

黑龙江林蛙 ferritin H 基因克隆及其在细菌侵染下的表达变化分析

刘依铭 许冬梅 刘思影 刘玉芬* 刘鹏 赵文阁* 陈辉

哈尔滨师范大学生命科学与技术学院 哈尔滨 150025

摘要: 铁蛋白广泛存在于生物体内, 能够使细胞内的铁元素含量保持相对稳定且能参与机体免疫反应。近年来因细菌侵染, 黑龙江林蛙 (*Rana amurensis*) 种群数量出现下降趋势, 本研究探究铁蛋白基因在细菌感染的林蛙中的表达模式, 期望可以为黑龙江林蛙抗细菌感染的机制研究提供参考。本研究首先采用 PCR 技术扩增黑龙江林蛙铁蛋白 H 亚基基因的编码区序列并对其进行生物信息学分析; 再应用实时荧光定量 PCR 技术 (RT-qPCR) 检测黑龙江林蛙被嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 侵染后, 铁蛋白 H 亚基基因在其肝、脾、肾、皮肤以及肌肉组织中的转录水平变化情况; 最后采用免疫荧光检测技术, 分析嗜水气单胞菌侵染后, 黑龙江林蛙铁蛋白 H 亚基蛋白表达情况。结果表明, 该基因编码区长度 534 bp, 编码 177 个氨基酸; 对该基因氨基酸序列进行分析, 其与欧洲林蛙 (*R. temporaria*) 相应基因同源性最高, 达到 98.37%; RT-qPCR 结果显示, 铁蛋白 H 亚基基因在黑龙江林蛙组织中广泛存在, 在嗜水气单胞菌侵染后, 铁蛋白 H 亚基 mRNA 在黑龙江林蛙肝、脾、肾、皮肤以及肌肉组织中的表达均显著上调 ($P < 0.01$)。免疫荧光检测结果发现, 在感染嗜水气单胞菌后, 铁蛋白 H 亚基蛋白在黑龙江林蛙肝和肌肉组织的胞质中均有不同程度表达。综上所述表明, 黑龙江林蛙铁蛋白 H 亚基基因会通过上调表达来响应细菌性感染, 由此推测该基因参与了黑龙江林蛙的细菌性免疫应答。

关键词: 铁蛋白基因; 黑龙江林蛙; 嗜水气单胞菌; 基因克隆; 细菌感染

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 06-881-10

Cloning of the ferritin H Gene from *Rana amurensis* and Analysis of Its Expression Changes Exposed to Bacterial Infection

LIU Yi-Ming XU Dong-Mei LIU Si-Ying LIU Yu-Fen*

LIU Peng ZHAO Wen-Ge* CHEN Hui

College of life science and technology Harbin Normal University, Heilongjiang 150025, China

Abstract: [Objectives] Ferritin exists widely in organisms, which can maintain a relatively stable iron content in cells and also participate in body's immune response. In recent years, due to bacterial infection, the

基金项目 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (No. LH2021C053);

* 通讯作者, E-mail: liuyufen0825@126.com, zhaowenge311@126.com;

第一作者介绍 刘依铭, 女, 硕士研究生; 研究方向: 脊椎动物学; E-mail: 3476083930@qq.com。

收稿日期: 2022-11-29, 修回日期: 2023-06-19 DOI: 10.13859/j.cjz.202322299

population of *Rana amurensis* has shown a downward trend. This study explores the expression pattern of ferritin H genes in bacteria-infected *R. amurensis*, hoping to provide a reference for the study of the mechanism of *R. amurensis* resistance to bacterial infection. **[Methods]** In this study, PCR was used to amplify the coding region of ferritin H (*ferH*) gene of *R. amurensis* and analyze its bioinformatics. Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR) was used to detect the transcriptional changes of *ferH* gene in the liver, spleen, kidney, skin, and muscle tissue of *R. amurensis* after *Aeromonas hydrophila* (*Ah*) infection. The transcription level of *ferH* gene relative to the reference gene was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$ using EXCEL 2019. Finally, immunofluorescence detection technology was used to analyze the expression of ferH protein of *R. amurensis* after *Ah* infection. Three positive regions were selected for each sample to take photos, and Image J software was used to analyze the relative average optical density. The above results were expressed as Mean \pm SD. SPSS 26.0 was used for statistical analysis. One-way ANOVA was used to compare the difference between the treatment group and the control group, and the statistical significance was $P < 0.05$. GraphPad Prism 8 software was used for mapping. **[Results]** The results showed that the encoding region of *ferH* gene was 534 bp, encoding 177 amino acids (Fig. 1). The amino acid sequence analysis of this gene showed that it had the highest homology with *R. temporaria*, reaching 98.37% (Fig. 2). The results of RT-qPCR showed that *ferH* gene was widely transcribed in *R. amurensis* tissues (Fig. 3), and the transcription level of *ferH* gene was significantly up-regulated in liver, spleen, kidney, skin, and muscle tissues after *Ah* infection ($P < 0.01$). *ferH* gene in liver, skin and muscle tissues reached the peak of transcription 6 h after infection, which was 11.95, 24.31, and 24.72 times higher than that in the control group ($P < 0.01$). The peak transcription in spleen and kidney tissues was 18.22 and 18.19 times higher than that in the control group at 24 h after infection ($P < 0.01$) (Fig. 4). In addition, immunofluorescence assay results showed that the protein was expressed in the cytoplasm of the liver and muscle tissue of *R. amurensis* to varying degrees after infection with *Ah*. ferH protein expression was highest in liver and muscle tissue after *Ah* 6 h infection, 11.63 and 4.82 times higher than in control group, respectively ($P < 0.01$) (Fig. 5). **[Conclusion]** In conclusion, the *ferH* gene of *R. amurensis* is up-regulated in response to bacterial infection, suggesting that the gene is involved in bacterial immune response.

Key words: Ferritin gene; *Rana amurensis*; *Aeromonas hydrophila*; Cloning; Bacterial infection

铁元素是生物体进行新陈代谢反应所必需的微量元素,也是机体一种含量丰富的过渡金属,它在催化过程中会产生有害的活性氧。在生物体中存在的铁蛋白(ferritin, fer)可以结合细胞环境中游离的 Fe^{2+} ,并在缺铁时释放,对细胞内的铁进行有效的调控,防止细胞损伤,是细胞内主要的铁储存及铁运输蛋白(Finazzi et al. 2014, Sun et al. 2016)。研究发现,铁蛋白存在于大多数真核细胞中,由重链(ferritin heavy chain, ferH)和轻链(ferritin light chain,

ferL)两种类型共24个亚基组成(Arosio et al. 2015)。这两种类型的亚基虽然具有相似的二级结构,但序列同源性较低,主要功能结构域也存在差异,导致H和L两个亚基具有不同的功能,H亚基负责 Fe^{2+} 氧化,而L亚基可以促进 Fe^{3+} 的矿化成核过程(Sonia et al. 1992)。目前,ferH基因已经在多个物种中被分离鉴定,并且相关研究也表明ferH基因不仅可以参与胞内的铁元素代谢,还能够参与机体的免疫反应,并且与恶性肿瘤的发展有关(Salatino et al.

2019, Haschka et al. 2021)。

黑龙江林蛙 (*Rana amurensis*) 隶属蛙科 (Ranidae) 林蛙属, 具有较强抵御寒冷环境的能力, 是东北地区的优势两栖物种。黑龙江林蛙雌性个体的输卵管可以入药或作为食材, 具有较高的经济价值和药用价值, 被列为东北地区重要的经济蛙类 (李亚茹等 2022)。近年来黑龙江林蛙养殖业不断扩张, 养殖密度过大已经是普遍存在的问题, 而两栖类生境又具有一定特殊性。因此, 黑龙江林蛙很容易受到细菌等微生物侵染, 其中, 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 是导致两栖类种群数量大幅减少的重要致病菌之一 (曲俐俐等 2019)。

本实验拟通过分子克隆获得黑龙江林蛙 *ferH* 基因编码区序列, 再运用 RT-qPCR 技术分析黑龙江林蛙在细菌感染过程中 *ferH* 基因的表达模式, 并采用免疫组织化学法定位黑龙江林蛙组织中 *ferH* 蛋白表达情况。为探究 *ferH* 基因的免疫功能奠定基础, 也为黑龙江林蛙的疾病防治、人工养殖以及保护工作提供新思路。

1 材料方法

1.1 实验动物

实验所用黑龙江林蛙体重 (18 ± 5) g (*n* = 30), 购自哈尔滨市阿城区玉泉鸿盛林蛙养殖场, 在遵循实验伦理学要求情况下进行相应操作。

1.2 方法

1.2.1 *ferH* 基因的克隆及生物信息学分析 根

据欧洲林蛙 (*R. temporaria*) *ferH* 基因序列 (GenBank 登录号: XM_040328412), 使用 Primer Premier 5.0 软件设计一对引物 *fer-h-A*, 用于扩增黑龙江林蛙 *ferH* 基因。参考吴彤等 (2022) 研究方法, 利用 Trizol 试剂盒 (R0016, 上海碧云天生物有限公司)、氯仿和异丙醇等试剂提取黑龙江林蛙肝组织总 RNA, 反转录成 cDNA 作为模板, 以 *fer-h-A* 为引物扩增 *ferH* 基因。PCR 反应程序如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56.6 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 34 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。经菌落 PCR 鉴定, 将所得菌株送至上海生工生物工程股份有限公司进行序列测定。再依据获得的 *ferH* 基因序列设计一对用于 RT-qPCR 的荧光引物 (*fer-h-q-B*), 内参采用 *β-actin* 基因, 引物信息见表 1。

使用 DNAMAN 6.0、SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>) SWISS-MODEL (<http://www.swiss-model.expasy.org/>) 和 MEGA11 软件对 *ferH* 基因编码区序列进行生物信息学分析, 参考物种信息见表 2。

1.2.2 炎症模型建立 根据参考文献 (吴彤 2022) 确定的黑龙江林蛙半数致死剂量 (median lethal dose, LD50), 将本实验室保存的嗜水气单胞菌菌种 (DW1701-1909) 进行菌液培养至 1.5 × 10¹⁰ CFU/L (CFU 为菌落数 colony forming units), 储存于 4 °C 备用。取黑龙江林蛙 30 只, 随机分为对照组和嗜水气单胞菌感染组 (*Ah* 组), 每组各 15 只。*Ah* 组注射 1 ml 嗜水气单胞菌菌液, 对照组注射 1 ml 与 *Ah* 组稀释倍

表 1 实验所用引物信息
Table 1 Primer information used in the experiment

引物名称 Primer name	序列 sequence (5'-3')	目的 Purpose	片段长度 Length (bp)
<i>fer-h-FA</i> <i>fer-h-RA</i>	AACAGTGATTGGACGGAACC AGAGGATCTCAGTCGTGGGA	实时荧光定量 PCR RT-PCR	534
<i>fer-h-q-FB</i> <i>fer-h-q-RB</i>	TTCCTCCACGCTGTCTCT CAATCGGCAGGTCAATCT	实时荧光定量 PCR RT-qPCR	172
<i>β-actin-F</i> <i>β-actin-R</i>	AAGAATGAGGGCTGGAACA TTCTTACTCCCGACCTTGT	实时荧光定量 PCR RT-qPCR	172

表 2 参考物种及序列信息

Table 2 Reference species and sequence information

物种 Species	核苷酸登录号 Accession No. of nucleotide	氨基酸登录号 Accession No. of amino acid
欧洲林蛙 <i>Rana temporaria</i>	XM_040328412	XP_040184346.1
中华蟾蜍 <i>Bufo gargarizans</i>	DQ437112.1	ABD75379.1
高山倭蛙 <i>Nanorana parkeri</i>	XM_018565189	XP_018420691.1
牛蛙 <i>R. catesbeiana</i>	BT081921.1	ACO52052.1
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	AF538970	AAQ10928.1
热带爪蟾 <i>X. tropicalis</i>	NM_203677.1	NP_989008.1
扬子鳄 <i>Alligator sinensis</i>	XM_006019073.1	XP_006019135
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	FJ788423.1	ACY75475.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AF295373_1	AAG37837.1
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	NM_001123657	NP_001117129.1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NM_001124547	NP_001118019.1
大菱鲆 <i>Psetta maxima</i>	GU182880	ADI24353.1
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	NM_001200338.1	NP_001187267.1
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XM_003445695.4	XP_003445743.1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NM_205086.2	NP_990417.1
人 <i>Homo sapiens</i>	AF088851	AAF89523.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	X52561.1	CAA36795.1
家兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	XM_008274404	XP_008272626.1
绵羊 <i>Ovis aries</i>	NM_001009786	NP_001009786.2
牛 <i>Bos taurus</i>	NM_174062.4	NP_776487.1
猪 <i>Sus scrofa</i>	NM_213975.1	NP_999140.1

数相同的 LB 液体培养基。注射后分别于 6、24、48、72、和 120 h 共 5 个时间点，取黑龙江林蛙肝、脾、肾、皮肤和肌肉组织样品，每组取 3 只，用于后续相关实验。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 分析 提取对照组和 Ah 组黑龙江林蛙肝、脾、肾、皮肤和肌肉组织 RNA，反转录后作为 RT-qPCR 反应模板，以 fer-h-q-FB 和 fer-h-q-RB 为引物，以 β -actin 为内参基因，进行 RT-qPCR 反应。反应程序按照染料法荧光定量专用预混液说明书进行，设置 3 次技术重复。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 *ferH* 基因相对于 β -actin 基因的表达量。RT-qPCR 反应程序如下：95 ℃ 30 s，95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，共 40 个循环。

1.2.4 免疫荧光检测 选取对照组和 Ah 组黑龙江林蛙 6、24 和 48 h 的肝和肌肉组织，采用

兔抗铁蛋白多克隆抗体作为一抗，荧光标记羊抗兔 IgG 作为二抗，进行组织蛋白定位分析，具体方法参考文献（吴彤 2022）。每个样品选择 3 个阳性区域进行拍照（荧光显微镜，Zeiss Axio Imager A2，德国蔡司），利用 Image J 软件进行相对平均光密度分析。

1.2.5 数据分析 以上结果均以平均值 \pm 标准差（Mean \pm SD）形式表示。采用 SPSS 26.0 对数据进行统计学分析，通过单因素方差分析（one-way ANOVA）法比较 Ah 组与对照组之间的差异显著性，统计学意义为 $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 。利用 GraphPad Prism 8 软件进行作图。

2 结果

2.1 *ferH* 基因的克隆与生物信息学分析
以黑龙江林蛙肝组织的 cDNA 为模板扩增

ferH 基因，电泳检验目的基因条带清晰，与预测片段大小一致（图 1）。经序列测定，黑龙江林蛙 *ferH* 基因开放阅读框（open reading frame, ORF）区序列长为 534 bp，编码 177 个氨基酸。序列已上传 NCBI（登录号为 ON815294）。

采用 SWISS-MODEL 在线模拟黑龙江林蛙 *ferH* 蛋白的三级结构，以小鼠（*Mus musculus*）*ferH* 蛋白的三维结构 3wnw.1.A 为模板，对其进行建模。发现黑龙江林蛙 *ferH* 蛋白序列与小鼠 *ferH* 蛋白结构相似，序列一致性达到 86.53%。表明黑龙江林蛙 *ferH* 蛋白是一种空心的球状蛋白。运用 DNAMAN6.0 软件将黑龙江林蛙 *ferH* 基因的氨基酸序列与表 2 中 21 个参考物种进行同源性比对，黑龙江林蛙与欧洲林蛙此基因的氨基酸序列同源性最高，达到 98.37%。使用 MEGA11.0 构建黑龙江林蛙 *ferH* 基因氨基酸系统进化树，其与欧洲林蛙处于同一个最小的分支，亲缘关系最近（图 2）。

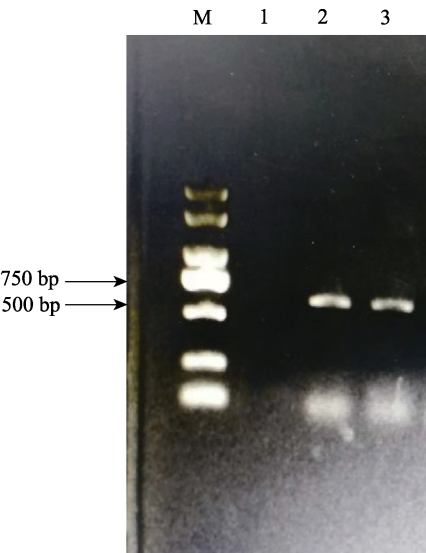


图 1 黑龙江林蛙 *ferH* 基因的克隆
Fig. 1 Cloning of *Rana amurensis ferH* gene

M. DL2000 DNA 分子量标准；1. 阴性对照；2 和 3. 目的基因产物。
M. DL2000 DNA marker; 1. Negative control; 2 and 3. *fer-h-A* PCR amplification products of *R. amurensis*.

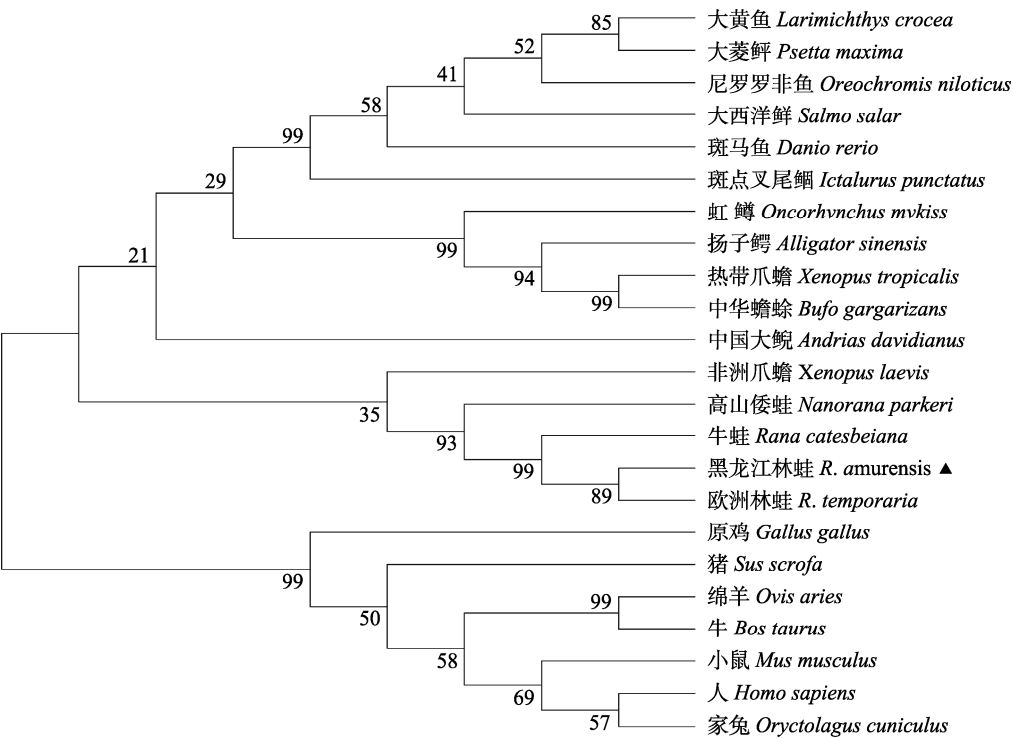


图 2 黑龙江林蛙 *ferH* 基因氨基酸序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of amino acid sequence of *ferH* gene of *Rana amurensis*

▲ 本研究物种样本。▲ indicates the experimental species in this study.

2.2 生理状态下铁蛋白基因在组织中的转录水平

经 RT-qPCR 分析发现, *ferH* 基因在黑龙江林蛙肝、脾、肾、皮肤和肌肉组织内均有表达, 且在脾组织中表达量最高, 其次按表达量从高到低依次是肝、肾、皮肤和肌肉组织 (图 3)。

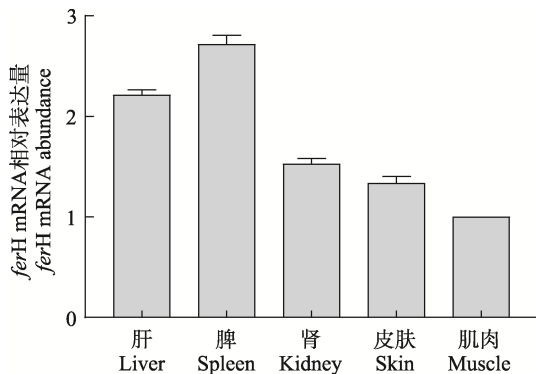


图 3 黑龙江林蛙 *ferH* 基因在组织中的表达分布

Fig. 3 Expression of *Rana amurensis ferH* gene in different tissues

2.3 嗜水气单胞菌侵染后铁蛋白基因在不同组织的转录水平

嗜水气单胞菌侵染后 *ferH* 基因在黑龙江林蛙各组织中普遍发生了转录上调。经嗜水气单胞菌侵染 6 h 后, 肝组织中 *ferH* 基因的表达量急速升高至峰值, 为对照组的 11.95 倍 ($P < 0.01$), 其后逐渐降低, 至 120 h 时仍高于对照组 5.01 倍 ($P < 0.01$) (图 4a); 在脾组织中, *ferH* 基因则在侵染 24 h 时表达量最高, 为对照组的 18.22 倍, 至侵染 120 h 时略低于对照组, 是对照组的 0.82 倍 ($P < 0.01$) (图 4b); 在肾组织中, *ferH* 基因也是在侵染 24 h 后达到最高表达量, 为对照组的 18.19 倍, 在 120 h 时恢复至对照的 3.53 倍 ($P < 0.01$) (图 4c); 皮肤和肌肉组织中 *ferH* 基因表达均在感染嗜水气单胞菌 6 h 后达到峰值, 分别为对照组的 24.31 以及 24.72 倍 ($P < 0.01$), 在感染嗜水气单胞菌 120 h 后, 皮肤中 *ferH* 基因的表达量仍为对

照组的 3.22 倍, 但是肌肉组织中 *ferH* 基因表达则低于对照组, 仅是对照组的 0.96 (图 4d, e)。

2.4 嗜水气单胞菌侵染后铁蛋白在不同组织中的表达

对 *Ah* 组和对照组黑龙江林蛙肝和肌肉中 *ferH* 蛋白进行免疫荧光检测, 两组 *ferH* 蛋白均有表达, 但是表达水平存在差异。对照组中荧光蛋白颗粒较少, *Ah* 组的肝和肌肉组织中均有较多蛋白阳性颗粒。分析 Image J 平均光密度值, 肝以及肌肉组织中的 *ferH* 蛋白均在感染嗜水气单胞菌 6 h 后表达量最高, 分别为对照组的 11.63 以及 4.82 倍 ($P < 0.01$), 感染 24 h 后, *ferH* 蛋白在两种组织中的表达开始呈下降趋势, 但至 48 h 时仍高于对照组, 分别为对照组的 8.71 和 3.77 倍 ($P < 0.01$)。可以推测 *ferH* 基因在转录与翻译水平上的结果与 RT-qPCR 趋势一致 (图 5, 6)。

3 讨论

两栖类因其特殊的生活习性在生态系统中占据重要地位, 黑龙江林蛙作为东北地区优势物种, 更是同时兼具食用与药用价值。2020 年 5 月黑龙江林蛙资源保护政策由保护为主转换为保护与利用并重, 自此人工养殖黑龙江林蛙规模日益增长。但由于其养殖密度远高于野生状态, 因此存在大面积染病的问题 (户国等 2022)。嗜水气单胞菌作为两栖类易感病原体, 由其引起的“红腿病”更是导致蛙类大量死亡的主要原因 (曲俐俐 2019)。研究表明, *ferH* 基因能作用于抗氧化反应, 同时参与机体免疫应答, 近年来探究其免疫功能已成为研究热点 (Salatino et al. 2019)。

本研究对黑龙江林蛙 *ferH* 基因进行了克隆与序列分析。经 DNAMAN 比对, 它与欧洲林蛙同源性较高; 基于 *ferH* 基因的氨基酸序列所构建的进化树也显示, 黑龙江林蛙与欧洲林蛙处于同一个最小的分支, 亲缘关系最近。同时其三级结构是由 24 个亚基环绕成空心的

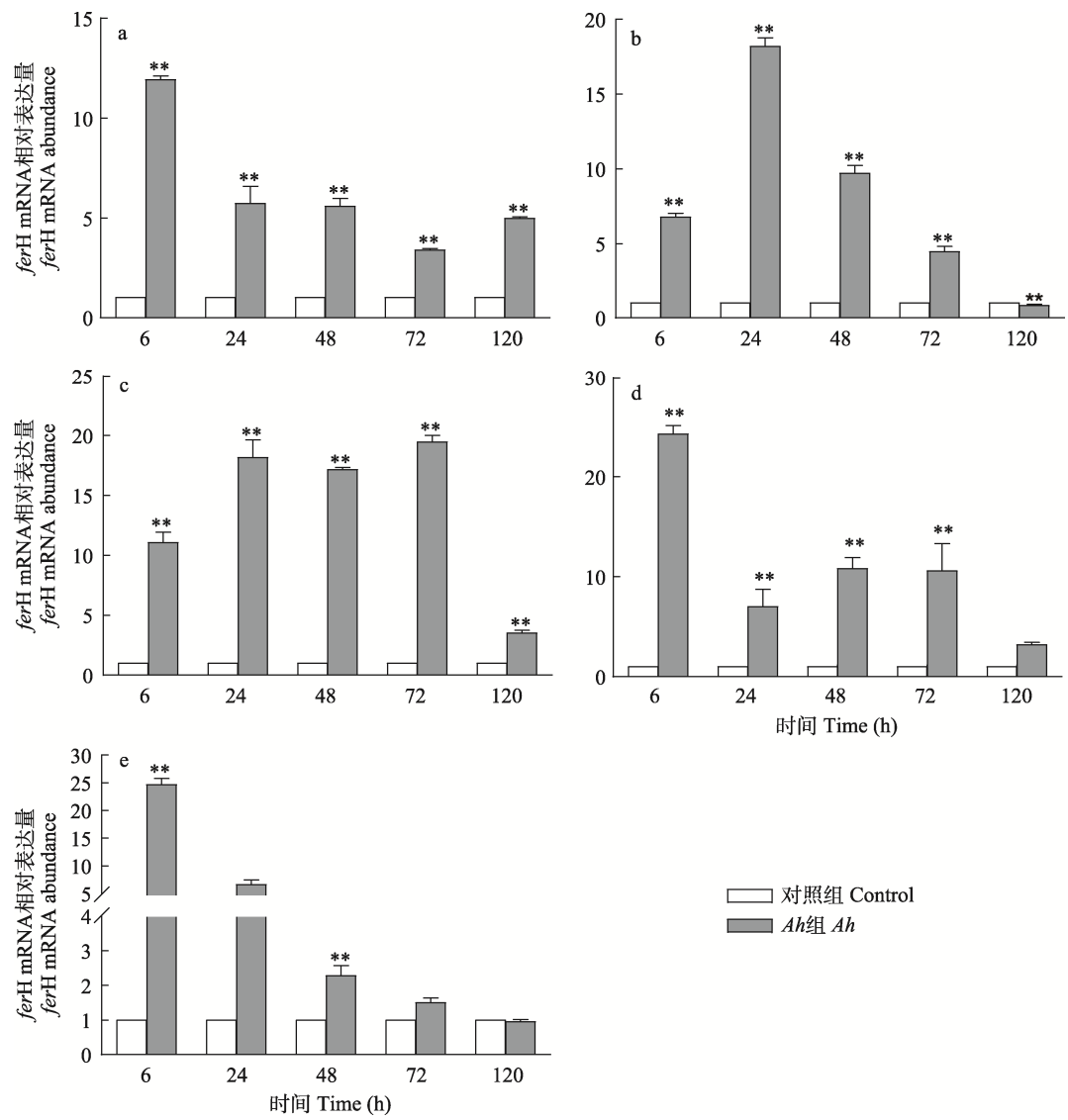


图 4 嗜水气单胞菌侵染后黑龙江林蛙 *ferH* 基因相对表达量

Fig. 4 The relative expression of *ferH* gene in tissues of *Rana amurensis* after infection with *Aeromonas hydrophila* (Ah)

a. 肝; b. 脾; c. 肾; d. 皮肤; e. 肌肉。 ** 表示与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。
a. Liver; b. Spleen; c. Kidney; d. Skin; e. Muscle. ** means very significant difference compared with the control group ($P < 0.01$).

球状蛋白，这与 Mohanty 等 (2021) 对人类铁蛋白结构的研究结果一致，证明 *ferH* 蛋白无论在两栖类还是在其他物种中结构都相对保守，推测其在不同物种中行使的功能也可能相近。
ferH 基因在生理状态下的黑龙江林蛙各组织中广泛表达，这与关于香鱼 (*Plecoglossus*

altivelis) (陈梦丹等 2017) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) (李东放 2021) 铁蛋白基因的研究结果相似。在黑龙江林蛙脾组织中 *ferH* 基因 mRNA 表达量最高，脾在维持铁稳态方面起着关键作用，可从陈旧或受损的红细胞中再摄取铁 (Sorokin et al. 2022)，

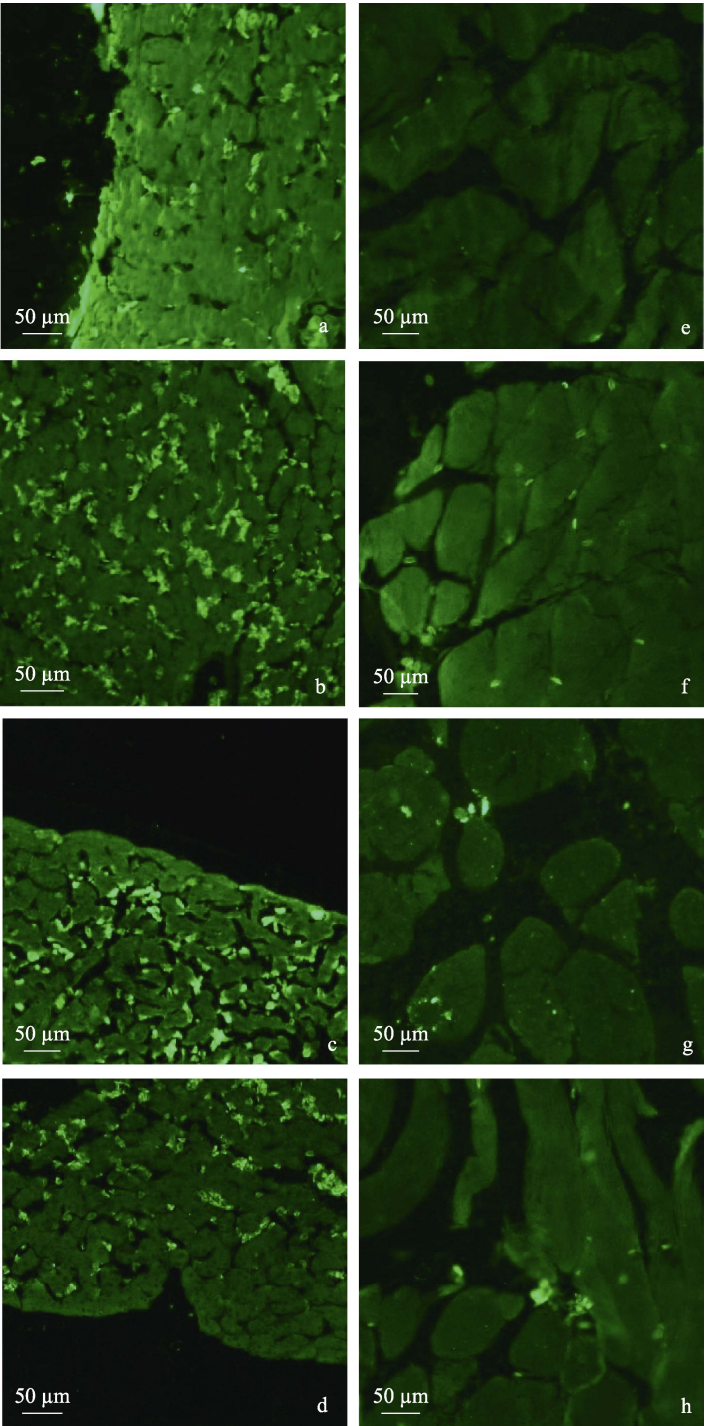


图5 嗜水气单胞菌感染后 *ferH* 蛋白在黑龙江林蛙组织中的表达分布
Fig. 5 Expression distribution of *ferH* protein in *Rana amurensis* tissues after *Aeromonas hydrophila* (Ah) infection

a. 对照组肝; b~d. 侵染 6、24 和 48 h 肝; e. 对照组肌肉; f~h. 侵染 6、24 和 48 h 肌肉。
a. Control group Liver; b - d. Infected liver at 6, 24 and 48 hours; e. Control group muscle; f - h. Infect muscle at 6, 24 and 48 hours.

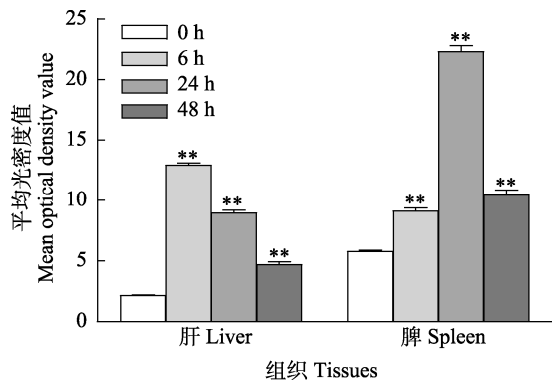


图 6 *ferH* 蛋白阳性反应平均光密度值

Fig. 6 Mean optical density values of positive *ferH* protein reactions

** 表示与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。
** means very significant difference compared with the control group ($P < 0.01$).

这表明黑龙江林蛙的脾组织可能与该物种中铁元素的有效控制息息相关，同时由于脾是两栖类的主要免疫器官，这一结果也从侧面说明 *ferH* 基因可能参与了黑龙江林蛙的免疫应答反应。

研究已经证实，铁元素也是病原体生长所需的营养物质，机体在遭到细菌侵染后，会通过上调铁蛋白基因的表达结合更多的铁离子，从而调控病原体对铁元素的利用 (Hu et al. 2010)。两栖类在受到细菌感染时，会通过上调白细胞介素-1 (*Interleukin-1*, *IL-1*)、白细胞介素-6 (*Interleukin-6*, *IL-6*)、肿瘤坏死因子- α (*Tumor necrosis factor- α* , *TNF- α*)、 γ 干扰素 (*Interferon- γ* , *IFN- γ*) 基因表达，以此提高白细胞吞噬并杀伤细菌的能力来诱导炎症反应的发生 (Khamees et al. 2022, Titon et al. 2022)。杂交鲫鱼感染嗜水气单胞菌后，其肝、肾和脾 *ferH* 基因的表达显著升高 (Xiong et al. 2021)。在本实验中，感染嗜水气单胞菌 6 ~ 120 h，黑龙江林蛙 *ferH* 基因的表达在各组织中均显著上调 ($P < 0.01$)，与上述结果一致。同时本研究发现，表达的峰值多数集中在感染后 6 ~ 24 h 内，这与大黄鱼 (*Larimichthys*

crocea) 感染细菌 12 h 内 *ferH* 基因表达快速增加相似 (Zhang et al. 2010)。表明 *ferH* 基因可能是参与黑龙江林蛙急性反应期的候选免疫分子，并且大多数与炎症相关的刺激都似乎优先上调铁蛋白的 h 型亚基 (Recalcati et al. 2008)。

研究表明，肝是铁代谢以及铁蛋白合成的主要器官 (丁祝进 2017)。本实验中免疫荧光检测结果显示，受到嗜水气单胞菌侵染后，*ferH* 蛋白在黑龙江林蛙肝中含量升高，这一结果验证了以上结论。另外，通过 Image J 平均光密度值分析，可知这一结果与 RT-qPCR 的结果相近，说明黑龙江林蛙 *ferH* 基因在转录和翻译水平具有统一性。关于团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) *ferH* 蛋白免疫荧光检测的研究显示 (Ding et al. 2017)，在嗜水气单胞菌侵染后，肝中 *ferH* 蛋白表达呈升高趋势，在感染 24 h 后达到最高，本实验结果与其相近，但阳性信号出现的峰值略有滞后，这可能与物种差异有关。另外 Ruscitti 等 (2015) 研究发现，患成人斯蒂尔氏病 (adult onset Still’s disease, AOSD) 的人类肝组织中 *ferH* 蛋白表达高于健康人类，这可能说明 *ferH* 基因在人类免疫缺陷类疾病中也起重要的调控作用，关于 *ferH* 基因在免疫过程中发挥功能的具体机制还有待研究。

本研究获得黑龙江林蛙 *ferH* 基因编码区 cDNA 序列，该序列在不同物种间具有一定保守性。嗜水气单胞菌侵染后该基因在转录与翻译水平均发生了显著上调。本研究初步探究了 *ferH* 基因在黑龙江林蛙细菌性感染中的表达模式，并推测 *ferH* 基因可能参与了黑龙江林蛙的细菌免疫应答。

参 考 文 献

Arosio P, Carmona F, Gozzelino R, et al. 2015. The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection. *Biochemical Journal*, 472(1): 1–15.
Ding Z, Zhao X, Zhan Q, et al. 2017. Comparative analysis of two

- ferritin subunits from Blunt Snout Bream. *Fish & Shellfish Immunology*, 66(4): 411–422.
- Finazzi I D, Arosio P. 2014. Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration. *Archives of Toxicology*, 88(10): 1787–1802.
- Haschka D, Tymoszek P, Petzer V, et al. 2021. Ferritin H deficiency deteriorates cellular iron handling and worsens *Salmonella typhimurium* infection by triggering hyperinflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 6(13): 34–36.
- Khamees D, Peterson W, Patricio M, et al. 2022. Remote learning developments in postgraduate medical education in response to the COVID-19 pandemic—A BEME systematic review: BEME Guide No. 71. *Medical Teacher*, 44(5): 466–485.
- Hu Y H, Zheng W J, Sun L. 2010. Identification and molecular analysis of a ferritin subunit from red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 28(4): 678–686.
- Mohanty A, Jena S S, Behera R K. 2021. Kinetics of ferritin self-assembly by laser light scattering: impact of subunit concentration, pH, and Ionic Strength. *Biomacromolecules*, 22(4): 1389–1398.
- Recalcati S, Invernizzi P, Arosio P, et al. 2008. New functions for an iron storage protein: the role of ferritin in immunity and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 30(1/2): 84–89.
- Ruscitti P, Cipriani P, Di Benedetto P, et al. 2015. Increased level of H-ferritin and its imbalance with L-ferritin, in bone marrow and liver of patients with adult onset Still's disease, developing macrophage activation syndrome, correlate with the severity of the disease. *Autoimmunity Reviews*, 14(5): 429–437.
- Salatino A, Aversa I, Battaglia A M, et al. 2019. H-Ferritin affects cisplatin-induced cytotoxicity in ovarian cancer cells through the modulation of ROS. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2019: 3461251.
- Sonia L E V I, Stephen J, Pauline M. 1992. Evidence that H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Journal of Biological Chemistry*, 288(4): 591–596.
- Sun S, Zhu J, Ge X, et al. 2016. Molecular characterization and gene expression of ferritin in Blunt Snout Bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish & Shellfish Immunology*, 57(6): 87–95.
- Sorokin E P, Bastý N, Whitcher B, et al. 2022. Analysis of MRI-derived spleen iron in the UK Biobank identifies genetic variation linked to iron homeostasis and hemolysis. *The American Journal of Human Genetics*, 109(6): 1092–1104.
- Titon S C, Titon J R B, Muxel S M, et al. 2022. Day vs. night variation in the LPS effects on toad's immunity and endocrine mediators. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 267(3): 111184.
- Xiong N X, Luo S W, Mao Z W, et al. 2021. Ferritin H can counteract inflammatory response in hybrid fish and its parental species after *Aeromonas hydrophila* infection. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 250(5): 109174.
- Zhang X, Wei W, Wu H, et al. 2010. Gene cloning and characterization of ferritin H and M subunits from Large Yellow Croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Fish Shellfish Immunol*, 28(5/6): 735–742.
- 陈梦丹, 朱凯, 徐铸婕, 等. 2017. 香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 铁蛋白的分子鉴定, 表达及功能研究. *海洋与湖沼*, 48(2): 373–382.
- 丁祝进. 2017. 团头鲂铁蛋白和转铁蛋白基因在嗜水气单胞菌感染过程中的免疫功能研究. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 30–31.
- 户国, 郭佳祥, 栾培贤, 等. 2022. 东北地区林蛙资源利用现状及养护对策. *水产学杂志*, 35(3): 93–97.
- 李东放. 2021. 草鱼铁蛋白基因 (Ferritin) 的表达特性及功能初探. 湖南: 湖南农业大学硕士学位论文, 41–42.
- 李亚茹, 孙淼, 刘琳, 等. 2022. 哈蟆油快速鉴定的开发与应用. *中药材*, 45(3): 555–560.
- 曲俐俐. 2019. 嗜水气单胞菌胁迫下东北林蛙 TLRs/MyD88 信号通路中关键分子 IKKs 的动态变化. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 20–21.
- 曲俐俐, 柴龙会, 王伯驹, 等. 2019. LPS 和嗜水气单胞菌胁迫下东北林蛙不同组织内 TBK1 转录产物表达动态的研究. *野生动物学报*, 40(1): 142–146.
- 吴彤. 2022. 瘦素及 LepROT 在两种林蛙抗感染中的作用研究. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学硕士学位论文, 19–20.
- 吴彤, 刘婷婷, 刘依铭, 等. 2022. 东北林蛙瘦素受体叠加转录蛋白基因的克隆及组织表达分析. *生物工程学报*, 38(5): 1859–1873.