

斑马鱼白细胞介素34对细菌和病毒感染的转录应答

张琴, 陈康勇, 田佳音, 邹钧

Transcriptomic response of zebrafish Interleukin-34 to bacterial and viral infection

ZHANG Qin, CHEN Kangyong, TIAN Jiayin, ZOU Jun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210303359>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[斑马鱼肿瘤坏死因子\(*tnf* \$\alpha\$ \)及其受体\(*tnfrsf1a*\)应答细菌和病毒感染的表达](#)

Expression analysis of zebrafish tumor necrosis factor (*tnf* α) and its receptor (*tnfrsf1a*) in response to bacterial and viral infections
上海海洋大学学报. 2020, 29(2): 171 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190302560>

[尼罗罗非鱼*TIRAP*基因克隆、组织表达及其在无乳链球菌、脂多糖和聚肌胞苷酸刺激下的免疫应答](#)

Cloning and expression of *TIRAP* gene and immune response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*, lipopolysaccharides and polyinosinic polycytidylic acid stress
上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 857 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-318>

[斑马鱼幼鱼嗜中性粒细胞对副溶血弧菌清除的动态变化](#)

Dynamic changes of neutrophils against *Vibrio parahaemolyticus* in zebrafish larvae
上海海洋大学学报. 2020, 29(2): 180 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190502654>

[斑马鱼*il-11b*基因5'端启动子序列及体外活性分析](#)

Sequence analysis of 5' upstream promoter of *il-11b* gene in zebrafish and construction of reporter gene vectors
上海海洋大学学报. 2021, 30(4): 581 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191102843>

[镜鲤抗疱疹病毒\(CyHV-3\)*F*₄抗病品系病毒表达量评估](#)

Research on expression of virus in Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) *F*₄ disease resistant strains
上海海洋大学学报. 2021, 30(2): 258 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200302949>

文章编号: 1674-5566(2022)05-1078-11

DOI:10.12024/jsou.20210303359

斑马鱼白细胞介素 34 对细菌和病毒感染的转录应答

张 琴, 陈康勇, 田佳音, 邹 钧

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘 要: 白细胞介素 34 (Interleukin-34, IL-34) 是一种多功能细胞因子, 在先天免疫和炎症过程中发挥重要作用。利用荧光定量 PCR 技术分析 *IL-34* 在细菌和病毒感染后的表达情况。结果显示, *IL-34* 在健康斑马鱼组织和胚胎发育过程中呈常量表达。腹腔注射脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和聚肌苷酸-聚胞苷酸 [polyinosinic acid-polycytidylic acid, Poly (I:C)] 后, 斑马鱼脾中 *IL-34* 表达在 48 和 72 h 均上调, 肠中 *IL-34* 表达均显著升高 (除 LPS 刺激 24 h 时 *IL-34* 表达下降外)。斑马鱼感染迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 后, 肠中 *IL-34* 表达明显增加 (3、9 和 24 h), 而脾中 *IL-34* 的表达则受到抑制 (6、9 和 72 h)。腹腔注射感染鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV) 后, 脾 (1、3、5 和 7 d) 和肠 (1 和 3 d) 中 *IL-34* 表达也显著上调。体外分析结果显示, SVCV 感染和 LPS 刺激增强 ZF4 细胞中 *IL-34* 的表达; LPS、IL-1 β 和 IFN γ 诱导脾原代细胞表达 *IL-34*。实验结果表明, 鱼类 *IL-34* 基因在抵御细菌和病毒感染过程中发挥重要作用。

关键词: 斑马鱼; 白细胞介素 34; 细菌; 病毒; 细胞因子

中图分类号: S 941.4 **文献标志码:** A

白细胞介素 34 (Interleukin34, IL-34) 是一种促炎细胞因子, 对单核细胞和巨噬细胞髓系细胞存活、增殖和分化起着重要的调控作用^[1-3]。IL-34 诱导 II 型巨噬细胞表达 IL-10, 抑制 IL-12 合成, 促使 II 型巨噬细胞极化^[3]。研究^[4-5]报道, 在应激反应中, *IL-34* 的表达受体 Nuclear Factor kappa-B (NF- κ B) 介导信号通路调控。IL-34 与多种疾病相关, 包括自身免疫性疾病、炎症和癌症等^[6-9]。例如, *IL-34* 在类风湿性关节炎和皮肤干燥综合征患者中过度表达^[6]。另外, *IL-34* 能促进白血病患者单核细胞分化, 为治疗白血病提供了新的靶点^[8]。

IL-34 和巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage-colony stimulating factor, M-CSF) 激活同一受体, 即巨噬细胞集落刺激因子受体 (macrophage-colony stimulating factor receptor, M-CSFR), 因此具有与 M-CSF 相似的免疫功能。IL-34 和 M-CSF 可促进细胞生长和存活^[10], 诱导趋

化因子的产生和分泌^[11]。然而, IL-34 与 M-CSF 的生物活性和作用机制不完全一致^[12]。它们对原代巨噬细胞中单核细胞趋化因子-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 和嗜酸细胞活化趋化因子-2 (eotaxin-2) 的合成、对 TF-1-fms 细胞的形态影响以及对 J774A 细胞的迁移等具有不同的效应^[13]。与 M-CSF 相比, IL-34 能更有效地诱导巨噬细胞产生 eotaxin-2。M-CSF 培养的 TF-1-fms 细胞会形成众多大聚集体, 而在 IL-34 培养的细胞中这种大聚集体非常少见, 并且 IL-34 诱导 J774A 细胞迁移的能力明显较 M-CSF 弱^[13]。相比于 M-CSF, IL-34 与 M-CSFR 亲和力强, 能快速诱导效应物的合成, 并迅速下调 M-CSFR 的表达^[13]。研究^[14-15]发现 IL-34 与受体蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase- ζ , PTP- ζ) 和多配体蛋白聚糖 (syndecan-1) 的亲和力较低。IL-1 β 和 TNF- α 通过激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 诱导 *IL-*

收稿日期: 2021-03-29 修回日期: 2021-07-19

基金项目: 重要水产养殖生物抗病和抗逆性状的遗传基础与调控机制项目 (2018YFD0900302); 鱼类抗菌肽的挖掘与潜在产业应用项目 (1939043100)

作者简介: 张 琴 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类免疫与病害防控。E-mail: zq15079112131@163.com

通信作者: 邹 钧, E-mail: jzou@shou.edu.cn

34 表达,但是对 *M-CSF* 的表达没有影响^[5]。

尽管 IL-34 与其他已知蛋白缺乏明显的序列相似性,但被归类为短链螺旋细胞因子,与 *M-CSF* 和干细胞因子(stem cell factor)属于同一家族^[16]。哺乳动物 IL-34 整体结构由 6 个 α 螺旋和 2 个反平行 β 折叠组成。其中 4 个较长的螺旋 αA 、 αB 、 αC 和 αD 形成典型的反平行四螺旋束构像。折叠 $\beta 1$ 和短螺旋 $\alpha 1$ 位于 αA 和 αB 之间,短螺旋 $\alpha 2$ 和折叠 $\beta 2$ 位于 αC 和 αD 之间,这两部分呈交错构像位于 αB 和 αD 的外侧^[12,17]。IL-34 和 *M-CSF* 均形成同型二聚体发挥生物活性,*M-CSF* 同型二聚体由二硫键连接,而 IL-34 同型二聚体则以共价键连接形成^[17]。研究^[18]表明 IL-34 和 *M-CSF* 的 D2 和 D3 结构域之间的区段与 *M-CSFR* 结合。此外,IL-34 螺旋 $\alpha 1$ 中存在保守的 N-糖基化位点,该位点占据 $\alpha 1$ 和 αC 之间的空隙,对 IL-34 在溶液中的稳定性至关重要^[12]。

硬骨鱼类 *IL-34* 是单拷贝基因。*IL-34* 已经在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、河豚(*Fugu rubripes*)^[19]、石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[20]、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[21]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[22] 和日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[23] 中被发现。硬骨鱼类 *IL-34* 基因编码 204 ~ 226 个氨基酸,其编码蛋白具有较高同源性,其中斑马鱼与草鱼氨基酸序列同源性高达 77.6%,与虹鳟和河豚的氨基酸序列同源性也达到了 51.5% 和 47.3%。WANG 等^[19] 发现 LPS、Poly (I: C)、IFN- γ 、IL-1 β 以及凝集素(phytohemagglutinin, PHA)均上调 *IL-34* 在虹鳟细胞系(RTS-11、RTL、RTG-2 和 RTGill)和虹鳟原代巨噬细胞中的表达,而 IL-6 和免疫抑制剂 DM (Dexamethasone) 则抑制 *IL-34* 的表达;此外,在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染的大黄鱼中,*IL-34* 转录本在鳃和皮肤中明显增加^[20];嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染的草鱼脾和头肾中 *IL-34* 表达量也显著升高^[22],这些研究表明 *IL-34* 参与了宿主应答细菌感染的免疫反应。本研究分析了 *IL-34* 在健康斑马鱼组织和胚胎中的常量表达,以及 LPS、Poly (I: C)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*, *E. tarda*) 和鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)对斑马鱼 *IL-34* 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

野生型斑马鱼(约 5 g)购自中国科学院水生生物研究所。将斑马鱼置于(25 \pm 2) $^{\circ}$ C 的循环养殖系统中暂养 2 周,早晚各投喂丰年虫 1 次。实验前 1 天停止投喂,在注射和解剖取样前用质量分数为 0.4% 的 MS-222 麻醉斑马鱼。所有实验均按照国家实验动物法规进行,获得上海海洋大学实验室动物伦理委员会批准(批准号:SHOU-DW-2019-003)。

1.2 实验试剂

实验试剂包括:3-氨基苯甲酸乙酯甲磺酸(3-Aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate, MS-222, Sigma)、TRIzol[®] Reagent (Invitrogen)、无水乙醇(国药)、异丙醇(国药)、氯仿(国药)、DEPC 水(生工)、琼脂糖 H(生工)、琼脂糖凝胶回收试剂盒(Omega)、小型质粒抽提试剂盒(Omega)、去内毒素质粒提取试剂盒(Omega)、LB 液体培养基(生工)、琼脂(生工)、限制性内切酶(Thermo)、逆转录试剂盒(Hifair[®] II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR, 翊圣)、qPCR 试剂盒(SYBR[®] Green PreMix ExTaq[™] II, 翊圣)、ExTaq Mix (TaKaRa)、pMD19-T (TaKaRa)、DNA marker (TaKaRa)、氨苄青霉素(Ampicilin, 生工)、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG, VWR)、Tris (VWR)、DTT (VWR)、EDTA (VWR)、氧化型谷胱甘肽和还原型谷胱甘肽(VWR)、盐酸胍(VWR)、考马斯亮蓝(BiofRox)、10 \times TBS 漂洗液(生工)、甘油(生工)、Tween 20(生工)、咪唑(生工)、DMEM 培养基(Gibco)、胎牛血清(FBS, Gibco)、青霉素-链霉素(Gibco)、脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS, Sigma)、聚肌苷酸-聚胞苷酸[Polyinosinic acid-polycytidylic acid, Poly (I: C), Sigma] 和磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS, Sigma)。

1.3 实验仪器

实验仪器包括:组织匀浆仪 TissueLyser II (Qiagen)、荧光定量 PCR 仪 LightCycler[®] 480 (Roche)、PCR 扩增仪(Thermo Scientific)、电泳仪 POWERPAC BASIC (BioRad)、凝胶成像系统 GelDocTMXR + (BioRad)、高速冷冻离心机

(Eppendorf)、分光光度计 Nanodrop 2000 (Thermo)、水浴锅 XMTD-8222(上海精宏实验设备有限公司)、电子天平 YP10002(上海佑科仪器仪表有限公司)、高压灭菌锅 MLS-3781L (Panasonic)、超纯水系统 MILLI-Q DIRTCT-8 (Millipore)、恒温金属浴 HX-20TL(上海沪析实业有限公司)、超净工作台 (Esco) 和 AKTA Purifiers (GE Healthcare)。

1.4 *IL-34* 基因在胚胎和成鱼组织中的表达分析

采集斑马鱼胚胎,检测胚胎发生过程中 *IL-34* 基因的表达。在斑马鱼受精后 10、24、48 和 72 h, 收集胚胎并置于含 1 mL TRIzol 试剂的 Eppendorf (EP) 离心管中,每个时间点收集 5 管,每管 30 个胚胎。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,qPCR 检测 *IL-34* 基因在胚胎中的表达情况。

用 0.4% MS-222 麻醉斑马鱼后,取鳃、肠、脾脏、肾脏、肝脏、肌肉和皮肤,并置于含有 1 mL TRIzol 试剂的 EP 离心管中,设 3 个平行组,每组含 10 尾斑马鱼组织的混合样品。用组织匀浆仪破碎组织,置于 -80 °C 冰箱保存备用。使用有机溶剂法提取总 RNA,qPCR 模板制备严格按照 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书,qPCR 检测 *IL-34* 基因在各个组织中的表达情况。

1.5 LPS 和 Poly (I:C) 刺激实验

将 360 尾健康斑马鱼随机分成 3 组(1 组对照组和 2 组实验组),每组 120 尾斑马鱼。腹腔注射斑马鱼:10 μ L LPS(100 μ g/mL)、Poly (I:C) (100 μ g/mL) 或等体积 PBS(对照组)。注射后 12、24、48 和 72 h 分别取脾和肠放入 1 mL TRIzol 试剂中用于 RNA 提取,每个时间点设置 3 个平行,每个平行组 10 尾鱼。按照 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书制备 cDNA 模板,qPCR 检测 *IL-34* 基因的表达情况。

1.6 迟缓爱德华氏菌感染实验

迟缓爱德华氏菌 (*E. tarda*) 由中国科学院水生生物研究所谢海霞提供,具体制备方法参照田佳音等^[24]。将 240 尾健康斑马鱼随机分成 2 组,每组 120 尾斑马鱼。实验组斑马鱼腹腔注射 10 μ L 迟缓爱德华氏菌(1×10^5 CFU/mL),对照组注射等体积的 PBS。在注射 3、6、9、24 和 72 h 后分别取脾和肠放入 1 mL TRIzol 试剂中,用于 RNA

提取,每个时间点设置 3 个平行。按照 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书制备 cDNA 模板,qPCR 检测 *IL-34* 基因的表达情况。

1.7 鲤春病毒血症病毒感染实验

与细菌攻毒实验相似,分别用 10 μ L DMEM 培养基(对照)和 10 μ L 的 1×10^5 TCID₅₀/mL SVCV 溶液腹腔注射斑马鱼。注射后 1、3、5、7 和 14 d 取脾和肠提取 RNA,每个时间点设置 3 个平行。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 *IL-34* 基因的表达情况。

1.8 SVCV 感染斑马鱼胚胎成纤维细胞系 (ZF4) 实验

将冻存的 ZF4 细胞从液氮罐中取出,放置于 28 °C 水浴锅中 1 min 解冻,然后将细胞悬液迅速转移至装有 10 mL DMEM/F12 培养基(100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素,P/S)的离心管中,室温 200 r/min 离心 10 min,弃去离心后的上清,用含有 10% FBS 和 1% P/S 的 DMEM/F12 培养基重悬细胞,将细胞悬液转移至 25 cm² 的细胞培养瓶中,在 28 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,待细胞密度达到 5×10^6 细胞/mL 时,消化细胞并均分到六孔细胞培养板中。待细胞贴壁后弃掉培养基,实验组加入 100 μ L 1×10^7 TCID₅₀/mL SVCV 病毒液,对照组加入等体积的 DMEM 培养基,置于 5% CO₂、22 °C 培养箱 1 h,吸弃病毒液并加入 2 mL 含 2% FBS 的 DMEM 培养基。以上实验操作均在无菌条件下进行。感染 12、24 和 48 h 时收集细胞用于 RNA 提取,所有时间点设置 4 个平行。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 *IL-34* 基因的表达情况。

1.9 LPS 和 Poly (I:C) 感染 ZF4 细胞和脾原代细胞实验

ZF4 细胞实验前处理详见 1.8 节。待细胞在六孔细胞培养板中贴壁后,加入 50 μ g/mL LPS 或 50 μ g/mL Poly (I:C),对照组加入等体积 PBS,每个处理组设置 4 个平行。刺激 12 h 后收集细胞,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 *IL-34* 基因的表达情况。

斑马鱼脾原代细胞的分离:在无菌条件下解剖 40 尾斑马鱼,取脾放入装有 20 mL DMEM 培

培养基的 50 mL 离心管中,将组织置于 70 μm 尼龙网研磨过滤,收集滤过的细胞悬液,200 r/min 离心 10 min,弃上清,用含有 10% FBS、1% P/S 的 DMEM 完全培养基重悬细胞沉淀并均分至六孔细胞培养板中。在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 4 h,加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 或 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Poly (I:C),对照组加入等体积的 PBS,每个处理组设置 4 个平行。12 h 后收集细胞,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 *IL-34* 基因的表达情况。

1.10 重组蛋白的表达及纯化

从美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 获取斑马鱼 *IFN ϕ 1* 和 *IFN ϕ 4* 的序列 (登录号: NM_207640.1、NM_001161740.1),设计引物扩增目的基因序列 (表 1)。采用限制性核酸内切酶 (*Nco* I 和 *Hind* III) 双酶切目的片段及空载体 (pEHISTEV-b) 并进行连接,将连接后的产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,挑取含目的片段的单阳性菌落,测序验证后进行质粒提取,将重组表达质粒转化至 BL21 菌中,进行诱导表达。重组蛋白诱导具体方法步骤详见 QIN 等^[25]。采用稀释复性法复性蛋白,用分子筛层析柱法 (Superdex 75/200 column) 进行纯化,纯化步骤按照 AKTA pure 仪器纯化说明书进行操作。

从斑马鱼脾 cDNA 模板中扩增出 *IL-1 β* (登录号: NM_212844.2) 的开放阅读框 (ORF)。采用限制性核酸内切酶 (*Hind* III 和 *Bam*H I) 双酶切目的片段并连接到 pcDNA3.1 载体上,将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,挑取单阳性菌落检测及测序成功后根据去内毒素质粒提取试剂盒操作说明进行质粒 (pcDNA3.1-*IL-1 β*) 提取。

转染前将 HEK293 细胞接种于六孔细胞培养板中,按照 Lipofectamine 3000 转染试剂盒使用说明进行转染。从加有 125 μL Opti-MEM[™] 培养基和 7 μL Lipofectamine[™] 3000 试剂的混合液中与加有 125 μL Opti-MEM[™] 培养基,5 μL P3000[™] 试剂和 2.5 μg 重组质粒 (对照组加入等质量的

pcDNA3.1 载体) 的混合液中各吸取 125 μL 液体,混匀,室温放置 15 min 后加入到细胞培养基中。48 h 后收集细胞上清,400 g 离心 10 min 后保留上清。纯化 *IL-1 β* 重组蛋白:用 PBS 平衡亲和柱 (Ni-NTA 柱),将收集的细胞上清加入亲和柱,收集过柱穿透液,重复上样 1 次,用 10 mL PBS 洗涤亲和柱,加入 10 mL 不同浓度 (30、60 和 150 mmol/L) 的咪唑进行洗脱并分别收集洗脱液,洗脱结束后分别用 10 mL 0.5 mol/L NaOH 和 10 mL 去离子水清洗纯化柱,最后用 10 mL 体积分数为 20% 乙醇平衡并 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存纯化柱。采用免疫印迹法 (Western blotting) 和 His 抗体检测蛋白溶液。用于 Western blotting 的一抗为 His 标签鼠单克隆抗体 (1:1 000 稀释,华安生物),二抗为 HRP 荧光标记的羊抗鼠抗体 (1:10 000 稀释,华安生物)。

1.11 *IL-1 β* 、*IFN ϕ 1* 及 *IFN ϕ 4* 刺激 ZF4 细胞和脾原代细胞实验

ZF4 细胞实验前处理详见 1.8 节,脾原代细胞实验前处理详见 1.9 节。ZF4 细胞和脾原代细胞在细胞培养箱中静置 4 h,用终浓度为 50 ng/mL 的 *IL-1 β* 、*IFN ϕ 1* 或 *IFN ϕ 4* 重组蛋白刺激细胞,对照组加入等体积的 PBS,12 h 后收集细胞,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 *IL-34* 基因的表达情况。

1.12 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件对实时荧光定量 PCR 生成的数据进行统计分析。对实验组采用单因素方差分析,进行 LSD 事后检验,实验组与对照组差异有统计学意义, $P < 0.05$ (用 * 表示) 和 $P < 0.01$ (用 ** 表示) 分别表示差异显著和极显著。

2 结果

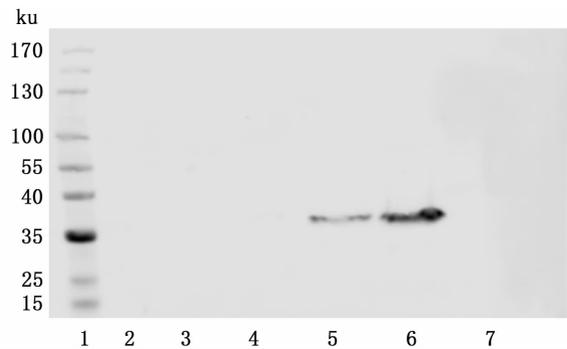
2.1 重组蛋白表达及纯化

参照田佳音^[26]进行 *IFN ϕ 1* 和 *IFN ϕ 4* 蛋白表达及纯化。将真核质粒 pcDNA3.1-*IL-1 β* 转染 HEK293 细胞,48 h 后收集细胞上清,利用亲和层析柱法纯化重组蛋白,纯化结果如图 1 所示。

表 1 基因引物信息

Tab. 1 Information of gene primers

基因名称 Gene	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	用途 Use
<i>IL-34</i>	CTGGAGGCCAGCTCAAACAT ATCAAGAAGAGTAGTACCCTAGCATTAC	qPCR
<i>Eflα</i>	GTCACACCCAAATCAATCCTTG TGTTGTTTTCTTCTTTCTCC	qPCR
<i>IFNφ1</i>	CATGCCATGGGGTCTACTTGCGAATGGCTTGG CCCAAGCTTTTAAAGGATTGACCCCTTGCCT	质粒构建
<i>IFNφ4</i>	CATGCCATGGGGTGCCTGGCTCAAACACAGACTTCAGC CCCAAGCTTTTAAACATGAGTGTGGAAGGAG	质粒构建
<i>IL-1β</i>	CCCAAGCTTATGAGAAAGCAGAGGAACCTTAACC CGCGGATCCCTAGTGATGCTGATGGATGCGCACTTTATCCTGC	质粒构建



1. Marker; 2. 穿透液; 3. 洗涤液; 4. 洗脱液 1 (30 mmol/L 咪唑); 5. 洗脱液 2 (60 mmol/L 咪唑); 6. 洗脱液 3 (150 mmol/L 咪唑); 7. 对照组 (转染 pcDNA3.1 载体收集的细胞上清)。
1. Marker; 2. Flow-through fraction; 3. Washing fraction; 4. Elution 1 (30 mmol/Limidazole); 5. Elution 2 (60 mmol/L imidazole); 6. Elution 3 (150 mmol/L imidazole); 7. Control (supernatant of cells transfection with pcDNA3.1 vector).

图 1 HEK293 细胞中表达 IL-1 β 的 Western blot 验证Fig. 1 Western blot validation of IL-1 β

2.2 斑马鱼 *IL-34* 基因在组织和胚胎中的表达分析

对斑马鱼 *IL-34* 基因在成鱼组织中的表达进行了实时荧光定量 PCR 分析。由图 2 可知, *IL-34* 基因在健康斑马鱼各组织中呈组成型表达。其中 *IL-34* 基因在鳃中表达量最高, 其次为肝、肠和脾, 在肾脏中表达量最低。在检测 *IL-34* 基因在斑马鱼受精 10、24、48 和 72 h 胚胎中的表达分析中发现(图 3), *IL-34* 基因在斑马鱼胚胎的各时间点均有表达, 并且 *IL-34* 基因在胚胎中的表达量随着胚胎发育而逐步升高。

2.3 LPS 和 Poly (I:C) 体内刺激实验

用 10 μ L LPS (100 μ g/mL) 和 Poly (I:C) (100 μ g/mL) 分别腹腔注射斑马鱼, 分析注射后 12、24、48 和 72 h 脾和肠中 *IL-34* 的表达情况(图

4 和图 5)。结果显示, LPS 刺激 12 和 24 h 后 *IL-34* 在脾中的表达无明显变化, 在 48 和 72 h 显著上升; LPS 刺激斑马鱼 12、48 和 72 h 后, 肠中 *IL-34* 的表达呈现上调, 在 24 h 出现显著下降。注射 Poly (I:C) 后脾中 *IL-34* 表达在 12 和 24 h 显著减少, 但在 48 和 72 h 有显著增加。与之相比, 肠中 *IL-34* 在注射 Poly (I:C) 后各个时间点均被上调。

2.4 *E. tarda* 感染实验

腹腔注射 *E. tarda* 后的斑马鱼在脾和肠中 *IL-34* 的表达情况如图 6 所示。感染后 6、9 和 72 h, 脾中 *IL-34* 的表达水平显著下降, 在 3 和 24 h 无明显变化。在肠中, 感染后 3、9 和 24 h *IL-34* 表达均显著升高, 在 6 和 72 h 无明显变化。

2.5 SVCV 感染实验

斑马鱼在腹腔注射 SVCV 后, 脾中 *IL-34* 的表达在各个时间点均显著升高, 肠中 *IL-34* 的表达在 1 和 3 d 上调, 在 5 和 7 d 无明显变化, 在 14 d 显著下降(图 7)。

2.6 SVCV 感染 ZF4 实验

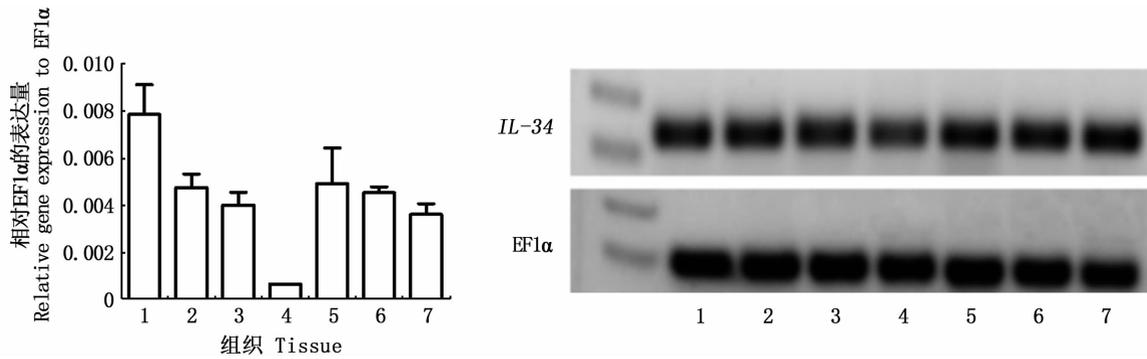
ZF4 细胞为常用的斑马鱼成纤维细胞系, 本研究用 100 μ L 浓度为 1×10^7 TCID₅₀/mL SVCV 感染 ZF4 细胞, 荧光定量检测感染后 *IL-34* 的表达情况(图 8)。结果显示, 感染后 12 和 24 h, ZF4 细胞中 *IL-34* 表达相对于对照组无明显变化, 感染后 48 h, ZF4 细胞中 *IL-34* 表达与对照组相比显著增加。

2.7 LPS 和 Poly (I:C) 感染 ZF4 细胞和脾原代细胞实验

LPS 为革兰氏阴性菌产生的内毒素, Poly (I:C) 为人工合成的类似于病毒基因组的 双链

RNA。LPS 和 Poly (I: C) 能被宿主细胞的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)识别,从而激活天然免疫反应。本研究用 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Poly (I: C) 分别刺激 ZF4 细胞和脾原代细胞,荧光定量检测 *IL-34* 的表达情况。

结果如图 9 所示,与对照组相比,LPS 能诱导 *IL-34* 在 ZF4 细胞和脾原代细胞中的表达, Poly (I: C) 对 ZF4 细胞中 *IL-34* 的表达没有影响,上调脾原代细胞中 *IL-34* 的表达但差异不显著。



1. 鳃; 2. 肠; 3. 脾脏; 4. 肾脏; 5. 肝脏; 6. 皮肤; 7. 肌肉。
1. Gills; 2. Intestine; 3. Spleen; 4. Kidney; 5. Liver; 6. Skin; 7. Muscle.

图 2 斑马鱼 *IL-34* 的组织表达
Fig. 2 Expression of zebrafish *IL-34* in tissues

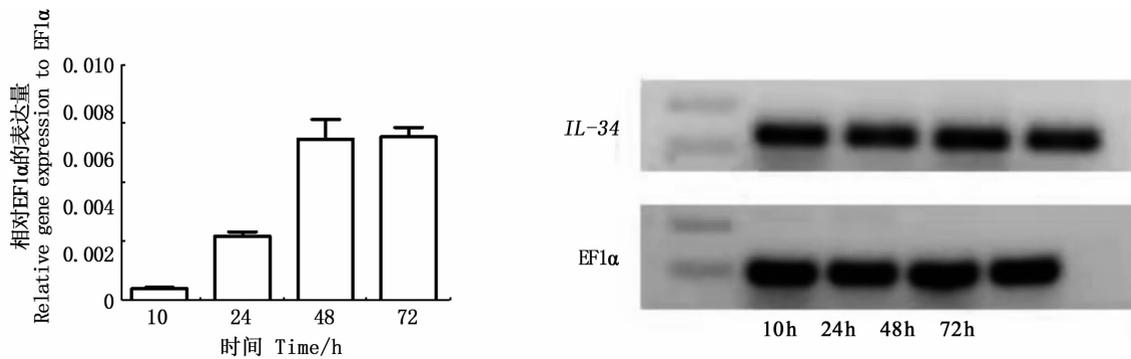
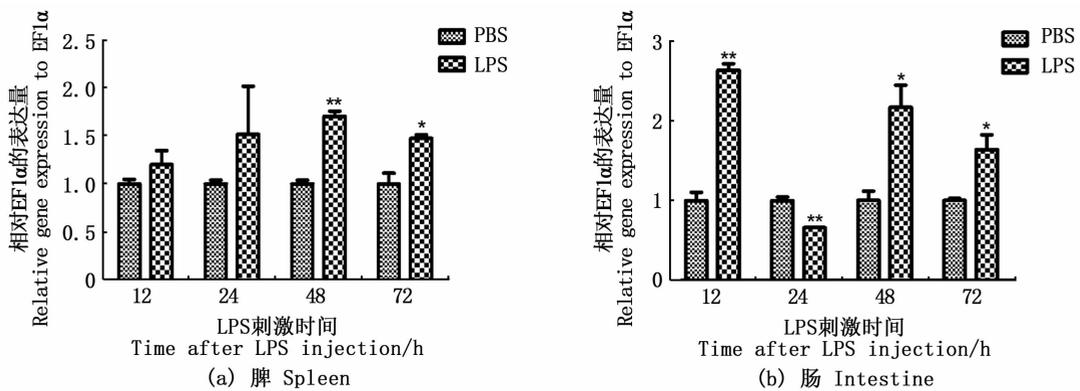
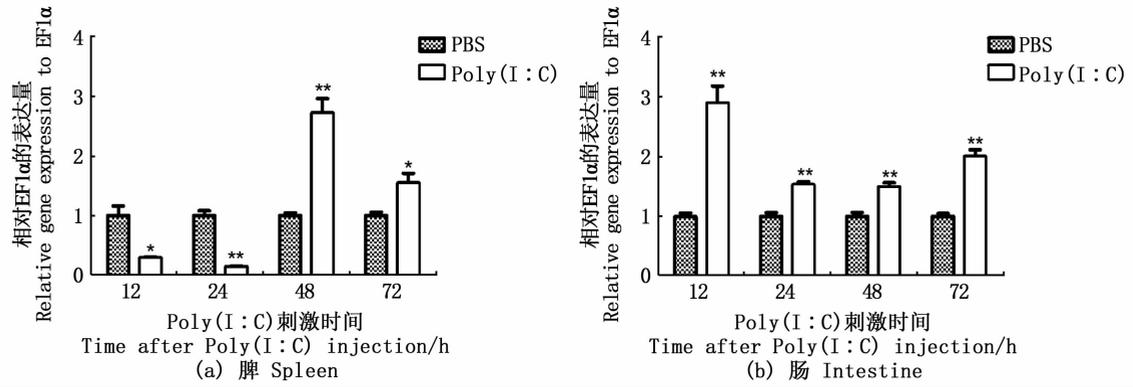


图 3 斑马鱼 *IL-34* 在胚胎发育过程中的表达
Fig. 3 Expression of zebrafish *IL-34* during embryogenesis



*. $P < 0.05$; * *. $P < 0.01$ 。

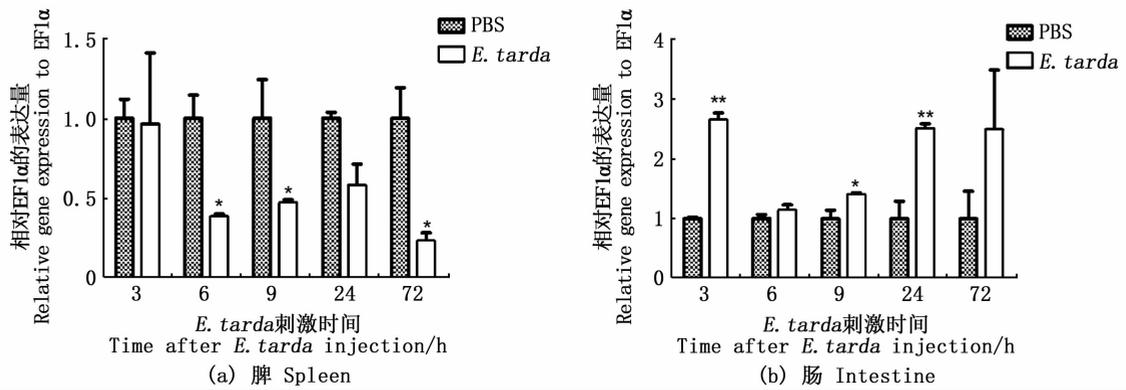
图 4 斑马鱼注射 LPS 后脾和肠中 *IL-34* 基因 mRNA 表达
Fig. 4 mRNA expression of *IL-34* gene in zebrafish spleen and intestine after injection of LPS



*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$.

图5 斑马鱼注射 Poly (I:C) 后脾和肠中 *IL-34* 基因 mRNA 表达

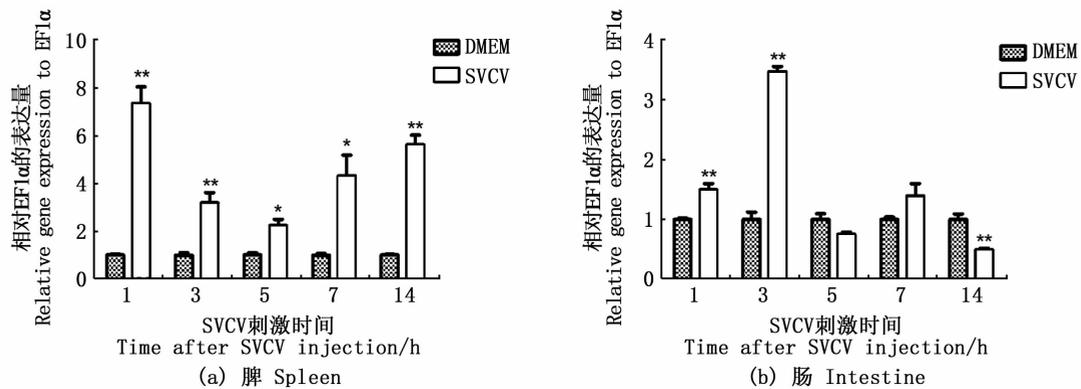
Fig. 5 mRNA expression of *IL-34* in zebrafish spleen and intestine after injection of Poly (I:C)



*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$.

图6 斑马鱼在感染 *E. tarda* 后脾和肠中 *IL-34* 基因 mRNA 表达

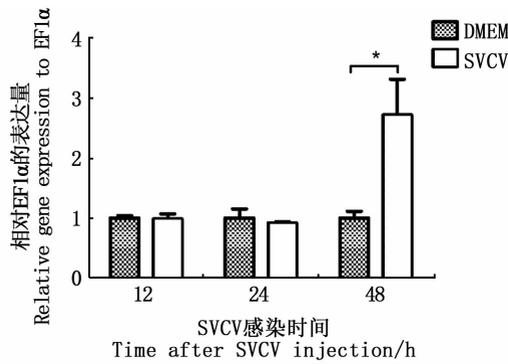
Fig. 6 mRNA expression of *IL-34* in zebrafish spleen and intestine after infection with *E. tarda*



*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$.

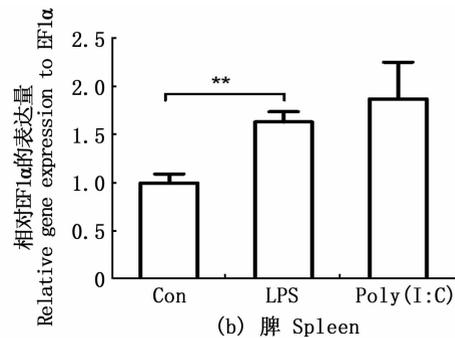
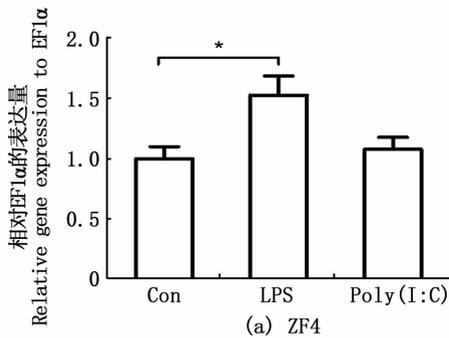
图7 斑马鱼在感染 SVCV 后脾和肠中 *IL-34* mRNA 表达

Fig. 7 mRNA expression of *IL-34* in zebrafish spleen and intestine after infection with SVCV



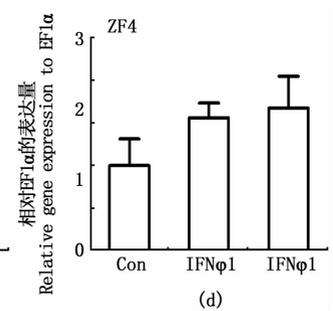
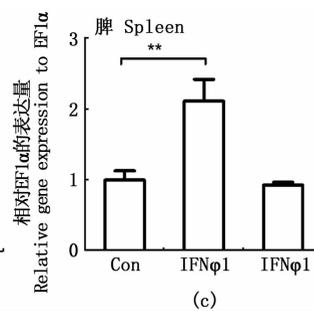
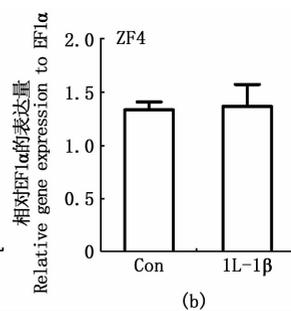
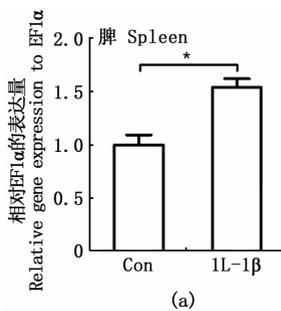
*. $P < 0.05$ 。

图 8 斑马鱼 *IL-34* 基因在 SVCV 感染 ZF4 细胞中的 mRNA 表达
 Fig. 8 mRNA expression of zebrafish *IL-34* in ZF4 cells after infection with SVCV



*. $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$ 。

图 9 LPS 和 Poly (I:C) 刺激 ZF4 细胞和脾原代细胞后 *IL-34* mRNA 表达
 Fig. 9 mRNA expression of zebrafish *IL-34* in ZF4 cells and primary spleen cells after stimulation with LPS or Poly (I:C)



*. $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$ 。

图 10 斑马鱼 *IL-1β*、*IFNφ1* 和 *IFNφ4* 重组蛋白刺激 ZF4 细胞和脾原代细胞后 *IL-34* mRNA 表达
 Fig. 10 mRNA expression of zebrafish *IL-34* in ZF4 cells and primary spleen cells after stimulation with recombinant *IL-1β*, *IFNφ1* or *IFNφ4*

2.8 *IL-1β*、*IFNφ1* 及 *IFNφ4* 刺激 ZF4 细胞和脾原代细胞实验

本研究分析了 ZF4 细胞和脾原代细胞中 *IL-1β* (50 ng/mL)、*IFNφ1* (50 ng/mL) 及 *IFNφ4* (50 ng/mL) 重组蛋白对 *IL-34* 表达的调控,*IL-1β* 重组蛋白对 ZF4 细胞中 *IL-34* 的表达没有影响,但可显著提高在脾原代细胞的表达量。在 *IFNφ1* 和 *IFNφ4* 重组蛋白刺激的 ZF4 细胞和脾原代细胞实验中,*IFNφ1* 上调脾原代细胞 *IL-34* 表达但 *IFNφ4* 没有诱导作用;*IFNφ1* 和 *IFNφ4* 对 ZF4 细胞中 *IL-34* 的表达没有影响。见图 10。

3 讨论

已有研究^[19]表明,鱼类 *IL-34* 基因在不同组

织中的表达存在差异,例如,在虹鳟中 *IL-34* 在不同组织中常量表达且在组织间差异较小;石斑鱼 *IL-34* 在脑、鳃和脾中有较高表达^[20]。本研究对

健康斑马鱼 7 种组织中 *IL-34* 的表达进行了实时荧光定量 PCR 分析。结果显示,斑马鱼 *IL-34* 基因呈常量表达,在鳃中表达量最高,这一结果与虹鳟鱼中的发现十分类似^[19]。鳃含有丰富的 T 细胞^[27],是 T 细胞分化和成熟的主要器官之一,*IL-34* 在鳃中高量表达暗示其在鱼类 T 细胞发育中可能发挥作用。此外,我们发现 *IL-34* 在肝、肠、皮肤和脾中也有较高表达,这说明 *IL-34* 可能与维护鱼类免疫系统稳态相关。

本研究发现斑马鱼在腹腔注射 LPS 和 Poly (I: C) 后,*IL-34* 基因在脾和肠中的表达呈现不同程度的变化。例如,脾在刺激 48 和 72 h 时,*IL-34* 基因的表达显著上调;肠在刺激 12、48 和 72 h 时,*IL-34* 基因表达也明显上升。这些结果跟大黄鱼中的研究基本吻合^[21]。LPS 是典型的细菌病原体相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP)。在哺乳类中, Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 识别 LPS 后,激活细胞内信号通路,诱发炎症基因的表达^[28]。跟哺乳类不同,鱼类 TLR4 跟 LPS 结合力较弱,不参与 LPS 介导的胞内信号通路的激活^[29]。由此推论,鱼类中可能存在识别 LPS 的其他受体。Poly (I: C) 是病毒核酸双链 RNA 类似物,位于脊椎动物细胞内质网中的 TLR3 识别 Poly (I: C), TLR3 结合 Poly (I: C) 后,诱发干扰素调节因子 3/7 (Interferon regulatory factor 3/7, IRF3/7) 磷酸化,招募 IRF9 形成干扰素刺激基因因子 9 (Interferon-stimulated gene factor 9, ISGF9) 复合体,进入细胞核作用于靶基因启动子,诱导基因表达^[30]。在鱼类中,除 TLR3 外, TLR22 亦可识别 Poly (I: C)^[31]。但与 TLR3 不同的是, TLR22 位于细胞膜表面,能够与胞外 Poly (I: C) 结合。因此, Poly (I: C) 可能通过激活 TLR22 介导的信号通路诱导 *IL-34* 的表达,当然,不能排除 Poly (I: C) 通过结合其他细胞表面受体调控 *IL-34* 基因。

IL-34 基因表达受到细菌和病毒的调控。迟缓爱德华氏菌是一种常见、非常重要的肠杆菌科细菌,是感染多种海洋和淡水鱼类的条件致病菌^[32-33]。SVCV 是一种单链 RNA 病毒,可感染鲤科鱼类,引发急性出血症^[32]。本研究用 *E. tarda* 和 SVCV 感染斑马鱼,分析对 *IL-34* 基因在脾和肠中的表达变化。发现 *E. tarda* 感染 3、9 和 24 h 后肠中 *IL-34* 的表达升高,而脾中 *IL-34* 的表达在

感染 6、9 和 72 h 后却受到抑制。研究发现细菌感染感染的石斑鱼脾中 *IL-34* 表达也呈现下调。此外,在感染刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*) 的石斑鱼中,*IL-34* 表达在鳃和头肾中也显著升高。虹鳟鱼受到寄生虫感染时,*IL-34* 的表达在受感染鱼的所有组织中均有适度增加,在受到鳃弧菌感染的大黄鱼中,*IL-34* 的表达量在脾、肝脏和肾脏中均有显著上调。在感染过 SVCV 斑马鱼中,*IL-34* 也同样受到上调,而且体外 SVCV 感染 ZF4 细胞时同样检测到了 *IL-34* 表达量的增加。我们观察到 IFN ϕ 1 能在原代脾细胞中诱导 *IL-34* 表达,说明 *IL-34* 是 IFN ϕ 1 刺激基因 (Ifn stimulated gene, ISG)。这些研究结果表明鱼类 *IL-34* 可能参与抵御细菌和病毒感染过程。

EDA 等^[5]发现促炎细胞因子 (如 IL-1 β , IL-6, IL-17 和 TNF- α) 诱导人成骨细胞中氨基末端激酶 (JNK) 和 p44/42 MAPK 增强 IL-1 β 和 TNF- α 表达。硬骨鱼类炎症性细胞因子 (如 IL-1 β 和 IFN- γ) 能快速诱导 *IL-34* 在 4 种虹鳟细胞系 (RTS-11、RTL、RTG-2 和 RTGill) 和虹鳟原代巨噬细胞的表达^[19]。同样,本研究发现斑马鱼 IL-1 β 上调脾原代细胞中 *IL-34* 基因表达,说明 *IL-34* 参与调控炎症反应,但其机制有待深入研究。

综上所述,我们对斑马鱼 *IL-34* mRNA 分布及表达进行了研究。结果显示,*IL-34* 在健康成鱼组织中呈常量表达,在细菌和病毒感染后表达上调,表明斑马鱼 *IL-34* 参与抵御细菌和病毒感染。*IL-34* 表达能够被细胞因子 IL-1 β 和 IFN ϕ 1 诱导,暗示其在炎症反应中具有调控作用。研究结果为阐释 *IL-34* 在鱼类免疫应答中的功能和作用机制奠定基础。

参考文献:

- [1] FOUCHER E D, BLANCHARD S, PREISSER L, et al. IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. Antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56045.
- [2] CICCIA F, ALESSANDRO R, RODOLICO V, et al. IL-34 is overexpressed in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and is associated with the local expansion of pro-inflammatory CD14 bright CD16⁺ monocytes [J]. Rheumatology, 2013, 52(6): 1009-1017.
- [3] FOUCHER E D, BLANCHARD S, PREISSER L, et al. IL-34 and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1 α [J]. European Journal of

- Immunology, 2015, 45(4): 1092-1102.
- [4] YU Y Q, YANG D, QIU L H, et al. Tumor necrosis factor- α induces interleukin-34 expression through nuclear factor- κ B activation in MC3T3-E1 osteoblastic cells [J]. Molecular Medicine Reports, 2014, 10(3): 1371-1376.
- [5] EDA H, SHIMADA H, BEIDLER D R, et al. Proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , induce expression of interleukin-34 mRNA via JNK- and p44/42 MAPK-NF- κ B pathway but not p38 pathway in osteoblasts [J]. Rheumatology International, 2011, 31(11): 1525-1530.
- [6] BAGHDADI M, ENDO H, TANAKA Y, et al. Interleukin 34, from pathogenesis to clinical applications[J]. Cytokine, 2017, 99: 139-147.
- [7] 汪洋, 邵建国, 卞兆连, 等. 白细胞介素-34 及其在炎症性肠病中的作用[J]. 国际消化病杂志, 2016, 36(5): 264-268.
- WANG Y, SHAO J G, BIAN Z L, et al. Interleukin-34 and its role in inflammatory bowel disease [J]. International Journal of Digestive Diseases, 2016, 36(5): 264-268.
- [8] 李静, 胡艳, 王丽红, 等. 白细胞介素-34 的特点及其在肿瘤疾病中的作用[J]. 安徽医药, 2017, 21(12): 2139-2141.
- LI J, HU Y, WANG L H, et al. Characteristics of interleukin-34 and its role in tumor diseases [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2017, 21(12): 2139-2141.
- [9] CHEMEL M, LE GOFF B, BRION R, et al. Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients [J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2012, 71(1): 150-154.
- [10] WEI S W, NANDI S, CHITU V, et al. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells [J]. Journal of Leukocyte Biology, 2010, 88(3): 495-505.
- [11] EDA H, ZHANG J, KEITH R H, et al. Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood[J]. Cytokine, 2010, 52(3): 215-220.
- [12] LIU H L, LEO C, CHEN X Y, et al. The mechanism of shared but distinct CSF-1R signaling by the non-homologous cytokines IL-34 and CSF-1 [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2012, 1824(7): 938-945.
- [13] CHIHARA T, SUZU S, HASSAN R, et al. IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation [J]. Cell Death & Differentiation, 2010, 17(12): 1917-1927.
- [14] NANDI S, CIOCE M, YEUNG Y G, et al. Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ is a functional receptor for interleukin-34 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(30): 21972-21986.
- [15] SEGALINY A I, BRION R, MORTIER E, et al. Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34 [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2015, 1853(5): 1010-1021.
- [16] GARCEAU V, SMITH J, PATON I R, et al. Pivotal advance: avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products [J]. Journal of Leukocyte Biology, 2010, 87(5): 753-764.
- [17] MA X L, LIN W Y, CHEN Y M, et al. Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R [J]. Structure, 2012, 20(4): 676-687.
- [18] FELIX J, ELEGHEERT J, GUTSCHE I, et al. Human IL-34 and CSF-1 establish structurally similar extracellular assemblies with their common hematopoietic receptor [J]. Structure, 2013, 21(4): 528-539.
- [19] WANG T H, KONO T, MONTE M M, et al. Identification of IL-34 in teleost fish: differential expression of rainbow trout IL-34, MCSF1 and MCSF2, ligands of the MCSF receptor [J]. Molecular Immunology, 2013, 53(4): 398-409.
- [20] MO Z Q, LI Y W, ZHOU L, et al. Grouper (*Epinephelus coioides*) IL-34/MCSF2 and MCSFR1/MCSFR2 were involved in mononuclear phagocytes activation against *Cryptocaryon irritans* infection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 43(1): 142-149.
- [21] WANG L P, JIANG L H, WU C W, et al. Molecular characterization and expression analysis of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) interleukin-12A, 16 and 34 after poly I: C and *Vibrio anguillarum* challenge [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 74: 84-93.
- [22] XUE Y J, JIANG X Y, GAO J D, et al. Functional characterisation of interleukin 34 in grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 92: 91-100.
- [23] YU C, ZHANG P, ZHANG T F, et al. IL-34 regulates the inflammatory response and anti-bacterial immune defense of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 104: 228-236.
- [24] 田佳音, 陈康勇, 张畅, 等. 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 [J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(2): 171-179.
- TIAN J Y, CHEN K Y, ZHANG C, et al. Expression analysis of zebrafish tumor necrosis factor (*tnf α*) and its receptor (*tnfrsf1a*) in response to bacterial and viral infections [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2020, 29(2): 171-179.
- [25] QIN Y T, SUN Z S, WANG W, et al. Characterization of CD3 γ / δ ⁺ cells in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2021, 114: 103791.
- [26] 田佳音. 斑马鱼 I 型干扰素和肿瘤坏死因子 (TNF α) 的表达和功能研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- TIAN J Y. Expression and function of zebrafish type I interferon and tumor necrosis factor (TNF α) [D]. Shanghai:

- Shanghai Ocean University, 2019.
- [27] HAUGARVOLL E, BJERKÅS I, NOWAK B F, et al. Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon[J]. *Journal of Anatomy*, 2008, 213(2): 202-209.
- [28] GUIJARRO-MUÑOZ I, COMPTE M, ÁLVAREZ-CIENFUEGOS A, et al. Lipopolysaccharide activates Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF- κ B signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(4): 2457-2468.
- [29] 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.
- [30] HOLLAND J W, BIRD S, WILLIAMSON B, et al. Molecular characterization of IRF3 and IRF7 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: functional analysis and transcriptional modulation[J]. *Molecular Immunology*, 2008, 46(2): 269-285.
- [31] PALTÍ Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1263-1272.
- [32] PARK S B, AOKI T, JUNG T S. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish[J]. *Veterinary Research*, 2012, 43(1): 67.
- [33] ASHRAF U, LU Y A, LIN L, et al. Spring viraemia of carp virus: recent advances[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(5): 1037-1051.

Transcriptomic response of zebrafish Interleukin-34 to bacterial and viral infection

ZHANG Qin, CHEN Kangyong, TIAN Jiayin, ZOU Jun

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Interleukin-34 (IL-34) is a multifunctional cytokine that plays an important role in innate immunity and inflammation. Quantitative real-time PCR was used to analyze the expression of *IL-34* after bacterial and viral infection. The results showed that *IL-34* was constitutively expressed in the tissues of healthy zebrafish and during embryogenesis. The expression of *IL-34* was up-regulated in the spleen at 48 and 72 h after intraperitoneal (i. p.) injection with lipopolysaccharide (LPS) or Polyinosinic acid-polycytidylic acid [Poly (I:C)]. The expression of *IL-34* was also significantly increased in the intestine (except for the decrease after 24 h LPS stimulation). Infection with *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) resulted in increased expression in the intestine at 3, 9 and 24 h post infection, while it was inhibited in the spleen at 6, 9 and 72 h. The *IL-34* expression was upregulated in the spleen at 1, 3, 5 and 7d and intestine at 1 and 3 d after i. p. injection with spring viremia of carp virus (SVCV). In ZF4 cells SVCV infection and LPS stimulation enhanced the expression of *IL-34*. Besides, LPS, IL-1 β and IFN ϕ 1 induced the expression of *IL-34* in the primary splenic cells. The results suggest that *IL-34* is involved in immune defenses against bacterial and viral infection.

Key words: *Danio rerio*; Interleukin-34; bacteria; virus; cytokine