.0×10<sup>8</sup>、1.0×10<sup>7</sup> 和 1.0×10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>) 的无乳链球菌注射感染卵形鲳鲆。感染后, 观察鱼的

行为变化,记录不同感染浓度下死亡率与时间的关系,根据死亡率最终得到半致死浓度为  $1.0 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>。

### 1.3 人工感染实验

感染实验在 150 L 的水族箱中进行,水体 140 L。选取 300 尾健康的卵形鲳鲹,随机平均分为 6 组,其中 3 个处理组,3 个对照组。按照预实验结果,将鱼麻醉后处理组每尾鱼腹腔注射 200  $\mu$ L 无乳链球菌 ( $1.0 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>),对照组注射相同剂量的无菌 PBS 溶液。

注射后的第 0、第 6、第 12、第 24、第 48、第 72、第 96 和第 120 小时取样,每个时间点取 3 尾鱼,用 40 mg·L<sup>-1</sup> 丁香酚麻醉。鱼体经体积分数为 75% 乙醇消毒后,用 1.5 mL 无菌注射器静脉取血,将 3 尾鱼的血液混合置于 2.0 mL 离心管中静置 5 h,离心 (1 000 r·min<sup>-1</sup>、20 min) 分离获得血清,置于 1.5 mL 冻存管中,于 -80 °C 冰箱中保存用于分析酶活性等相关指标。另外用肝素钠 (100 IU·mL<sup>-1</sup>) 润洗后的离心管分别收集第 0 和第 120 小时血液用于血常规检测。取新鲜的脾脏组织液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱中备用;另取新鲜脾脏组织通过生理盐水清洗表面血液后用 4% 多聚甲醛固定用于组织学检查。

### 1.4 病理观察

对鱼样品进行宏观和组织学检查,记录外部和内部形态变化。将固定在多聚甲醛中的脾脏组织用体积分数为 70% 的乙醇清洗,经过脱水后使用常规技术进行石蜡包埋、切片,切片厚度 5  $\mu$ m,并用苏木精-伊红染色,使用正置荧光显微镜 (NIKON ECLIPSE C1) 获得切片图像<sup>[16]</sup>。

### 1.5 血常规指标检测

通过全自动血液细胞分析 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,BC-5000Vet) 检测血液中白细胞 (WBC)、嗜中性粒细胞 (NE)、淋巴细胞 (LYM)、红细胞 (RBC)、血小板 (PLT)、血红蛋白浓度 (HGB)、红细胞比容 (HCT)、平均红细胞体积 (MCV)、平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC)、平均血小板体积 (MPV) 和血小板压积 (PCT) 的变化。

### 1.6 生化指标检测

对照组和实验组卵形鲳鲹血清中乳酸脱氢酶 (LDH),脾脏中酸性磷酸酶 (ACP) 和碱性磷酸酶 (ALP) 的活性采用北京华英生物技术研究所试剂盒和酶标仪 (华卫德朗 DR-200BS) 进行测定。

## 1.7 Caspase 基因表达

按照 RNA 提取试剂盒 (广州美基生物科技有限公司) 说明书提取卵形鲳鲹脾脏总 RNA,质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, 美国) 检测其质量和浓度,使用 PrimeScript™ RT 试剂盒和 gDNA Eraser 合成 cDNA,于 -20 °C 冰箱中储存备用。

使用 Primer Premier 5 设计 *Caspase-3*、*Caspase-8* 和 *Caspase-9* 的引物序列 (表 1),由于 *EF-1 $\alpha$*  不受无乳链球菌感染的影响,因此选择 *EF-1 $\alpha$*  作为内参基因。通过实时荧光定量 PCR 仪 (Roche Light Cycler® 480 II, 罗氏诊断产品有限公司,上海) 进行实时定量 PCR (qRT-PCR),反应体系为 12.5  $\mu$ L。反应条件为 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。每个样品重复 3 次实验,在获得每个样品的阈值之后,使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算 *Caspase-3*、*Caspase-8* 和 *Caspase-9* mRNA 的相对表达水平,使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。数据以“平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{X} \pm SD$ )”表示。所有统计分析均使用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行比较,  $P < 0.05$  表示差异显著。

表 1 引物信息及序列

Table 1 Primers and sequences information applied in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')	应用 Application
<i>Caspase-3</i> -F	GCTGCTCTACTGCTTCTGCCTGATG	qRT-PCR
<i>Caspase-3</i> -R	TGGCTGAGGATTGTGATGTTGCTG	
<i>Caspase-8</i> -F	GCAACAAAACAGCCATCCA	qRT-PCR
<i>Caspase-8</i> -R	GCAGGGGTAAAGGGTCATT	
<i>Caspase-9</i> -F	GAATGGCGTCCGCTCTGGTCATC	qRT-PCR
<i>Caspase-9</i> -R	GGCAGCAGCTCTCAGTTCAGC	
<i>EF-1<math>\alpha</math></i> -F	AAGCCAGGTATGGTTGTCAACTTT	qRT-PCR
<i>EF-1<math>\alpha</math></i> -R	CGTGGTGCATCTCCACAGACT	

## 2 结果

### 2.1 病理学观察

人工感染无乳链球菌 24 h 后,卵形鲳鲹游动不定、食欲不振、嗜睡、运动不协调,且明显观察到角膜混浊、突眼、眼出血、内脏充血和内鳃盖充血等典型病变 (图 1),并在感染后 48 h 出现大量死亡。组织病理学分析显示,脾脏发生较为严重的病



变损伤, 典型特征为骨髓中 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的坏死和丢失; 轻度至中度病变表现为脾炎, 骨髓区域显著减少, 淋巴细胞数目降低。在严重病变中, 脾脏骨髓弥漫性坏死至骨髓区域完全消失,

伴有网状内皮增生, 可见大量被 HE 染成棕黄色的“小结”(图 2)。未感染的卵形鲳鲆脾脏具有正常的红髓和白髓。

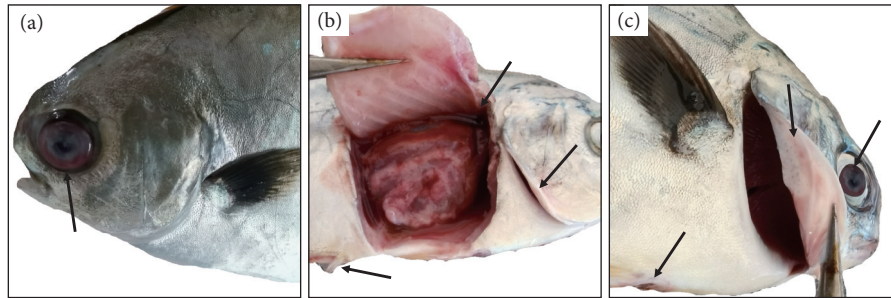
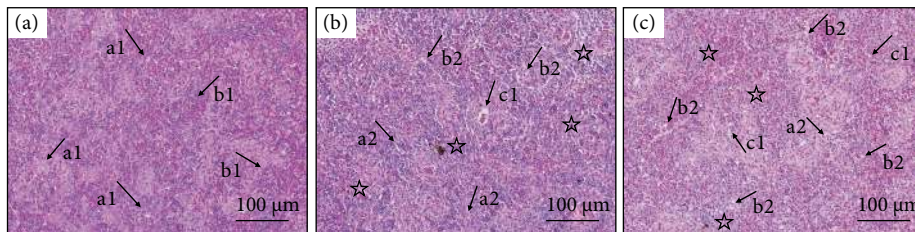


图1 卵形鲳鲆感染无乳链球菌后内部和外部病变

注: a. 角膜混浊、突眼、眼出血; b. 内脏充血; c. 内鳃盖充血(箭头所指)。

Fig. 1 Internal and external lesions recorded on *T. ovatus* specimens affected by *S. agalactia*

Note: a. Corneal opacity, exophthalmia and eye hemorrhage; b. Gut congestion; c. Congestion in the inner gill cap (Arrow).



a1. 正常脾脏白髓区; b1. 正常脾脏淋巴细胞; a2. 白髓面积显著减少; b2. 淋巴细胞减少; c1. 弥漫性白髓坏死, 白髓区完全消失; ☆. 脾脏出现大面积含铁血黄素沉积块病灶。

a1. Normal white pulp area of spleen; b1. Normal lymphocytes of spleen; a2. Significant reduction of the white pulp area; b2. Depletion of lymphocytes; c1. Spleen showed diffuse necrosis of white pulp with complete disappearance of white pulp area; ☆. Large areas of hemosiderin agglutination lesions in the spleen.

图2 卵形鲳鲆脾脏组织病理学特征

注: a. 健康脾脏组织切片; b—c. 感染无乳链球菌 120 h 后脾脏组织切片。

Fig. 2 Histopathological characteristics of spleen of *T. ovatus*

Note: a. Healthy spleen tissue section; b—c. Spleen tissue section 120 h after infection with *S. agalactiae*.

## 2.2 血液指标参数

卵形鲳鲆感染无乳链球菌后血液参数见表 2。与对照组相比, 感染个体的红细胞数量、血红蛋白浓度和红细胞比容明显降低 ( $P < 0.05$ ), 白细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞数量则出现相反的趋势 ( $P < 0.05$ ), 与对照组相比嗜中性粒细胞和淋巴细胞数量增加近 3 倍。同时平均红细胞体积明显增大, 其他指标未见明显变化。

## 2.3 血清、脾脏生化指标结果

卵形鲳鲆感染无乳链球菌后的血清和脾脏生化指标变化见图 3, 相较于对照组, 感染组个体的血清 LDH 和脾脏中 ALP、ACP 活性显著增加 ( $P < 0.05$ ), 并于第 6 小时达到峰值 ( $P < 0.01$ ); 同时随着感染时间延长, 其活性均逐渐降低但 ACP 与对照组相比仍有极显著差异 ( $P < 0.01$ )。其中 LDH 活性

在感染 6 h 后升高最为显著 ( $P < 0.01$ ), 活性约为对照组的 10 倍。

## 2.4 脾脏中凋亡基因表达

卵形鲳鲆感染无乳链球菌后凋亡基因表达谱见图 4。在第 0—第 120 小时的实验期内, *Caspase-3*、*Caspase-8* 和 *Caspase-9* 的 mRNA 表达水平随时间推移均不断升高。其中 *Caspase-8* 基因表达水平在感染第 6 小时显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 并在第 120 小时达到峰值 ( $P < 0.01$ ); *Caspase-3* 在感染后第 120 小时达到峰值; *Caspase-9* 在感染后第 12 小时表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 并在第 72 小时达到峰值后趋于稳定。

## 3 讨论

本研究通过无乳链球菌体外注射实验感染鱼体

表2 卵形鲳鲹感染无乳链球菌对血液学指标的影响  
Table 2 Effect of *S. agalactiae* infection on hematological parameters of *T. ovatus*

项目 Item	对照组 Control	感染组 Infection
白细胞数量 WBC/( $10^9 \cdot L^{-1}$ )	8.32±0.94	13.67±0.58*
嗜中性粒细胞数量 NE/( $10^9 \cdot L^{-1}$ )	0.18±0.09	0.54±0.12*
淋巴细胞数量 LYM/( $10^9 \cdot L^{-1}$ )	1.01±0.35	3.04±0.75*
红细胞数量 RBC/( $10^9 \cdot L^{-1}$ )	5.25±1.07	3.08±0.25*
血红蛋白浓度 HGB/( $g \cdot L^{-1}$ )	179.67±10.25	129.58±9.58*
红细胞比容 HCT/%	35.69±0.55	23.37±0.17*
平均红细胞体积 MCV/fL	160.63±1.27	190.31±0.79*
平均红细胞血红蛋白量 MCH/pg	39.75±2.47	41.11±3.73
平均红细胞血红蛋白质量浓度 MCHC/( $g \cdot L^{-1}$ )	289.21±2.99	292.36±4.13
血小板数量 PLT/( $10^9 \cdot L^{-1}$ )	19.68±0.25	13.43±0.86
平均血小板体积 MPV/fL	7.91±1.39	7.41±1.05
血小板压积 PCT/%	0.70±0.17	0.75±0.11

注: \*. 与对照组相比存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: \*. Significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

后, 自患病鱼中分离得到的菌株经形态分析和 16S RNA 测序比对后均与无乳链球菌具有高度一致性, 因此确定其为无乳链球菌感染。经腹腔注射  $200 \mu L$  浓度为  $1.0 \times 10^8 CFU \cdot mL^{-1}$  的病原菌后, 在 48 h 后实验组死亡率开始增加, 这与罗非鱼人工注射相似剂量无乳链球菌后的死亡高峰期接近<sup>[17]</sup>。观察发现实验组卵形鲳鲹出现与自然感染无乳链球菌后相似的临床症状<sup>[18]</sup>, 组织病理学分析显示, 卵形鲳鲹在无乳链球菌感染后表现出脾脏炎症病变并伴有含铁血黄素沉积。有研究表明, 机体对铁元素利用受阻导致脾脏中含铁血黄素的积累或红细胞被大量破坏是鱼类对环境应激的重要信号<sup>[19]</sup>, 因此, 脾脏中含铁血黄素的检测对卵形鲳鲹的健康监测具有重要意义。本研究中, 脾脏作为卵形鲳鲹的主要淋巴器官在无乳链球菌感染后损伤严重, 造成无法区分红髓和白髓以及淋巴细胞减少, 同时可见产生大量炎症细胞, 这与罗非鱼在自然状态下感染无乳链球菌后的组织切片结果相似<sup>[3]</sup>。

血清生化参数是组织或器官在临床病理学研究中的重要指标<sup>[20]</sup>。研究表明, 高于或低于基线水平的酶活性通常反映组织或器官代谢紊乱, 严重时会引起细胞凋亡<sup>[21]</sup>。细胞凋亡是感染的最终结

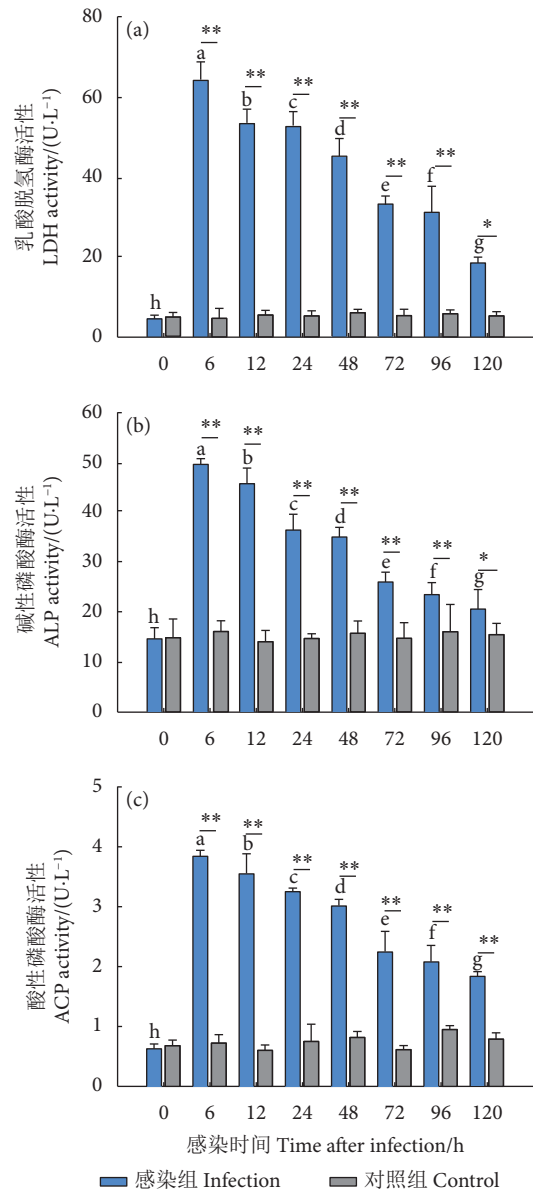


图3 卵形鲳鲹感染无乳链球菌后生化指标变化  
注: a. 不同时间血浆乳酸脱氢酶变化水平; b. 不同时间脾脏碱性磷酸酶变化水平; c. 不同时间脾脏酸性磷酸酶变化水平;  
\*\*. 差异极显著 ( $P < 0.01$ ); \*. 差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 3 Changes of biochemical indexes after infection of *T. ovatus* at different time

Note: a. The levels of plasma lactate dehydrogenase at different time before and after the challenge; b. The levels of spleen alkaline phosphatase at different time before and after the challenge; c. The levels of spleen acid phosphatase at different time before and after the challenge;  
\*\*. Very significant difference ( $P < 0.01$ );  
\*. Significant difference ( $P < 0.05$ ).

果, 主要包括细胞坏死、凋亡和自噬<sup>[22]</sup>。LDH 作为糖酵解途径中的末端酶, 在辅酶 NADH 协助下可将乳酸转化为丙酮酸。当机体受到外界压力时, LDH 可以进行逆反应并将丙酮酸 (糖酵解的最终产物) 转化为乳酸<sup>[23]</sup>。而细胞内 LDH 的释放是细胞坏死的特征之一。本研究中感染无乳链球菌后卵形

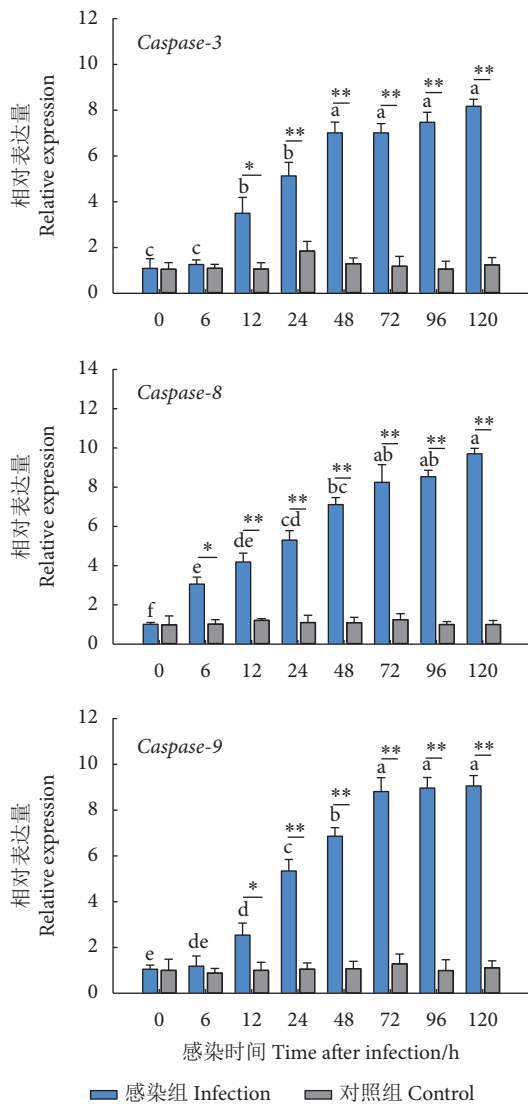


图4 卵形鲳鲟感染无乳链球菌后脾脏凋亡基因相对表达量  
注: \*\*. 差异极显著 ( $P < 0.01$ ); \*. 差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 4 Relative expression of apoptosis genes in spleen after *T. ovatus* infection with *S. agalactiae*

Note: \*\*. Very significant difference ( $P < 0.01$ );  
\*. Significant difference ( $P < 0.05$ ).

鲳鲟血清中 LDH 显著升高, 表明机体可能存在细胞凋亡情况并伴有病理性坏死反应, 机体通过凋亡过程清除体内坏死的细胞并参与病原体入侵后的免疫调控过程。此外, ALP 和 ACP 作为溶酶体中的主要水解酶参与生物体的先天免疫过程, 参与包括生长和细胞分化等一系列生理代谢活动, 常被作为病原菌感染的敏感指标, 在评估鱼类病原菌引发的疾病中起重要作用<sup>[23-25]</sup>。Sharkoori 等<sup>[26]</sup> 研究指出 ALP 和 ACP 活性可作为细胞坏死的指标。本研究发现, 无乳链球菌感染可使卵形鲳鲟脾脏中 ALP 和 ACP 活性在短时间内显著升高, 这可能是由于脾脏组织功能活性增加促使其在短时间内大量合

成, 以降低病原菌感染对机体的损害<sup>[27]</sup>。此外, 本研究中 ACP 活性变化与南亚野鲮 (*Labeo rohita*) 感染嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 后的变化相似<sup>[28]</sup>, 推测可能是机体内溶酶体在抵抗无乳链球菌感染过程中大量增殖, 促使溶酶体膜破裂, 致使膜内保持潜伏状态的 ACP 被激活。

血常规检验对于病原体感染的监测具有重要意义<sup>[29]</sup>。病原菌感染鱼体后可通过细胞膜扩散到血液系统, 并对机体血液氧气输送能力和血液电解质平衡产生负面影响<sup>[30]</sup>。血液中红细胞比容、红细胞和血红蛋白浓度是评估鱼类在暴露于各种环境压力、化学毒性和细菌感染后健康状况的重要指标<sup>[25]</sup>。本研究中, 实验组红细胞比容、红细胞和血红蛋白浓度均显著低于对照组, 与草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[31]</sup> 人工感染草鱼呼肠孤病毒 (Grass carp reovirus) 后的变化相似, 因此认为血液生化特性可用作卵形鲳鲟对无乳链球菌感染的敏感指标。此外, 有研究发现, 红细胞比容、红细胞和血红蛋白浓度降低会造成贫血, 这可能是细菌感染动物后抑制红细胞生成或是细菌感染导致红细胞生命周期缩短而引起贫血状态<sup>[32]</sup>。同时本研究中实验组平均红细胞体积较大, 推测其可能伴有红细胞增多症。以往研究发现, 由于鱼类与哺乳动物不同, 幼体红细胞比成体红细胞小, 细胞质较少, 当外源微生物入侵后可使鱼平均红细胞体积增大<sup>[33]</sup>。此外, 有研究报道, 血液中白细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞数量常因病原菌感染而增多<sup>[34]</sup>。本研究发现, 受感染鱼白细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞的含量显著升高, 可能是病原菌感染诱导机体产生可逆性造血干细胞损伤后出现的侵袭性炎症病变或血液早期再增殖, 机体在试图通过发展获得性免疫而增强对病原体的抗性<sup>[35]</sup>。

当先天免疫被破坏导致应激反应受阻时, 细胞会遭受严重损伤并启动凋亡或坏死。细胞凋亡是由基因编码的自杀程序的作用引起的, 该程序触发了一系列特征性的形态和生化变化, Caspase 是鱼类检测细胞凋亡的关键指标<sup>[36]</sup>。细胞凋亡通常通过外在途径 (受体-凋亡途径) 和内在途径 (线粒体-凋亡途径) 两种主要途径发生<sup>[37]</sup>, 其中外在途径通过细胞外信号调节死亡受体, 募集相关死亡结构域和 Caspase-8 相关的蛋白质, 随后 Caspase-8 的激活直接或间接地激活 Caspase-3。内在途径是由细胞



色素 C 与凋亡蛋白酶激活因子 (Apaf-1) 结合, 激活下游效应子 *Caspase-9* 后进一步激活 *Caspase-3*<sup>[38]</sup>。河豚 (*Takifugu obscurus*)<sup>[39]</sup> 感染嗜水气单胞菌后头肾中 *Caspase-3* 和 *Caspase-8* 的 mRNA 表达水平显著上调, 促使细胞凋亡。此外, 已有研究报道无乳链球菌诱导的细胞凋亡可以改变水生动物凋亡相关基因的表达水平<sup>[40]</sup>。本研究发现, 无乳链球菌可诱导卵形鲳鲷脾脏中 *Caspase-3*、*Caspase-8* 和 *Caspase-9* 基因的转录水平显著增加, 表明机体的内外凋亡途径可同时参与对病原体入侵的免疫调控过程。

#### 参考文献:

- [1] GAUTHIER D T. Bacterial zoonoses of fishes: a review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections[J]. *Vet J*, 2015, 203(1): 27-35.
- [2] DENG L, LI Y, GENG Y, et al. Molecular serotyping and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolated from fish in China[J]. *Aquaculture*, 2019, 510: 84-89.
- [3] CAO J M, LIU Z G, ZHANG D F, et al. Distribution and localization of *Streptococcus agalactiae* in different tissues of artificially infected tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 546: 737370.
- [4] 李战军, 张建柏, 曹亚男, 等. 鱼类副乳房链球菌病研究进展 [J]. 大连海洋大学学报, 2021, 36(6): 1059-1070.
- [5] ANSHARY H, KURNIAWAN R A, SRIWULAN S, et al. Isolation and molecular identification of the etiological agents of *Streptococcosis* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia[J]. *SpringerPlus*, 2014, 3(1): 627.
- [6] TAVARES G C, de QUEIROZ G A, ASSIS G B N, et al. Disease outbreaks in farmed amazon catfish (*Leiaris marmoratus* × *Pseudoplatystoma corruscans*) caused by *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, and *S. dysgalactiae*[J]. *Aquaculture*, 2018, 495: 384-392.
- [7] ZHANG Q L, LI H W, WU W, et al. The response of microbiota community to *Streptococcus agalactiae* infection in zebrafish intestine[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2848.
- [8] PERERA R P, JOHNSON S K, COLLINS M D, et al. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* × *T. aurea* hybrids[J]. *J Aquat Anim Health*, 1994, 6(4): 335-340.
- [9] de SOUSA E L, ASSANE I M, SANTOS-FILHO N A, et al. Haematological, biochemical and immunological biomarkers, antibacterial activity, and survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after treatment using antimicrobial peptide LL-37 against *Streptococcus agalactiae*[J]. *Aquaculture*, 2021, 533: 736181.
- [10] NING L J, GAO L L, ZHOU W, et al. Beneficial effects of dietary mulberry leaf along with multi-enzyme premix on the growth, immune response and disease resistance of golden pompano *Trachinotus ovatus*[J]. *Aquaculture*, 2021, 535: 736396.
- [11] CAI X H, PENG Y H, WANG Z C, et al. Characterization and identification of streptococci from golden pompano in China[J]. *Dis Aquat Org*, 2016, 119(3): 207-217.
- [12] GUO S, MO Z, WANG Z, et al. Isolation and pathogenicity of *Streptococcus iniae* in offshore cage-cultured *Trachinotus ovatus* in China[J]. *Aquaculture*, 2018, 492: 247-252.
- [13] LIU C, MA J, ZHANG D F, et al. Immune response and apoptosis-related pathways induced by *Aeromonas schubertii* infection of hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂)[J]. *Pathogens*, 2021, 10(8): 997.
- [14] GUANG H, WANG Z X, LI E M, et al. A novel calreticulin-related molecule that interacts with bacteria and enhances host resistance against bacterial infection in black rockfish, *Sebastes schlegelii*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 93: 823-831.
- [15] 张羽. MAPK/Erk 通路对尼罗罗非鱼 T 细胞免疫的调控机制 [D]. 上海: 华东师范大学, 2021: 45.
- [16] GERRITS P O, van LEEUWEN M B M. Glycol methacrylate embedding in histotechnology: the hematoxylin-eosin stain as a method for assessing the stability of glycol methacrylate sections[J]. *Stain Technol*, 1987, 62(3): 181-190.
- [17] LAITH A A, AMBAK M A, HASSAN, M, et al. Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Vet World*, 2017, 10(1): 101-111.
- [18] ZAMRI-SAAD M, AMAL M N, SITI-ZAHRAH A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*[J]. *J Comp Pathol*, 2010, 143(2/3): 227-229.
- [19] KE X L, LIU Z G, CHEN S Z, et al. The immune efficacy of a *Streptococcus agalactiae* immersion vaccine for different sizes of young tilapia[J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736289.
- [20] 陈建国. 美洲黑石斑鱼 (*Centropristis striata*) “突眼” 症的病原菌分离鉴定和组织病理学研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017: 23.
- [21] GERRINGER M E, DRAZEN J C, YANCEY P H. Metabolic enzyme activities of abyssal and hadal fishes: pressure effects and a re-evaluation of depth-related changes[J]. *Deep-Sea Res I*, 2017, 125: 135-146.
- [22] ZHAO Y Y, TANG J N, YANG D R, et al. Staphylococcal enterotoxin M induced inflammation and impairment of bovine mammary epithelial cells[J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(9): 8350-8359.
- [23] 陈梓聪, 陈丕茂, 袁华荣, 等. 斑节对虾幼虾运动后呼吸代谢变化研究 [J]. 南方水产科学, 2020, 16(4): 75-83.
- [24] KIM J H, KIM J Y, LIM L J, et al. Effects of waterborne nitrite on hematological parameters and stress indicators in olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, raised in bio-floc and seawater[J]. *Chemosphere*, 2018, 209: 28-34.
- [25] KIM J H, SOHN S, KIM S K, et al. Effects on hematological para-

- meters, antioxidant and immune responses, AChE, and stress indicators of olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, raised in bio-floc and seawater challenged by *Edwardsiella tarda*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 97: 194-203.
- [26] SHAKOORI A R, ALAM J, AZIZ F, et al. Toxic effects of bifenthrin (talstar) on the liver of *Gallus domesticus*[J]. Ann Nucl Energy, 1992, 2: 1-11.
- [27] LIN W, LI L, CHEN J, et al. Long-term crowding stress causes compromised nonspecific immunity and increases apoptosis of spleen in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 80: 540-545.
- [28] PAL S, RAY S D, HOMECHAUDHURI S. Evaluation of *in vivo* non-specific immunity and oxidative stress in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) infected with *Aeromonas hydrophila* as biomarker for early diagnosis[J]. Int J Fish Aquat Stud, 2015, 3(1): 116-124.
- [29] CHEN H J, YUAN G L, SU J G, et al. Hematological analysis of *Ctenopharyngodon idella*, *Megalobrama amblycephala* and *Pelteobagrus fulvidraco*: morphology, ultrastructure, cytochemistry and quantification of peripheral blood cells[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 90: 376-384.
- [30] NARRA M R. Haematological and immune upshots in *Clarias batrachus* exposed to dimethoate and defying response of dietary ascorbic acid[J]. Chemosphere, 2017, 168: 988-995.
- [31] 杨玲, 苏建国. 草鱼呼肠孤病毒 II 型自然发病与人工注射感染草鱼的病理症状和病毒分布研究 [J]. 水产学报, 2022, 46(2): 250-260.
- [32] BURGOS-ACECES M, LIONETTI L, FAGGIO C. Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced response in fish[J]. Sci Total Environ, 2019, 670: 1170-1183.
- [33] LEVINE G J. Veterinary hematology and clinical chemistry[J]. Vet Clin Pathol, 2014, 43(3): 460.
- [34] CHEN H J, YUAN G L, SU J G, et al. Hematological and immune genes responses in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) with septicemia induced by *Edwardsiella ictalurid*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 97: 531-539.
- [35] SIMMONS S O, FAN C Y, RAMABHADRAN R. Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening[J]. Toxicol Sci, 2009, 111(2): 202-225.
- [36] SUSIN S A, ZANZAMI N, CASTEDO M, et al. The central executor of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis[J]. J Exp Med, 1997, 186(1): 25-37.
- [37] 丁耀忠. QH-08PRRS 分离株 Caspase-8 介导的凋亡途径及实时定量 PCR 方法的建立 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2021: 8.
- [38] ZHANG L, LI L, ZHANG G. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system[J]. Dev Comp Immunol, 2011, 35(5): 603-610.
- [39] KONG L H, QIAN K, WU S W, et al. Functional characterization of TNF-alpha in pufferfish (*Takifugu obscurus*) in immune response and apoptosis against *Aeromonas hydrophila*[J]. J Fish Dis, 2021, 44(9): 1343-1353.
- [40] ZHU J, GAN X, AO Q, et al. Basal polarization of the immune responses to *Streptococcus agalactiae* susceptible and resistant tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 75: 336-345.