

水体铜对鲤肠道菌群结构及免疫力的影响

孟晓林¹, 朱振祥¹, 李帅¹, 胡文攀¹, 明红², 聂国兴¹

(1.河南师范大学 水产学院,河南 新乡 453007;

2.新乡医学院 生命科学技术学院;合成生物学医药研究所,河南 新乡 453003)

摘要:为了解水体重金属铜对鲤肠道菌群多样性、结构及免疫力的影响,以不同质量浓度的水体铜胁迫鲤 56 d,对鲤肠道菌群 α 多样性、 β 多样性、基于属水平的群落组成结构及肠道免疫调控因子和紧密连接蛋白的基因表达进行了分析.结果显示,0.14 mg · L⁻¹、0.28 mg · L⁻¹ 处理组与对照组相比, α 多样性指数有显著性下降($P < 0.01$),主成分分析(PCA)显示两处理组与对照组群落组成区分明显,优势菌群发生明显变化;同时,两处理组肠道免疫调控因子 *IL-1 β* 、*IL-8*、*TNF- α* 及信号分子 *NF- κ B* 基因表达有显著增加($P < 0.01$),肠道紧密连接蛋白 *Claudin-3*、*Claudin-c* 及免疫调控因子 *IL-10*、信号分子 *TOR* 基因表达有显著下降($P < 0.01$).结果表明:中、高质量浓度水体铜胁迫显著降低了鲤肠道菌群的多样性,改变了结构组成,对鲤肠道上皮免疫屏障造成了损伤.

关键词:铜;肠道微生物;免疫;鲤

中图分类号:Q939.96

文献标志码:A

鱼类肠道内定植着数量庞大的微生物菌群,它们影响着宿主的生长与健康,与宿主共同组成了“Supraorganism”,其结构组成及活性的变化与环境因子、宿主协同发展,并与宿主基因组、营养、代谢和生活方式等形成了复杂的互作关系^[1],在维持肠道健康、促进肠道发育、抵抗病原入侵、调节机体能量吸收和脂肪代谢过程中起到了关键作用^[2-4].鱼类作为水生动物的重要组成部分,其肠道微生物除受到种类、遗传背景、生长发育和性别等因素影响外,与鱼体生活的水体环境亦密切相关,与陆生脊椎动物相比,更易受到食物供给、环境变化(如温度、盐度、金属离子)等的影响^[5-6].

在众多重金属污染环境因子中,铜作为矿物营养素、除藻剂或病原抑制药物被广泛应用于水产养殖领域^[7-9],当其以自由金属离子形式达到一定质量浓度时就会对水产养殖动物的发育、生长、繁殖、免疫功能及营养代谢造成影响^[10-11].但目前关于水体铜对水产动物肠道微生态的影响还不很清楚.本实验通过将鲤暴露于不同质量浓度的水体铜中,利用高通量测序及分子生物学技术进行分析,初步阐明了铜对鲤肠道菌群及免疫相关基因表达的影响,为更好的研究水体铜的毒副作用机制提供了一定参考.

1 材料与方法

1.1 实验动物及养殖条件

实验用鲤购自河南师范大学水产养殖基地,选取 360 尾规格整齐,体质健壮,初始体重为(10.10±0.01) g(mean±SD, $n=30$)的鲤,随机分配到 12 个养殖箱(养殖水体体积恒定为 60 L)中,养殖用水为地下水,Cu²⁺ 含量为 0.10 μ g · L⁻¹,水温(25±1) °C,pH 7.0~8.0,氨氮质量浓度<0.01 mg · L⁻¹,DO 质量浓度>5 mg · L⁻¹.暂养期间投喂商品鲤鱼饲料(购自河南康达尔农牧有限公司),暂养时间为 14 d.

收稿日期:2017-08-12;修回日期:2018-03-20.

基金项目:河南省科技计划项目(182102110007);河南师范大学博士启动项目(qd13057);有害生物控制与资源利用国家重点实验室开放课题(SKLB15KF03);河南省创新型科技团队(CXTD2016043).

作者简介:孟晓林(1981—),男,山西榆社人,河南师范大学副教授,博士,研究方向为水产动物营养与饲料,E-mail:xuzhu288482@163.com.

通信作者:聂国兴,河南师范大学教授,博士,主要从事水产动物营养与饲料研究,E-mail:niegx@htu.cn.

1.2 半致死质量浓度(LC50)测定^[12]

用无水硫酸铜配制 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 母液,根据预实验 0%与 100%鲤致死质量浓度范围,按照等比数列设计不同的质量浓度组,分别记录每组鲤在 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、24 h、36 h、72 h、84 h、96 h 的死亡率.根据各时间点的死亡率,利用 Bliss-Finney 法^[12] 计算得出 96 h 半致死质量浓度 $\text{LC}_{50} = 1.42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.3 实验设计

实验共分 4 组,包括对照组($0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 0% · 96 h LC_{50})、低质量浓度处理组($0.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 5% · 96 h LC_{50})、中质量浓度处理组($0.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 10% · 96 h LC_{50})、高质量浓度处理组($0.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 20% · 96 h LC_{50}),每个处理设 3 个平行,每平行 30 尾鱼.每天饲喂 3 次(9:00、13:00 和 17:00),投饲率按照体质量 3% 进行投喂,每日换水,同时保持各处理组水体中 Cu^{2+} 的质量浓度恒定,饲喂周期 56 d.

1.4 肠道微生物群落结构分析

养殖结束后采集样品,取样前禁食 24 h,以 MS-222($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)麻醉,每箱随机取 3 尾鱼,无菌条件下取中肠,纵向剪开肠道,刮取肠道内容物,于 -80°C 冻存备用.采用 TIANamp Genomic DNA Kit 试剂盒(购自天根生化科技有限公司)提取肠道总 DNA,送公司进行 Illumina HiseqTM 2500 高通量测序.基于有效数据进行 OTU(Operational Taxonomic Units)聚类和物种注释,根据结果进行丰度、 α 多样性、 β 多样性和 PCA 等分析.

1.5 Real-time PCR 检测肠道免疫相关基因 mRNA 表达

取肠道组织,总 RNA 提取依据 RNA iso 试剂盒进行(Takara,大连),利用 NanoDrop 2000 和 1%的琼脂糖凝胶电泳对 RNA 分别进行质量浓度与质量检测,检测合格后使用 Prime-ScriptTM RT reagent Kit 试剂盒(Takara,大连)对 RNA 立即进行反转录,以 β -actin 作为内参基因,采用 RT-PCR 方法,测定鲤肠道中白细胞介素 1β (interleukin 1β , $IL-1\beta$)、白细胞介素 10(interleukin 10, $IL-10$)、白细胞介素 8(interleukin 8, $IL-8$)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , $TNF-\alpha$),细胞内核因子 κB (intracellular nuclear factor κB , $NF-\kappa\text{B}$)、雷帕霉素受体(TOR)及肠道紧密连接蛋白 $Claudin-3$, $Clauding-c$ 的 mRNA 表达水平,引物序列及相关信息见表 1.每个样品设 3 个重复,荧光定量 PCR 体系为 $10 \mu\text{L}$,40 个循环,反应结束后对扩增产物进行溶解曲线分析,以确保特异性扩增,结果依据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算分析.

表 1 本研究荧光定量 PCR 引物

引物 primer	序列(5'-3')sequence(5'-3')	退火温度/ $^\circ\text{C}$
IL-1 β F	5'-AGAGTTTGGTGAAGAAGAGG-3'	57.1
IL-1 β R	5'-TTATTGTGGTTACGCTGGA-3'	
IL-10 F	5'-AATCCCTTTGATTTTGCC-3'	61.4
IL-10 R	5'-GTGCCTTATCCTACAGTATGTG-3'	
IL-8 F	5'-ATGAGTCTTAGAGGTCTGGGT-3'	60.3
IL-8 R	5'-ACAGTGAGGGCTAGGAGGG-3'	
TNF- α F	5'-CGCTGCTGTCTGCTTCAC-3'	58.4
TNF- α R	5'-CCTGGTCCTGGTTCAC-3'	
NF- κB p65 F	5'-GAAGAAGGATGTGGGAGATG-3'	62.3
NF- κB p65 R	5'-TGTTGTCGTAGATGGGCTGAG-3'	
TOR F	5'-TCCCACTTCCACCAACT-3'	61.4
TOR R	5'-ACACCTCCACCTTCTCCA-3'	
Claudin 3 F	5'-GAGGGAATCTGGATGAGC-3'	57.0
Claudin 3 R	5'-ATGGCAATGATGGTGAGA-3'	
Claudin c F	5'-GAGGGAATCTGGATGAGC-3'	59.4
Claudin c R	5'-CTGTTATGAAAGCGGCAC-3'	
β -actin F	5'-GGCTGTGCTGCCCTGTA-3'	61.4
β -actin R	5'-GGCATAACCCTCGTAGAT-3'	

1.6 数据统计

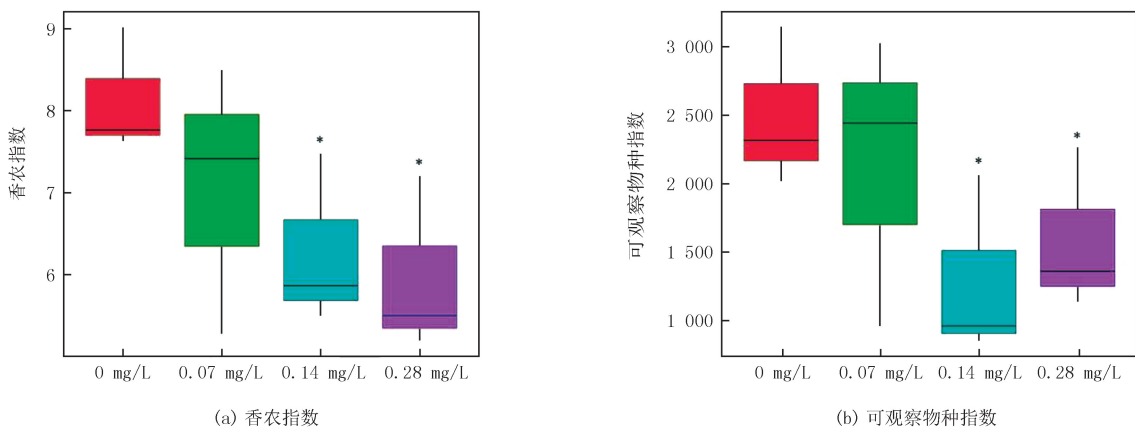
所有实验数据均以均值±标准误(Mean±SD)表示,数据采用 SPSS 16.0 软件,以 One-way ANOVA 及 Duncan 法进行多重比较统计分析及显著性检验,若 $P < 0.05$,表示差异显著, $P < 0.01$,表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 铜胁迫对鲤肠道菌群多样性影响分析

2.1.1 铜胁迫对鲤肠道菌群 Alpha 多样性影响

由图 1 显示,0.14 mg·L⁻¹处理组、0.28 mg·L⁻¹处理组与对照组相比香农指数(图 1a)、可观察物种指数(图 1b)有显著下降($P < 0.05$),0.07 mg·L⁻¹处理组与对照组相比无显著性差异($P > 0.05$)。



注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 铜胁迫对鲤肠道菌群多样性分析

2.1.2 铜胁迫对鲤肠道菌群主成分分析(PCA)

进一步以主成分分析(PCA)来评估不同质量浓度水体铜对鲤肠道菌群整体结构 β 多样性的影响,以两个权重最高的主成分 PC1 (23.51%)、PC2 (13.27%)作图,样本发生较明显的区分(图 2),每组样本均聚成各自独立的区域,中高质量浓度处理组肠道群落组成与对照组明显分开,低质量浓度处理组与对照组组成区分不显著。

2.2 铜胁迫对鲤肠道优势菌群结构影响分析

表 2 显示了不同质量浓度水体铜胁迫鲤 56 d 后,肠道菌群在属水平下前 10 位的变化。由表可以看出,与对照组相比,低质量浓度处理组鲤肠道优势菌群为鲸杆菌属(*Cetobacterium*) ($P < 0.05$),中质量浓度处理组的优势菌群为鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、*Luteolibacter* 属、*Shinella* 属、黄杆菌属(*Flavobacterium*) ($P < 0.05$),高质量浓度处理组除以上菌属外,纤维弧菌属(*Cellvibrio*)、副球菌属(*Paracoccus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、*Candidatus Xiphinematobacter* 属也有显著性差异($P < 0.05$)。中、高质量浓度处理组盐单胞菌属(*Halomonas*)显著低于对

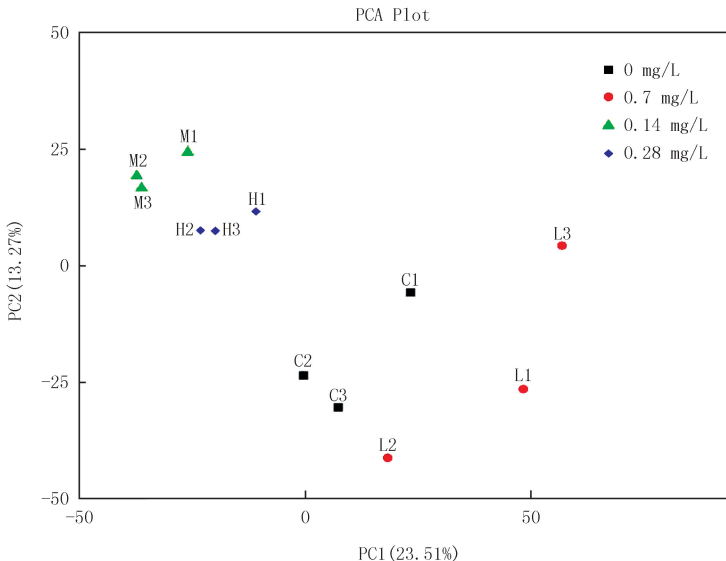


图 2 PCA 分析铜胁迫对鲤肠道菌群 β 多样性的影响

对照组($P < 0.05$).

表 2 水体铜胁迫对鲤肠道菌群优势属结构的影响

属 Genus	相对丰度比例/%			
	对照组 control	0.07 mg · L ⁻¹ 组	0.14 mg · L ⁻¹ 组	0.28 mg · L ⁻¹ 组
鲸杆菌属 <i>Cetobacterium</i>	1.33 ± 0.28c	23.68 ± 10.81a	5.74 ± 0.46b	14.51 ± 3.38b
盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	13.59 ± 5.62a	8.84 ± 2.58a	1.63 ± 0.56b	2.30 ± 0.89b
纤维弧菌属 <i>Cellvibrio</i>	0.85 ± 0.09b	1.52 ± 0.13b	0.66 ± 0.14b	8.17 ± 1.20a
<i>Luteolibacter</i>	0.11 ± 0.02b	0.07 ± 0.03b	4.70 ± 2.65a	3.87 ± 0.78a
副球菌属 <i>Paracoccus</i>	1.01 ± 0.05b	0.46 ± 0.15b	0.72 ± 0.02b	6.95 ± 0.76a
<i>Shinella</i>	0.36 ± 0.03c	0.23 ± 0.10c	2.73 ± 0.22b	6.49 ± 0.65a
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	1.19 ± 0.21b	1.03 ± 0.34b	0.52 ± 0.04b	6.11 ± 0.51a
希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>	5.46 ± 1.20	3.41 ± 0.65	2.25 ± 1.82	3.36 ± 0.18
<i>Candidatus Xiphinematobacter</i>	0.12 ± 0.01b	0.10 ± 0.01b	0.10 ± 0.04b	3.89 ± 0.84a
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	0.07 ± 0.01b	0.51 ± 0.21b	1.22 ± 0.65a	0.14 ± 0.06b
其它 others	75.88 ± 4.34a	60.10 ± 9.20ab	75.03 ± 3.66a	44.19 ± 6.57b

注:同行不同字母表示差异显著($P < 0.05$).

2.3 铜胁迫对鲤肠道免疫调控因子及相关信号分子 mRNA 表达水平的影响

与对照组相比,0.14 mg · L⁻¹处理组、0.28 mg · L⁻¹处理组 *IL-1 β* , *IL-8*, *TNF- α* , *NF- κ B* 基因表达有显著增加($P < 0.01$), *TOR*, *IL-10* 基因表达有显著下降($P < 0.01$).但 0.07 mg · L⁻¹处理组各免疫基因表达与对照组相比均无显著性差异($P > 0.05$)(图 3).

2.4 铜胁迫对鲤肠道紧密连接蛋白基因表达的影响

如图 4,0.07 mg · L⁻¹、0.14 mg · L⁻¹、0.28 mg · L⁻¹处理组与对照组相比,*Claudin-3* 基因表达均有极显著下降($P < 0.01$),*Claudin-c* 基因表达除 0.28 mg · L⁻¹处理组与对照组相比有显著性差异外,其余各组无显著性差异.

3 讨论

3.1 水体铜胁迫对鲤肠道菌群的影响

肠道菌群作为机体的“第二器官”近年来已受到广泛关注,其丰度及结构组成的改变将影响到机体的营养代谢和免疫机能.本研究结果显示,在中、高质量浓度水体铜离子胁迫条件下,鲤肠道菌群多样性指数(shannon 指数、observed speices 指数)与对照组相比均出现了显著性下降.PCA 结果同样显示,中、高质量浓度处理组肠道菌群与对照组存在显著性差异.这些结果表明,在较高质量浓度的水体铜处理条件下,鲤肠道菌群的多样性明显降低.涂宗财等以重金属铜对异育银鲫进行胁迫,发现肠道微生物多样性显著降低^[13]. Song 等以不同形式的铜离子对异育银鲫进行胁迫后,其肠道好氧菌多样性显著性降低,这与本研究结果一致,但鳃和皮肤组织表面无显著性变化^[14].分析原因,可能与铜在胃肠道的抗微生物作用有关.铜离子可以通过静电吸附作用与细胞浆膜蛋白结合,进而通过细胞膜通道的开闭进入细胞,同时与分子氧作用产生过氧化氢自由基,从而致毒.高剂量的铜可破坏细菌的细胞壁,抑制细菌呼吸代谢,进而抑制肠道微生物的生长.

在对肠道菌群结构影响方面,本研究发现不同质量浓度的水体铜胁迫对鲤肠道菌群在属水平上均有不同程度的影响,其中高质量浓度影响最为显著,鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、纤维弧菌属(*Cellvibrio*)、副球菌属(*Paracoccus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)等致病菌属与对照组相比均有显著增加.李东亮在对草鱼的研究中发现,随着草鱼肾致病菌感染量的增加,鲸杆菌属(*Cetobacterium*)的丰度显著升高 20%.涂宗财等研究表明,水体铜胁迫异育银鲫后,肠道中气单胞菌属(*Aeromonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、爱德华菌属(*Edwardsiella*)的数量均明显上升^[13].在对环境诱因引起的死亡仿刺参肠道菌群进行分析,发现副球菌属(*Paracoccus*)、弧菌属(*Vibrio*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)为优势菌群^[15].以纳米铜或纳米银

对斑马鱼进行胁迫,其肠道微生物群落结构发生了明显变化,特别是益生菌类群被显著抑制^[16].这些研究结果均与本研究结果一致,说明在水体铜胁迫这种外界环境因子的作用下,鲤机体健康状况发生了变化,肠道菌群结构出现明显改变,致病菌数量上升而有益菌数量下降,肠道内环境生物屏障被破坏,其抵抗外界病原菌入侵的能力也随着铜离子质量浓度的上升而逐渐减弱,但也有研究显示,饲料中添加一定剂量的铜,对断奶仔猪肠道中的条件致病菌(大肠杆菌、沙门氏菌)及益生菌(双歧杆菌、乳酸杆菌)数量均无显著影响^[17],这可能与铜胁迫的形式及吸收途径有关.关于铜对细菌生长的抑制作用是否具有选择性,有待进一步研究.

3.2 水体铜胁迫对鲤肠道免疫调控因子、通路及紧密连接蛋白的影响

肠上皮是机体吸收外源性营养物质和抵抗病原菌入侵的一道关键屏障,其中由各种免疫调控因子及其相关通路构成的肠免疫屏障极为重要.Wang 等以 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 铜对草鱼幼鱼进行胁迫,结果显示鳃组织 $IL-1\beta$, $IL-8$, $TNF-\alpha$ 等促炎因子及 $NF-\kappa B$ 调控通路信号分子的 mRNA 表达水平增加,Zhang 等^[18]以氯化汞对斑马鱼胚胎进行胁迫,同样发现可诱导 $IL-1\beta$, $IL-8$, $TNF-\alpha$ 等促炎因子表达量增加,而 *Occludin*, *ZO-1*, *Claudin-b*, *Claudin-3*, *Claudin-12* 等紧密连接蛋白及 *TOR*, *IL-10* 的 mRNA 表达水平下降^[19],这与本研究在肠道的研究结果保持一致. $IL-1\beta$, $IL-8$, $TNF-\alpha$ 等促炎反应因子可由巨噬细胞、单核细胞或者成纤维细胞等产生,对炎症发生过程中刺激免疫细胞介导免疫应答作用非常重要,在铜长期

暴露下,其表达量的升高意味着促发了肠道上皮的机体免疫防御.肠上皮细胞紧密连接是肠黏膜屏障的重要组成部分,其中肠道紧密连接蛋白在维持肠上皮屏障完整性方面起到非常重要的作用,一旦受损,肠上皮细胞间通透性就会增加,细菌、内毒素和大分子物质就可以通过屏障进入体循环.同时,紧密连接蛋白的表达与炎症因子及其调控信号通路紧密关联.有研究证实,细胞因子 $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ 水平的升高可下调 *ZO-1* 等的表达,导致肠黏膜屏障功能障碍^[20].本研究中,随着水体铜胁迫质量浓度的增加,维持肠上皮完整性的紧密连接蛋白 mRNA 表达水平出现了显著下降,表明鲤肠上皮黏膜屏障在高铜的暴露下受到了损伤,肠道抵御外来病原菌入侵的能力降低,鲤的免疫功能受到了破坏,导致炎症发生.

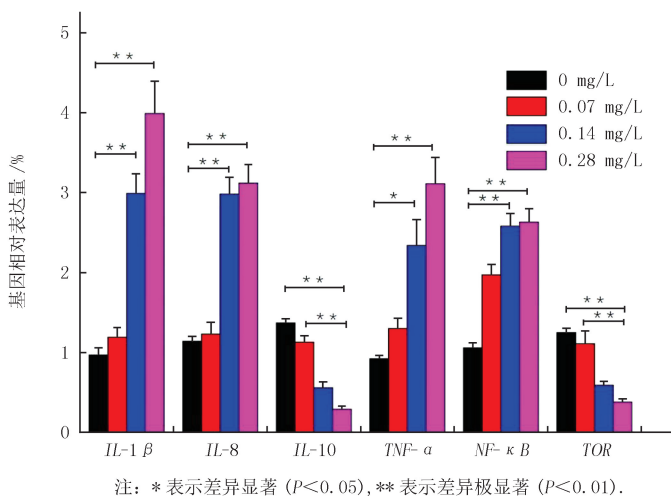
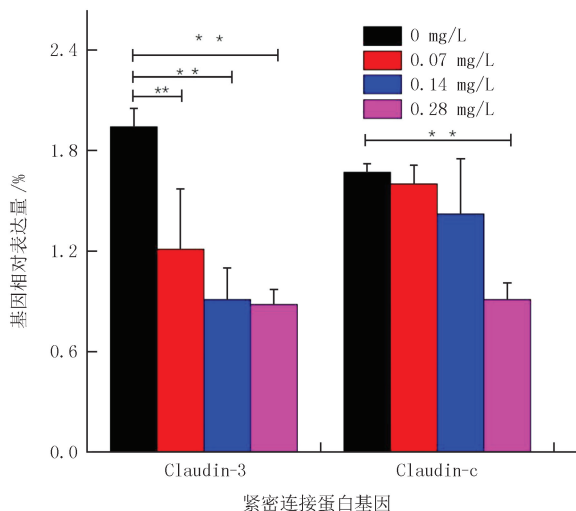


图3 铜胁迫对鲤肠道免疫调控因子及相关信号分子 mRNA 表达水平的影响



注: **表示差异极显著 ($P < 0.01$).

图4 铜胁迫对鲤肠道紧密连接蛋白基因表达的影响

参 考 文 献

- Nicholson J K, Elaine H, James K, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions[J]. Science, 2012, 336: 1262-1267.
- Elaidy S, Derrien M, Merrifield C A, et al. Gut bacteria - host metabolic interplay during conventionalisation of the mouse germfree colon[J]. The ISME journal, 2012, 7: 743-55.
- 高权新, 吴天星, 王进波. 肠道微生物与寄主的共生关系研究进展[J]. 动物营养学报, 2010, 22(3): 519-526.

- [4] Bondia-Pons I, Hyötyläinen T, Orešić M. Role of microbiota in regulating host lipid metabolism and disease risk[M]. Springer London: Metabonomics and Gut Microbiota in Nutrition and Disease, 2015: 235-260.
- [5] Ingerslev H C, Jørgensen L V, Strube M L, et al. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type[J]. Aquaculture, 2014, 424: 24-34.
- [6] Wong S D, Rawls J F. Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(13): 3100-3102.
- [7] Meng X, Tian X, Liu M, et al. The transcriptomic response to copper exposure by the gill tissue of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) using deep-sequencing technology[J]. Fish & shellfish immunology, 2014, 38(2): 287-293.
- [8] Liu X, Luo Z, Xiong B, et al. Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2010, 73(6): 1286-1291.
- [9] Meng X, Tian X, Nie G X, et al. The transcriptomic response to copper exposure in digestive gland of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) [J]. Fish & shellfish immunology, 2015, 46(2): 161-167.
- [10] Chen Q L, Luo Z, Liu X, et al. Effects of waterborne chronic copper exposure on hepatic lipid metabolism and metal-element composition in *Synechogobius hasta* [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2013, 64(2): 301-315.
- [11] Geret F, Serafim A, Bebianno M J. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? [J]. Ecotoxicology, 2003, 12(5): 417-426.
- [12] Rosiello A P, Essigmann J M, Wogan G N. Rapid and accurate determination of the median lethal dose (LD50) and its error with a small compute[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues, 1977, 3(5/6): 797-809.
- [13] 涂宗财, 庞娟娟, 王辉, 张露, 沙小梅. 水环境中重金属铜对异育银鲫肠道微生物的影响[J]. 水生生物学报, 2017, 57(7): 1060-1068.
- [14] Song G K, Han X, Wei D, Xu Z. Influence of Cu²⁺-loaded silicate on the growth performance and microflora of crucian carp *Carassius auratus* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2009, 85: 239-243.
- [15] 任利华, 姜芳, 张秀珍, 等. 环境诱因引起大面积死亡背景下底播增殖仿刺参生物体优势菌分析[J]. 水产科学, 2015, 34(12): 762-767.
- [16] Merrifield D L, Shaw B J, Harper G M, et al. Ingestion of metal-nanoparticle contaminated food disrupts endogenous microbiota in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environmental Pollution, 2013, 174: 157-163.
- [17] 郭彤, 吴艳, 李晓晨, 等. Cu²⁺/ZnO-蒙脱石对断奶仔猪生长性能、肠道菌群、黏膜二糖酶活性及肠黏膜形态的影响[J]. 营养饲料, 2016, 52(17): 48-53.
- [18] Wang B, Feng L, Jiang W, et al. Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF-κB, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: Preventive role of arginine[J]. Aquatic toxicology, 2015, 158: 125-137.
- [19] Zhang Q, Li Y, Liu Z, et al. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae [J]. Aquatic toxicology, 2016, 181: 76-85.
- [20] 何新颖, 唐志鹏, 马贵同, 等. 靛玉红对DSS诱导结肠炎小鼠紧密连接蛋白ZO1表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2010, 4(4): 7-10.

Effect of waterborn copper on the intestinal microbiota and immunity of common carp (*Cyprinus carpio* L)

Meng Xiaolin¹, Zhu Zhengxiang¹, Li Shuai¹, Hu Wenpan¹, Ming hong², Nie Guoxing¹

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xixiang 453007, China;

2. Synthetic Biology Medicine Institute; College of Life Sciences and Technology, Xixiang Medical University, Xixiang 453003, China)

Abstract: In order to clarify the effect of waterborn copper on the intestinal microbiota and immunity of common carp, diversity indexes analysis and abundance changes of the microbiota based on genus level were carried out. Also, mRNA expression level analysis about the immunity factors and tight junction protein in the gut were done. The result showed that the Shannon index and observed species were significantly decreased in 0.14 mg · L⁻¹, 0.28 mg · L⁻¹ treatment group. The composition of the microbiota in these two groups were also observed obviously different with the control or 0.07 mg · L⁻¹ treatment group according to PCA analysis. Moreover, the major abundance of the microflora at the genus level were changed in the two treatments following Cu exposure. The mRNA expression level about the proinflammatory cytokines (Ilr-1β, IL-8, TNF-α) and signal molecular of regulation pathway (NF-κB) were detected significantly up-regulated in 0.14 mg · L⁻¹, 0.28 mg · L⁻¹ treatment group. However, tight connection protein (Claudin-3, Claudin-c) and anti-inflammatory cytokines (IL-10), signal molecular (TOR) were found down-regulated conversely. In conclusion, waterborne copper exposure significantly decreased the microflora diversity and changed the community structure of the intestinal microbiota of common carp, accompanied with severely immunity damage.

Keywords: copper; gut microbiota; immunity; common carp

[责任编辑 王凤产]