



迟缓爱德华氏菌感染斑马鱼的模型构建及病理分析

邹文政¹, 余建明^{1,2}, 蔡鸿娇¹, 李忠琴^{1*}, 林茂¹, 王泽楠¹

1 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021

2 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081

邹文政, 余建明, 蔡鸿娇, 李忠琴, 林茂, 王泽楠. 迟缓爱德华氏菌感染斑马鱼的模型构建及病理分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4686-4697.

ZOU Wenzheng, YU Jianming, CAI Hongjiao, LI Zhongqin, LIN Mao, WANG Zenan. Construction and pathological analysis of a zebrafish model infected with *Edwardsiella tarda*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4686-4697.

摘要:【目的】本研究旨在建立迟缓爱德华氏菌感染斑马鱼的模型, 以提供疾病模型用于病理学、药理学和药物学研究。【方法】通过不同途径对斑马鱼进行人工感染, 模拟自然感染状态, 并研究迟缓爱德华氏菌对斑马鱼的致病机理, 包括死亡率、行为变化、生化指标和病鱼机体抗氧化能力的变化情况。【结果】比较3种感染途径, 显示腹腔注射的致病力最强。迟缓爱德华氏菌感染后, 斑马鱼表现出眼球突出、肛门出血、溃疡和腹水等症状。病理检查显示, 感染后的斑马鱼发生急性炎症, 可见肝细胞广泛坏死脱落, 肝小叶萎缩, 周围见吞噬细胞聚集。从患病斑马鱼体内分离出TX菌株, 并通过特异性引物聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)鉴定为迟缓爱德华氏菌, 确定该菌的半致死浓度 LD_{50} 为 3.65×10^2 菌落形成单位(colony forming units, CFU)尾。与对照组相比, 注射感染组的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力降低22.26%, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)显著升高16倍, 酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)活性和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活性分别上升38.99%和24.36%。【结论】本研究建立了斑马鱼腹腔注射感染迟缓爱德华氏菌的疾病模型, 感染后出现典型的疾病症状和生理生化特征, 确定了半致死感染剂量, 为迟缓爱德华氏菌感染水生动物的病理学研究和防治爱德华氏菌病的药物研制提供科学理论参考。

关键词: 迟缓爱德华氏菌; 斑马鱼; 致病性; 病理分析

资助项目: 福建省科技计划(2021N0014); 国家重点研发计划(2020YFD0900102); 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-46); 福建省海洋经济发展补助资金(FJHJF-L-2020-4); 集美大学培育基金(ZP2021003)

This work was supported by the Fujian Provincial Science and Technology Program (2021N0014), the National Key Research and Development Program of China (2020YFD0900102), the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-46), the Fujian Province Marine Economic Development Subsidy Fund Project (FJHJF-L-2020-4), and the Jimei University Cultivation Fund (ZP2021003).

*Corresponding author. E-mail: zhqinli@jmu.edu.cn

Received: 2023-04-23; Accepted: 2023-07-18; Published online: 2023-09-08

Construction and pathological analysis of a zebrafish model infected with *Edwardsiella tarda*

ZOU Wenzheng¹, YU Jianming^{1,2}, CAI Hongjiao¹, LI Zhongqin^{1*}, LIN Mao¹, WANG Zenan¹

1 Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China

2 College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China

Abstract: [Objective] To establish a zebrafish model of *Edwardsiella tarda* infection for the pathological studies and the development of drugs. **[Methods]** Zebrafish were artificially infected through different routes to simulate natural infection states, and the pathogenic mechanism of *E. tarda* in zebrafish was studied based on mortality, behavioral changes, biochemical indicators, and changes in the antioxidant capacity. **[Results]** Among the three infection routes, intraperitoneal injection showed the strongest pathogenicity. The zebrafish infected with *E. tarda* presented symptoms such as exophthalmos, anal bleeding, surface ulcers, and ascites. Pathological examination showed that the infected zebrafish developed acute inflammation, with extensive necrosis, degeneration, and shedding of hepatocytes and phagocytes gathering around. The TX strain was isolated from the diseased zebrafish and identified as *E. tarda* by polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. The median lethal dose (LD_{50}) of the strain was determined to be 3.65×10^2 colony forming units (CFU)/individual. Compared with the control group, the infection model established by injection showed a decrease of 22.26% in superoxide dismutase activity and increases of 16 folds in malondialdehyde content, 38.99% in acid phosphatase activity, and 24.36% in alkaline phosphatase activity. **[Conclusion]** An *E. tarda* infection model was established by intraperitoneal injection in zebrafish, which exhibited typical disease symptoms and physiological and biochemical characteristics, and the LD_{50} was determined. The findings provide a theoretical reference for the pathological studies and the drug development for *E. tarda* infections in aquatic animals.

Keywords: *Edwardsiella tarda*; zebrafish; pathogenicity; pathological analysis

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)为短杆型菌,最早由 Hoshina 于 1962 年在患病的日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)中分离得到^[1]。革兰氏染色为阴性,有短鞭毛,无荚膜,生长温度为 15–42 °C,最适合的生长温度为 25–37 °C;适合生长 pH 值为 5.5–9.0,适应力极强,而以 pH 值为 7.2 的情况下生长效果最好,适宜生长盐度为 0‰–40‰^[2–5]。在 *Salmonella Shigella* (SS)琼脂上,

培养的迟缓爱德华氏菌前 12 h 菌落为黄色、圆形、微凸;培养超过 24 h 后会自中心产生黑色硫化氢,形成黑色中心的菌落^[6]。

迟缓爱德华氏菌在自然界水环境中散布极为普遍,是常见的水源致病菌之一,可以感染包括如鱼、贝等多种水生动物,以及人类,甚至于鸟类也有感染的病例报道^[6]。宿主被感染后可引发多种疾病及并发症,如败血症、肝脓疡和胃肠

炎等病症^[7-9]。迟缓爱德华氏菌已被确定为多种鱼类的重要病原体,包括如斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、日本鳗鲡和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)等^[10];适宜的生长温度范围为30–37 °C^[11],并且在适合斑马鱼生长的温度(25–30 °C)下感染^[12]。迟缓爱德华氏菌感染斑点叉尾鲷、日本鳗鲡和牙鲆后,引起的疾病主要是全身性败血症,以及坏死性脓肿、肛门红肿、出血和腹部发白等^[13]。

斑马鱼(*Danio rerio*)是发育生物学、神经生物学、毒理学和遗传疾病广泛使用的研究模型,是进行药物毒理学评估的良好模式动物^[14]。由于斑马鱼为热带鱼,生长的温度与迟缓爱德华氏菌最适生长温度重合,且对迟缓爱德华氏菌非常敏感,水体和饲料中带菌易感染患病。同时,斑马鱼作为模式动物,也十分适合用于感染模型的研究。目前有关迟缓爱德华氏菌感染模型的研究较少,也缺乏有效的防治手段^[15],在本试验中,以斑马鱼为研究对象,人工感染迟缓爱德华氏菌,研究了斑马鱼人工感染迟缓爱德华氏菌的不同方式、主要的病理学症状以及感染后生化指标的测定。通过研究迟缓爱德华氏菌感染斑马鱼的模型可以有效对养殖过程中水生生物感染迟缓爱德华氏菌病提供科学的疾病防控参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

健康斑马鱼480尾,平均体长(3±0.5) cm。先暂养于水族缸内,水温(25±2) °C,每天早晚各投喂1次,每2天换水1/4,暂养2周后挑选270尾健康的鱼进行试验,分为27组,每组10尾,养于3 L鱼缸内,试验前1 d不投喂。迟缓爱德华氏菌(*E. tarda*) T9,来自鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)、碱

性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)等试剂盒购自南京建成生物工程研究所。OCT 冷冻切片包埋剂(optimum cutting temperature compound)购自北京诺博莱德科技有限公司。

1.2 菌株纯化与培养

将–80 °C保存的迟缓爱德华氏菌T9划线于SS培养基上,28 °C恒温培养24 h,挑取单个菌落接入LB (Luria-Bertani)营养肉汤,28 °C恒温摇床200 r/min培养至对数生长期(OD_{600} 值达到1.0),取菌液4 °C、4 000 r/min离心,弃上清,用生理盐水重悬洗涤3次后备用

1.3 注射感染及半数致死量(lethal dose, LD_{50})测定

采用腹腔注射感染方式进行,试验组用微量进样器注射迟缓爱德华氏菌菌液,每尾10 μL,感染浓度分别为 1.5×10^2 、 1.5×10^3 、 1.5×10^4 和 1.5×10^6 CFU/尾。对照组注射0.9% NaCl的生理盐水10 μL/尾。每个梯度组注射10尾鱼,每组设3个平行组。注射后养于亚克力鱼缸内,每日正常饲喂,并观察鱼的行为活动、发病和死亡迹象,并取发病、濒死的鱼进行病原分离鉴定和组织病理学检查。

1.4 表皮创伤浸泡感染

用无菌手术刀沿斑马鱼胸鳍后方侧面轻轻刮擦,以去除3–5个鳞片,并刮擦鱼体真皮。对照组、试验组创伤后的鱼分别养于迟缓爱德华氏菌浓度为0 CFU/mL和 1.5×10^6 CFU/mL的3 L鱼缸中,每个浓度组10尾鱼,每组设3个平行组。试验采用静态浸泡,连续7 d,每日观察记录鱼的行为活动、发病和死亡迹象。

1.5 剪尾鳍浸泡感染

用无菌手术剪剪去斑马鱼尾鳍,对照组和试验组剪尾后的鱼分别养于含迟缓爱德华氏菌终浓度为0 CFU/mL和 1.5×10^6 CFU/mL的3 L鱼缸中,每个浓度组10尾鱼,每组设3个平行

组。试验采用静态浸泡, 连续 7 d, 每日观察记录鱼的行为活动、发病和死亡迹象。

1.6 内脏团生化指标活性测定

取迟缓爱德华氏菌注射感染组(1.5×10^4 CFU/尾)感染后第 10 天的活鱼以及对照组鱼进行生化指标测定。将鱼麻醉后, 先用 75%乙醇浸泡 30 s, 然后在无菌条件下取出斑马鱼内脏团, 并称量, 放入 2 mL 离心管中, 加入 9 倍于内脏团重量的灭菌生理盐水进行匀浆。参照试剂盒说明书操作对病鱼内脏进行 SOD、ACP、AKP 和 MDA 等指标测定。

1.7 组织病理学观察

取注射组感染发病且有明显病症的濒死斑马鱼和对照组健康斑马鱼进行冷冻切片, 观察其组织病理变化。具体操作方法为: 将鱼麻醉之后, 用无菌手术剪沿鱼腹线剪开, 在解剖镜下取出肝脏, 置于 20 倍样本体积的 4%甲醛溶液中固定 48 h 后, OCT 包埋, 液氮速冻, 立即进行冷冻切片, 经苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 后中性树脂封片, 完全干燥后用正置荧光显微镜观察。

1.8 重新分离细菌

取注射组感染发病且有明显病症的濒死斑马鱼进行麻醉后, 先用 75%乙醇浸泡 30 s, 然后在无菌条件下将斑马鱼解剖并取出内脏团放入 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 灭菌生理盐水进行匀浆。匀浆液用生理盐水稀释 100 倍后取 0.1 mL 涂布 SS 琼脂平板上, 28 °C 恒温培养 2 d 后, 挑取形状、大小、颜色一致的优势菌落进行划线分离纯化, 直至获得纯菌。

1.9 分离菌株形态观察

以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为对照, 分离的菌株进行革兰氏染色。

1.10 菌株鉴定

采用常规菌液聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 进行分离菌株鉴定。将分

离纯化的细菌接种至 LB 肉汤, 置于恒温摇床培养, 温度 28 °C、速度为 200 r/min, 取对数生长中 5 期的菌液作为 PCR 模板。PCR 反应体系为 25 μ L: 10 μ mol/L 正引物 1 μ L、反引物 1 μ L、ddH₂O 9.5 μ L、模板菌液 1 μ L、2 \times Taq MasterMix 12.5 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min, 重复 35 个循环。扩增的片段进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 并比对结果。所用特异性引物为迟缓爱德华氏菌 5 唾液酸酶基因 mRNA 引物 F (5'-CTGATGGACACGGCAAA GTG-3') 和 R (5'-GATAACGGCCTGCGATAGAA-3')。GenBank 登录号: LC268999.1。所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.11 16S rRNA 基因序列分析

将病鱼体内分离得到的菌株 MH、Qi 和 TX 挑取单个菌落接入 LB 营养肉汤, 28 °C 恒温摇床 200 r/min 培养过夜, 取 1.5 mL 菌液, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。将测得序列通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 进行 BLAST 序列同源性分析, 并下载相关 16S rRNA 基因序列, 使用 MEGA X 的 Clustal W 模式进行序列匹配, 使用邻接法 (neighbour-joining, NJ) 构建进化树并进行 1 000 次自举分析。

2 结果与分析

2.1 三种人工感染方式比较

斑马鱼分别经 3 种操作方式感染迟缓爱德华氏菌, 死亡情况见图 1。在试验期间, 对照组斑马鱼活动正常, 没有发生死亡。表皮创伤组、剪尾鳍组和腹腔注射组在感染后 7 d 内的平均累积死亡率分别为 30.5%、27.0%和 100%。

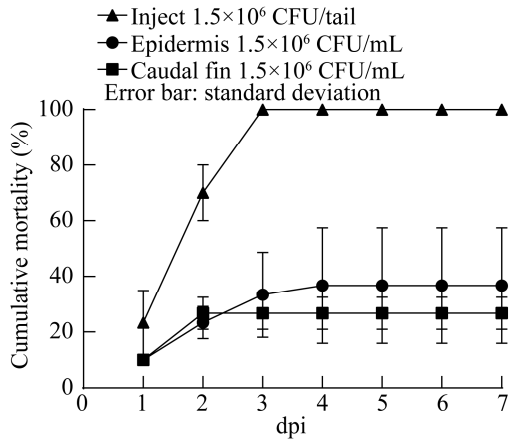


图 1 三种感染方式感染斑马鱼的累积死亡率

Figure 1 Cumulative mortality rate of zebrafish infected with three different modes of infection for 7 days. Each point represents the means mortality from three replicate experiments.

2.2 感染后斑马鱼的表现症状

迟缓爱德华氏菌感染后，斑马鱼的眼球突出(图 2A、2B)；腹部膨胀(图 2C)，有腹水(图 2D)；肛门水肿(图 2D)；注射部位较大病变，严重溃烂；体表出现溃疡(图 2D)等，其行为表现为食欲不振，游动缓慢，对外界刺激反应迟钝等。

2.3 感染后斑马鱼组织病理学观察

斑马鱼感染迟缓爱德华氏菌后，肝脏组织形态严重受损，大面积坏死(图 3A)。肝细胞坏死脱落，吞噬细胞增生(图 3B)，肝小叶排列松散，萎缩，出现空泡状变性(图 3C)。对照组未见明显异常(图 3D)。

2.4 感染后病原菌的再分离与鉴定

2.4.1 菌株分离结果

从对照组和注射组斑马鱼的内脏、水样中，经 SS 琼脂培养分离纯化，从注射组斑马鱼内脏中得到 3 株可疑菌株，根据优势菌丰度由高到低分别命名为 TX、MH 和 Qi，对照组鱼内脏未分离出细菌。菌株 TX 在 SS 琼脂平板上 28 °C 培养，前 12 h 为黄色、圆形、微凸的细小菌落，培养超过 24 h 后形成黑色中心的菌落(图 4A)，与菌株 T9 SS 琼脂平板上菌落形态一致(图 4B)，

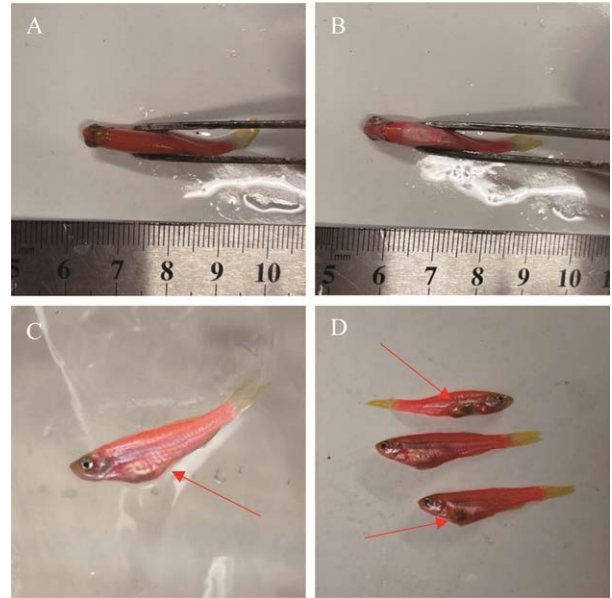


图 2 感染后斑马鱼的表现症状

Figure 2 The phenotypic symptoms of zebrafish infection with *Edwardsiella tarda*. A: Exophthalmos (dorsal view). B: Exophthalmos (ventral aspect view). C: Abdominal swelling. D: Abdominal swelling, ulceration, ascites, exophthalmos.

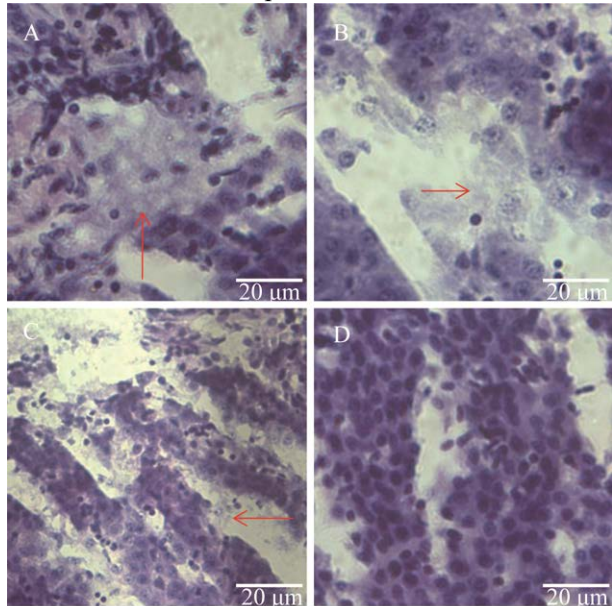


图 3 斑马鱼的肝脏病理切片

Figure 3 Liver biopsy of zebrafish after infection with *Edwardsiella tarda*. A: The arrows indicate severely damaged liver tissue with extensive necrosis. B: The arrows indicate necrosis and shedding of liver cells, and proliferation of phagocytic cells. C: The arrows indicate that the hepatic lobules are loosely arranged, shrunk, and appear vacuolar degeneration. D: No abnormality was found in the control group.

同一块分离平板数量占 92.6%；菌株 Qi 在 SS 琼脂平板上 28 °C 培养 24 h 后形成圆形、黄色、湿润、光滑的菌落(图 4C)，同一块分离平板上数量仅为 7.4%；菌株 MH 在 SS 琼脂平板上 28 °C 培养 24 h 后形成圆形、玫红色、个别中心带黑点的菌落(图 4D)，同一块分离平板上极少，偶有出现。

2.4.2 重分离菌株镜检观察

分离菌株 TX、MH 和 Qi 均为革兰氏阴性，结果见图 5。菌株 TX 为短杆状(图 5D)，菌株 MH 为长杆状(图 5E)，菌株 Qi 为两端钝圆、类椭圆形(图 5F)。

2.4.3 菌液 PCR 鉴定结果

将分离菌 TX、MH 和 Qi 的菌液作为模板进行 PCR 扩增，其产物进行琼脂糖凝胶电泳，结果见图 6。从图中可以看出，菌株 Qi、MH 的唾液酸酶基因 PCR 产物无电泳条带；菌株 TX 和原始菌株 T9 的唾液酸酶基因 PCR 产物电泳条带一致，介于 100–250 bp。根据电泳结果可以推断菌株 TX 可能为迟缓爱德华氏菌。

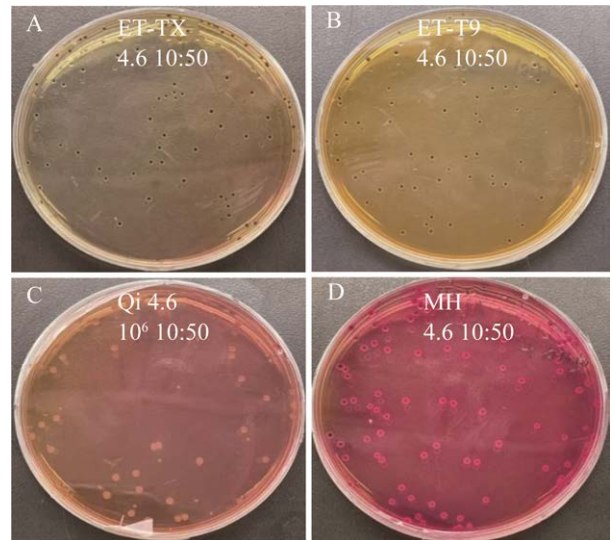


图 4 TX、MH 和 Qi 及原始感染菌株 *Edwardsiella tarda* T9 在 SS 琼脂平板上菌落形态

Figure 4 Morphology of TX, MH, Qi and original infected *Edwardsiella tarda* T9 on SS agar plate. A: The colony morphology of TX strain on SS agar plate. B: The colony morphology of the original infected strain T9 on SS agar plate. C: The colony morphology of Qi strain on SS agar plate. D: The colony morphology of MH strain on SS agar plate.

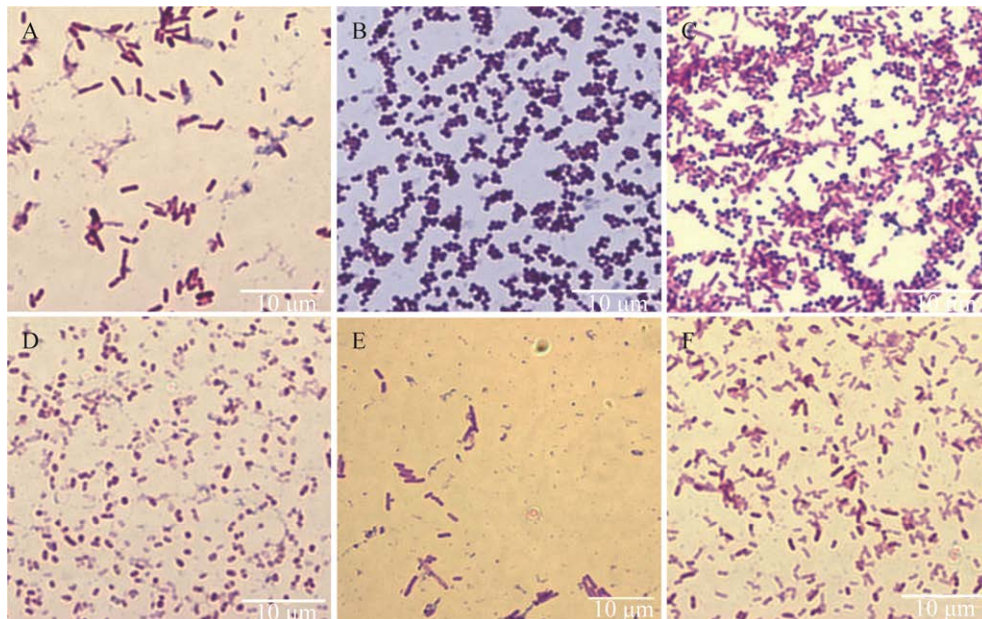


图 5 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、菌株 TX、MH 和 Qi 的革兰氏染色镜检图片

Figure 5 Gram's stain microphotograph of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, strains TX, MH and Qi. A: *Escherichia coli*. B: *Staphylococcus aureus*. C: Mixed *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. D: TX. E: MH. F: Qi.

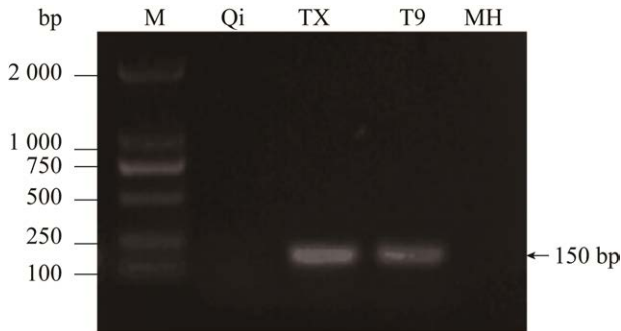


图 6 唾液酸酶基因的 PCR 产物电泳图
Figure 6 PCR electrophoresis of sialidase gene. M: DL2000 DNA marker; Qi: PCR product of strain Qi sialidase gene; TX: PCR products of sialidase gene of strain TX; T9: PCR product of sialidase gene of original strain T9; MH: PCR products of sialidase gene of strain MH.

2.4.4 16S rRNA 基因序列分析结果

将得到的序列在 NCBI 上将得到的序列进行 BLAST 分析, 菌株 MH 为弗氏柠檬酸杆菌 (登录号: ON533730), 序列与弗氏柠檬酸杆菌同源率为 99.93%。菌株 Qi 为维氏气单胞菌 (登录号: ON533731), 序列与维氏气单胞菌同源率为 99.86%。菌株 TX 为迟缓爱德华氏菌 (登录号: SUB12995589), 序列与迟缓爱德华氏菌同源率为 99.93%。构建的系统发育树表明菌株 MH 与弗氏柠檬酸杆菌处于同一进化分支, 菌株 Qi 与维氏气单胞菌处在同一进化分支, 菌株 TX 与迟缓爱德华氏菌处于同一进化分支(图 7)。

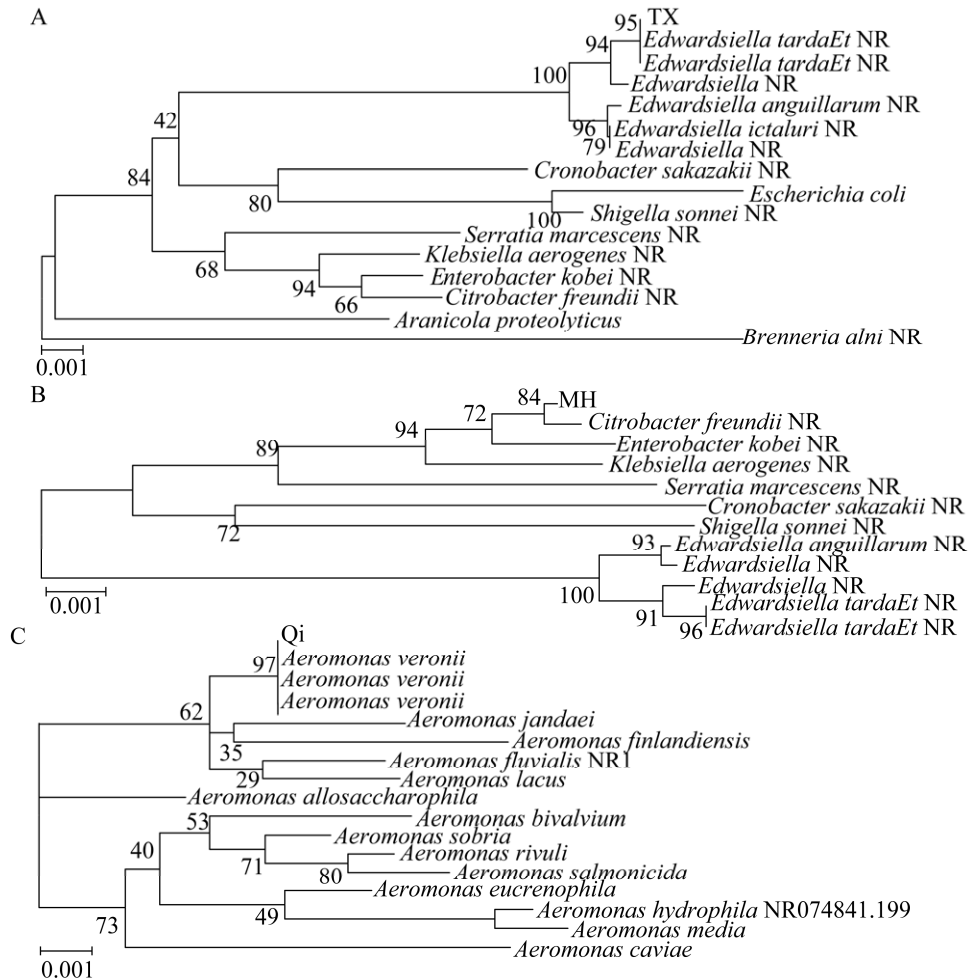


图 7 基于菌株 TX、MH 和 Qi 的 16S rRNA 序列构建的系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA sequences of strains TX, MH, and Qi. A: Phylogenetic tree of TX. B: Phylogenetic tree of MH. C: Phylogenetic tree of Qi. The numbers of nodes are the results of 1 000 bootstrap replicates and the scale bar represents the genetic distance.

2.5 腹腔注射感染动力学

迟缓爱德华氏菌腹腔注射感染斑马鱼累积死亡情况见图 8, 对照组未表现死亡现象。由图可知, 在感染 7 d 内, 腹腔注射感染组 1.5×10^2 、 1.5×10^3 、 1.5×10^4 和 1.5×10^6 CFU/尾的斑马鱼平均累积死亡率分别为 43.33%、53.33%、57.67% 和 100%。感染组 1.5×10^6 CFU/尾的斑马鱼在 3 dpi 全部死亡, 其余感染组死亡集中在 1-4 dpi。斑马鱼腹腔注射迟缓爱德华氏菌各浓度累积死亡率与菌浓对数关系拟合方程 $y=0.141x-0.177$ 2 ($R^2=0.920$ 4), 根据 Reed-Muench 方法计算得到 LD_{50} 为 3.65×10^2 CFU/尾。

2.6 斑马鱼注射感染后生化指标

斑马鱼腹腔注射 1.5×10^4 CFU/尾的迟缓爱德华氏菌感染第 10 天, 其内脏团 SOD 活力和抑制率、内脏团 MDA 含量、内脏团磷酸酶活性见图 9。由图可知, 对照组、感染组平均 SOD 活力分别为 180.38 U/mg prot 和 140.24 U/mg prot, 平均 SOD 抑制率分别为 24.12% 和 18.86%; 感染组较对照组 SOD 活力下降 22.26%, SOD 抑制

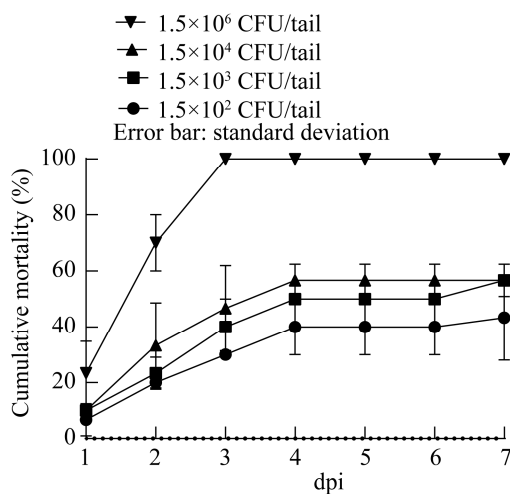


图 8 腹腔注射感染斑马鱼累积死亡率
Figure 8 Cumulative mortality of zebrafish infected by intraperitoneal injection of *Edwardsiella tarda*. Each point represents the means mortality from three replicate experiments.

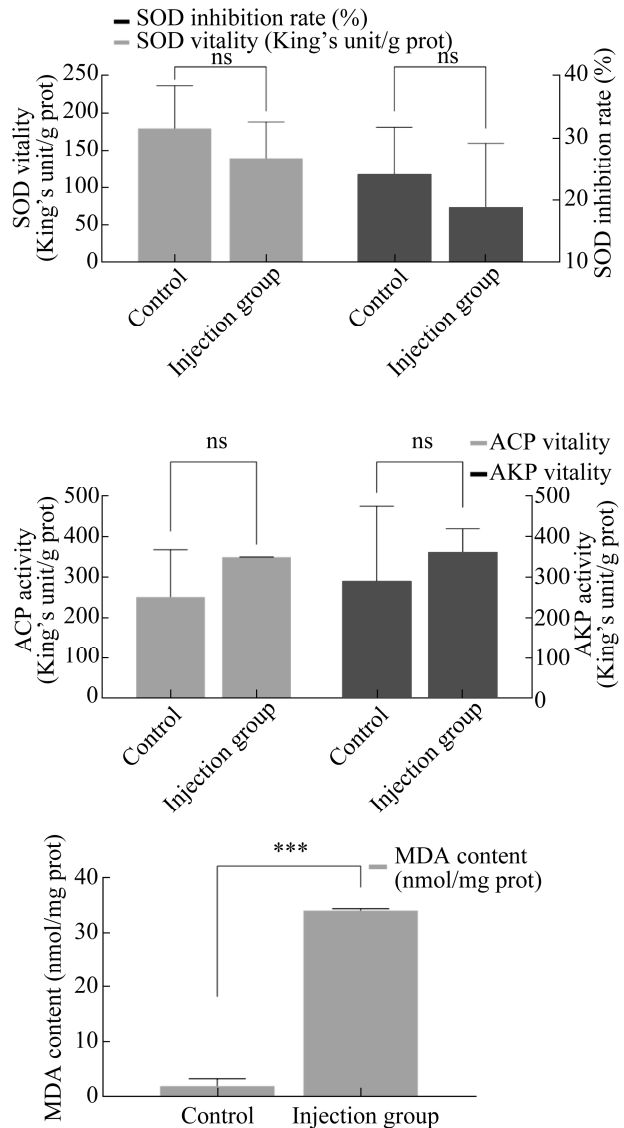


图 9 斑马鱼注射感染后生化指标测定
Figure 9 Determination of biochemical characteristics in zebrafish after injection of *Edwardsiella tarda*. ***: Significant difference compared with the control ($P < 0.01$); ns: There was no significant difference with the control ($P > 0.05$).

率下降 5.26%, 两试验组 SOD 活力和抑制率没有显著性差异 ($P > 0.05$)。对照组和感染组平均 MDA 含量分别为 1.96 nmol/mg prot 和 34.05 nmol/mg prot, 感染组较对照组增加 16 倍, 两者之间差异性极显著 ($P < 0.01$)。其内脏团磷酸酶活性见图 9。由图可知, 对照组和感染组平均 ACP 活力分别为

251.7 King's unit/g prot 和 349.9 King's unit/g prot, 平均 AKP 活力分别为 290.9 King's unit/g prot 和 361.8 King's unit/g prot。感染组较对照组 ACP 和 AKP 活力分别上升 38.99%和 24.36%, 但两组之间均无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 三种人工方式感染斑马鱼比较

在自然条件下, 迟缓爱德华氏菌可以感染多种水生生物, 并引起死亡, 如尼罗罗非鱼^[16]、莫桑比克罗非鱼(*Tilapia mossambica*)^[17]、鲤鱼^[18]、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[19]、奇努克鲑鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)^[20]和虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)^[21]。Pressley 等^[12]研究发现, 以斑马鱼作为宿主研究迟缓爱德华氏菌的致病力时, 未对鱼体造成损伤的感染方式不会造成明显感染。本研究以 3 种不同方式人工感染, 发现斑马鱼腹腔注射迟缓爱德华氏菌的 LD_{50} 为 3.65×10^2 CFU/尾; 腹腔注射、表皮创伤和剪尾鳍浸泡于浓度为 1.5×10^6 CFU/mL 迟缓爱德华氏菌水体, 在感染后 7 d 内斑马鱼的死亡率分别为 57.67%、30.5%和 27.0%, 表明迟缓爱德华氏菌可以引起斑马鱼致病, 且腹腔注射感染在菌浓较低的情况下可使斑马鱼发病、甚至死亡; 机体体表创伤在较高菌浓水体中, 斑马鱼也会受到感染、死亡。这可能是由于斑马鱼的创伤, 导致机械屏障的破坏, 引起菌的继发性感染; 同时, 感染发病的鱼经细菌再分离、鉴定, 丰度最高优势菌确定为迟缓爱德华氏菌。这些结果也表明斑马鱼可以作为研究迟缓爱德华氏菌感染的模型生物。

3.2 迟缓爱德华氏菌感染后的表现和病理学症状

水生生物被迟缓爱德华氏菌感染后, 通常表现为体表发红、脏器脓肿等病理变化。自然发病

以及人工感染爱德华氏菌的日本比目鱼^[22]和鲶鱼^[23]肾脏和肝脏明显脓肿和坏死; 罗非鱼感染迟缓爱德华氏菌后, 腹部发红, 肛门红肿、出血^[24]; 对于注射感染的斑马鱼, 美洲黑石斑在感染迟缓爱德华氏菌后体表未出现异常, 但鳃丝内出现白点, 内脏有白点结节^[25]。本试验通过人工感染迟缓爱德华氏菌, 斑马鱼腹部肿胀、出血, 表皮溃疡, 肝脏组织空泡状变性、细胞破碎, 变性, 萎缩坏死, 这些发病症状与其他鱼类自然或人工感染迟缓爱德华氏菌发病症状类似。

皮肤感染是多种细菌感染宿主的入侵途径, Chu 和 O'Toole 等^[26-27]研究发现, 嗜水气单胞菌主要通过该途径感染宿主。本试验以表皮创伤感染的斑马鱼, 在创伤部位会有溃疡、点状出血; 以剪尾鳍感染的斑马鱼症状不明显, 死亡率较低, 且尾鳍有重新长出的趋势, 这是因为斑马鱼尾鳍再生能力强^[28]。此外, 前者较后者感染后死亡明显, 这可能是表皮屏障防御在鱼类预防感染方面起着至关重要的作用, 也进一步说明在浸泡感染前去除鳞片、刮去表皮和磨损真皮使斑马鱼更易被细菌感染^[29]。

3.3 斑马鱼感染迟缓爱德华氏菌后生化指标变化

彭国瑞等^[11]研究发现, 斑马鱼感染迟缓爱德华氏菌后, 表现出了严重的肝组织变性, 这与本研究报道的结果一致。关于迟缓爱德华氏菌的致病机理尚未完全探明, 本试验通过测定斑马鱼急性感染后的生化指标, 研究迟缓爱德华氏菌感染斑马鱼的致病机理。斑马鱼在急性感染后, 机体产生大量的活性氧自由基, 从而刺激机体分泌 SOD 来清除自由基^[30], 因此 SOD 活力是反应感染后机体变化情况的一个指标。沈洪艳等^[31]研究表明, 在抗生素如头孢噻肟钠的胁迫下, 会破坏斑马鱼机体的抗氧化平衡系统, 给机体带来不同程度的氧化损伤, 表现为 SOD 活性抑制, MDA

含量升高。本试验采用 1.5×10^4 CFU/尾注射感染组的斑马鱼活鱼以及对照组鱼进行 SOD 测定, 结果显示感染组较对照组的 SOD 活力和抑制率分别下降 22.26% 和 5.26%, 表明斑马鱼被迟缓爱德华氏菌感染后细胞严重损伤, 进而引起发病症状。

丙二醛(MDA)是脂质过氧化后的主要产物之一, 当鱼被感染后, 体内脂质过氧化程度上升, MDA 含量也随之上升。这间接反映了细胞损伤的程度, 从而反应免疫力下降的程度^[31]。在本试验中, 感染组 MDA (34.05 nmol/mg prot) 显著高于对照组 MDA (1.96 nmol/mg prot), 升高 16 倍。表明迟缓爱德华氏菌感染斑马鱼导致体内细胞严重氧化损伤, 进而导致免疫力严重下降。在本试验中, 除了迟缓爱德华氏菌外, 还从发病鱼体内分离出了柠檬酸杆菌和维氏气单胞菌, 表明斑马鱼在感染迟缓爱德华氏菌后出现了继发性感染的情况, 这些继发性感染可能会对鱼体免疫系统造成更严重的损伤, 并且进一步破坏抗氧化平衡系统。

酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)是 2 种重要的溶酶体酶, 广泛应用于细胞吞噬研究中, 并被认为是细胞吞噬作用的代表性标记酶, 磷酸酶的变化在一定程度上反映了动物体免疫系统的受损情况^[32], ACP 同时也表明细胞内消化活动的进行^[33], 斑马鱼体内细胞可以通过胞饮的作用直接吸收蛋白质颗粒, 然后在胞内进行消化^[34]。本试验结果表明, 注射感染组斑马鱼 ACP 活力和 AKP 活力均高于对照组, 这表明斑马鱼被迟缓爱德华氏菌感染后启动了细胞免疫反应, 以细胞吞噬的方式消除细菌等不利因子。

4 结论

本研究通过不同的人工感染方式(剪尾鳍浸泡、表皮创伤浸泡和腹腔注射)对斑马鱼感染迟

缓爱德华氏菌进行了系统研究, 包括感染途径、发病机理、致死原因和半致死剂量等, 为病理学、药理学和药物学研究提供了疾病模型。研究结果显示, 在 3 种感染方式中, 腹腔注射感染的斑马鱼疾病症状最为明显, 表现出眼球突出、肛门出血、溃疡和腹水等症状, 半致死剂量 LD_{50} 为 3.65×10^2 CFU/尾; 通过 SOD、MDA、ACP 和 AKP 等生化指标的检测, 以及肝脏病理切片的观察, 发现斑马鱼在感染迟缓爱德华氏菌后会出现严重的细胞氧化损伤, 导致免疫力严重下降, 从而引发其他病原菌的继发性感染。综上所述, 本研究揭示了斑马鱼易受迟缓爱德华氏菌感染的途径, 尤其在破坏皮肤屏障后感染明显。研究结果为鱼类疾病学研究和防治药物研制提供了重要的疾病模型构建方法。

参考文献

- [1] HOSHINA T. On a new bacterium, *Paracolobactrum anguillimortiferum* n. sp.[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1962, 28(2): 162-164.
- [2] BERGEY DH. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology[9st]. New York: Springer New York, 2012.
- [3] 肖克宇, 黄志坚, 金燮理, 舒新华, 陈可毅, 江为民. 牛蛙爱德华氏菌病原菌的鉴定和致病因素的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(3): 316-321.
XIAO KY, HUANG ZJ, JIN XL, SHU XH, CHEN KY, JIANG W. Studies on the pathogenicities and biologic characteristics of the pathogens causing the edwardsiellosis of the bullfrog[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(3): 316-321 (in Chinese).
- [4] WAKABAYASHI H, EGUSA S. *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1973, 39(9): 931-936.
- [5] BIN PARK S, AOKI T, JUNG TS. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish[J]. Veterinary Research, 2012, 43(1): 67.
- [6] 李飞翔. 迟缓爱德华氏菌及鱼类迟缓爱德华氏菌病研究进展[J]. 江西水产科技, 2019(2): 28-29.
LI FX. Research progress on *Edwardsiella tarda* and *Edwardsiella tarda* in fish[J]. Jiangxi Fishery Science and Technology, 2019(2): 28-29 (in Chinese).

- [7] 陈宗淦, 朱江, 魏威, 吴莹芳. 迟缓爱德华氏菌败血症 3 例[J]. 大理学院学报(医学版), 1998(3): 57-58.
CHEN ZG, ZHU J, WEI W, WU Y. Three cases of *Edwardsiella tarda* septicemia[J]. Journal of Dali Medical College, 1998(3): 57-58 (in Chinese).
- [8] 李成芸, 赵琼, 杨永梅, 刘祖荣, 牛英. 爱德华菌败血症合并肝、肺脓肿一例[J]. 中华传染病杂志, 1999, 17(4): 233.
LI CY, ZHAO Q, YANG YM, LIU ZR, NIU Y. A case of *Edwardsiella* septicemia complicated with liver and lung abscess[J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 1999, 17(4): 233 (in Chinese).
- [9] 李刚山, 尹惠琼, 邱薇, 孙阳, 龙沛然, 徐庆. 感染性腹泻患者中缓慢爱德华菌的分离鉴定及侵袭性实验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(2):173.
LI GS, YIN HQ, QIU W, SUN Y, LONG PR, XU Q. Isolation, identification and invasiveness experimental study of *Edwardsiella tarda* in patients with infectious diarrhea[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2002, 12(2):173 (in Chinese).
- [10] EVANS JJ, KLESZIUS PH, PLUMB JA, SHOEMAKER CA. *Edwardsiella* septicemias[M]// Fish Diseases and Disorders. Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections UK: CABI, 2011: 512-569.
- [11] 彭国瑞, 王成龙, 王雪鹏, 陆承平. 迟缓爱德华菌人工感染斑马鱼的致病性及组织病理学变化[J]. 畜牧与兽医, 2011, 43(1): 23-26.
PENG GR, WANG CL, WANG XP, LU CP. The pathogenicity and histopathological changes of artificially infected zebrafish with *Edwardsiella tarda*[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 43(1): 23-26 (in Chinese).
- [12] PRESSLEY ME, PETER E. PHELAN HELAN III P. ECKHARD WITTEN, MELLON MT, KIM CH. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2005, 29(6): 501-513.
- [13] LING SHM, WANG XH, LIM TM, LEUNG KY. Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 194(2): 239-243.
- [14] 李红燕, 谢倩, 王成, 李金秀, 马荣, 任救宏, 李勇, 王佳俊, 陈海, 王建. 斑马鱼在药物毒理学评估中应用及机制的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(1): 278-288.
LI HY, XIE Q, WANG C, LI JX, MA R, REN MH, LI Y, WANG JJ, CHEN H, WANG J. Research progress on application and mechanism of zebrafish in drug toxicology assessment[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(1): 278-288 (in Chinese).
- [15] 郑大海, 麦康森. 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)研究概况[J]. 海洋湖沼通报, 2004(1): 52-59.
ZHENG DH, MAI K. Review of studies on *Edwardsiella tarda*[J]. Transaction of Oceanology and Limnology, 2004(1): 52-59 (in Chinese).
- [16] 邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 庞耀珊, 董建宝, 谢志勤, 谢丽基. 罗非鱼迟缓爱德华氏菌的分离与鉴定[J]. 水生生态学杂志, 2009, 2(1): 114-117.
DENG XW, XIE ZX, LIU JB, PANG YS, DONG JB, XIE ZQ, XIE LJ. Isolation and identification of *Edwardsiella tarda* in *Tilapia nilotica*[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 2(1): 114-117 (in Chinese).
- [17] KAIGE N, MIYAZAKI T, KUBOTA SS. A histopathological study of edwardsiellosis in tilapia-experimental infection[J]. Fish Pathology, 1986, 21(2): 95-99.
- [18] SAE-OUI D, MUROGA K, NAKAI T. A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored carp *Cyprinus carpio*[J]. Fish Pathology, 1984, 19(3): 197-199.
- [19] FOGELSON SB, PETTY BD, REICHELLEY SR, WARE C, BOWSER PR, CRIM MJ, GETCHELL RG, SAMS KL, MARQUIS H, GRIFFIN MJ. Histologic and molecular characterization of *Edwardsiella piscicida* infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2016, 28(3): 338-344.
- [20] AMANDI A, HIU SF, ROHOVEC JS, FRYER JL. Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(6): 1380-1384.
- [21] REDDAKLIFF GL, HORNITZKY M, WHITTINGTON RJ. *Edwardsiella tarda* septicemia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Australian Veterinary Journal, 1996, 73(1): 30.
- [22] MATSUYAMA T, FUJIWARA A, NAKAYASU C, KAMAISHI T, OSEKO N, HIRONO I, AOKI T. Gene expression of leucocytes in vaccinated Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) during the course of experimental infection with *Edwardsiella tarda*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(6): 598-607.

- [23] SHOEMAKER CA, KLESIUS PH, PLUMB JA. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1997, 58(2): 181-190.
- [24] ELGENDY MY, SHERIF AH, KENAWY AM, ABDELSALAM M. Phenotypic and molecular characterization of the causative agents of edwardsiellosis causing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) summer mortalities[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 169: 105620.
- [25] 吴静, 王庚申, 柳敏海, 李伟业, 汪玮, 施慧, 许文军, 谢建军, 何杰. 美洲黑石斑迟缓爱德华氏菌分离、鉴定及致病性研究[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(1): 143-152.
- WU J, WANG GS, LIU MH, LI WY, WANG W, SHI H, XU WJ, XIE JJ, HE J. Isolation, identification and pathogenicity of the pathogenic bacterium from *Centropristis striata*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(1): 143-152 (in Chinese).
- [26] CHU WH, LU CP. *In vivo* fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker[J]. *Aquaculture*, 2008, 277(3/4): 152-155.
- [27] O'TOOLE R, von HOFSTEN J, ROSQVIST R, OLSSON PE, WOLF-WATZ H. Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2004, 37(1): 41-46.
- [28] 田丽莉, 盛东来, 朱国福. 白藜芦醇对斑马鱼尾鳍再生的促进作用及机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(5): 1098-1101.
- TIAN LL, SHENG DL, ZHU GF. Study on the promoting effect and mechanism of resveratrol on the regeneration of tail fin of zebrafish[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2016, 27(5): 1098-1101 (in Chinese).
- [29] NEELY MN, PFEIFER JD, CAPARON M. *Streptococcus*-zebrafish model of bacterial pathogenesis[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(7): 3904-3914.
- [30] 冉曦, 肖春江, 冉新泽. 腹盆腔放射治疗的并发症及其防治研究[J]. *中国辐射卫生*, 2017, 26(2): 249-253.
- RAN X, XIAO CJ, RAN XZ. Study on complications and prevention of abdominal and pelvic radiotherapy[J]. *Chinese Journal of Radiological Health*, 2017, 26(2): 249-253 (in Chinese).
- [31] 沈洪艳, 焦晓会, 武彤. 头孢噻肟钠对斑马鱼 SOD 活性、MDA 含量及 DNA 损伤的影响[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(8): 2626-2632.
- SHEN HY, JIAO XH, WU T. Effects of cefotaxime sodium on SOD activity, MDA content and DNA damage in zebrafish[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(8): 2626-2632 (in Chinese).
- [32] 王一泽, 孙敬锋, 刘军锋, 郭永军, 邢克智, 吕爱军, Yeong Yiksung. 养殖半滑舌鳎肝胰、中肾、鳃、头肾、脾和心中酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和过氧化物酶的组织化学定位[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2017, 26(3): 229-234.
- WANG YZ, SUN JF, LIU JF, GUO YJ, XING KZ, LV AJ, YIKSUNG Y. Histochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase and peroxidase in the hepatopancreas, mid-kidney, gill, head kidney, spleen and heart of cultured *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2017, 26(3): 229-234 (in Chinese).
- [33] 詹付凤, 赵欣平. 重金属镉对鲫鱼碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性的影响[J]. *四川动物*, 2007, 26(3): 641-643.
- ZHEN FF, ZHAO XP. Effects on cadmium on ACP and AKP in *Carassias auratus*[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2007, 26(3): 641-643 (in Chinese).
- [34] 曹新芳, 黄卉卉, 任秋楠, 陈婷婷, 王静, 张盛周. 泥鳅消化道过氧化物酶、三磷酸腺苷酶、琥珀酸脱氢酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶及非特异性酯酶的分布与组织定位[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2018, 27(5): 453-458.
- CAO XF, HUANG HH, REN QN, CHEN TT, WANG J, ZHANG SZ. Distribution and histological localization of peroxidase, adenosine triphosphatase, succinate dehydrogenase, acid phosphatase, alkaline phosphatase and non-specific esterase in the digestive tract of *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2018, 27(5): 453-458 (in Chinese).