

DOI: 10.3969/j.issn.2096-8248.2024.02.002

鳃弧菌感染单环刺螠体腔细胞转录组分析*

王思婕¹, 许星鸿¹, 涂丁颖¹, 刘顺¹, 李百玉¹, 朱龙¹, 万文杰²

(1. 江苏海洋大学 海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222005; 2. 连云港杰浩水产有限公司, 江苏 连云港 222000)

摘要:鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是水产养殖中常见病原菌之一。为探究鳃弧菌感染海洋经济动物单环刺螠(*Urechis unicinctus*)后宿主基因表达水平的变化和应答细菌感染的分子机制,运用高通量测序技术对感染鳃弧菌的单环刺螠对照组、易感组和抗感组体腔细胞进行了转录组测序,并对比分析其差异表达基因(DEGs)及信号通路。结果显示,鳃弧菌感染单环刺螠后,易感组体腔细胞差异表达基因数目为2309个,其中1451个基因表达上调,858个基因表达下调;抗感组中DEGs数目为1955个,其中1311个基因表达上调,644个基因表达下调。KEGG通路富集分析显示,与免疫相关的通路主要有MAPK信号通路、过氧化物酶体、内吞作用、溶酶体、氨基酸生物合成等,筛选出的潜在抗感基因主要有牛磺酸分解代谢双加氧酶(Taurine catabolism dioxygenase, *TauD*)、细胞色素P450(Cytochrome P450, *CYP450*)、Casitas B细胞淋巴瘤B(Casitas B lymphoma-b, *Cbl-b*)、肌动蛋白相关蛋白3(Actin-related protein 3, *ACTR3*)、热休克蛋白70(Heat shock protein 70, *HSP70*)、氨基酸通透酶(Amino acid permease, *AAPs*)、编码葡萄糖激酶(Glucokinase, *GCK*)、乙醛酸和羟基丙酮酸还原酶(Glyoxylate reductase/hydroxy pyruvate reductase, *GRHPR*)、胱硫醚β-合酶(Cystathionine beta-synthase, *CBS*)、组氨酸磷酸酶(Histidine phosphatase, *LHPP*)、谷草酰乙酸转氨酶2(Glutamic-oxaloacetic transaminase 2, *GOT2*)、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, *LDH*)和细胞分裂周期42(Cell division control protein 42, *CDC42*)。易感基因主要有ADP核糖激化因子(ADP-ribosylation factor, *ARF*)、细胞粘附素(Cytohesin, *CYTH*)、EH结构域蛋白1(EH domain-containing protein 1, *EHD1*)、Ras相关蛋白Rab-8A(Ras-related protein Rab-8A, *Rab8A*)、钙网蛋白(Calreticulin, *CALR*)和Ras相关的C3肉毒素底物1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, *RAC1*)。实验结果可为鳃弧菌对水产养殖动物的感染机制及单环刺螠对病原菌的免疫应答研究提供数据参考。

关键词:鳃弧菌;单环刺螠;转录组;免疫应答

中图分类号: S947.9

文献标志码: A

文章编号: 2096-8248(2024)02-0005-12

引用格式: 王思婕, 许星鸿, 涂丁颖, 等. 鳃弧菌感染单环刺螠体腔细胞转录组分析[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2024, 33(2): 5-16.

Transcriptomic Analysis of the Coelomocytes of *Urechis unicinctus* Infected with *Vibrio anguillarum*

WANG Sijie¹, XU Xinghong¹, TU Dingying¹, LIU Shun¹, LI Baiyu¹, ZHU Long¹, WAN Wenjie²

(1. School of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Lianyungang Jiehao Aquatic Products Co., Ltd., Lianyungang 222000, China)

Abstract: *Vibrio anguillarum* is one of the common pathogenic bacteria in aquaculture. In order

* 收稿日期: 2023-11-04; 修订日期: 2023-12-20

基金项目: 江苏省科技厅苏北科技专项(SZ-LYG202124, LYG-SZ201814); 连云港市花果山英才计划(KK20100); 连云港市科技局现代农业项目(CN1411); 江苏海洋大学研究生科研与实践创新计划项目(KYCX2023-137)

作者简介: 王思婕(2000—), 女, 江苏连云港人, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物种质资源, (E-mail)2511575447@qq.com。

通信作者: 许星鸿(1970—), 女, 江苏泰兴人, 教授, 博士, 研究方向为海洋生物资源与环境, (E-mail)xhxu119@163.com。

to investigate the changes of host gene expression level and the molecular mechanism of response to bacterial infection after *V. anguillarum* infected marine economic animal *Urechis unicinctus*, the high-throughput sequencing technology was adopted to sequence the transcriptomes of coelomocytes of different groups of *U. unicinctus* after infected with *V. anguillarum*, including control group, susceptibility group and disease-resistance group, and then the differently expressed genes (DEGs) and signal channels were comparative analyzed in this study. The results showed that the number of DEGs in the susceptible group was 2 309, including 1 451 up-regulated genes and 858 down-regulated genes, and the number of DEGs in the disease-resistance group was 1 955, including 1 311 up-regulated genes and 644 down-regulated genes, compared with the control group. The KEGG pathway enrichment analysis showed that the immune-related pathways mainly included MAPK signaling pathway, peroxisome, endocytosis, lysosome and amino acid biosynthesis, and the potential resistance genes mainly included Taurine catabolism dioxygenase (*TauD*), Cytochrome P450 (*CYP450*), Casitas B lymphoma-b (*Cbl-b*), Actin-related protein 3 (*ACTR3*), Heatshock protein 70 (*HSP70*), Amino acid permease (*AAPs*), Glucokinase (*GCK*), Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase (*GRHPR*), Cystathionine beta-synthase (*CBS*), Histidine phosphatase (*LHPP*), Glutamic-oxaloacetic transaminase 2 (*GOT2*), Lactate dehydrogenase (*LDH*), Cell division control protein 42 (*CDC42*), while the susceptibility genes mainly included ADP-ribosylation factor (*ARF*), Cytohesin (*CYTH*), EH domain-containing protein 1 (*EHD1*), Ras-related protein Rab-8A (*Rab8A*), Calreticulin (*CALR*) and Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (*RAC1*). This study may provide data referenced for further exploring the mechanism of infection against aquaculture animals by *V. anguillarum* and the immune response of *U. unicinctus* to pathogenic bacteria.

Key words: *Vibrio anguillarum*; *Urechis unicinctus*; transcriptome; immune response

弧菌为海水养殖中水产动物的主要致病菌,其中鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是第一个被鉴定的鱼类病原菌,在咸水和半咸水中广泛存在^[1-2]。鳃弧菌具有较高的致病性,可通过体表、呼吸、消化等多种途径感染水生生物,症状表现多为体表出血,发病高峰期通常在夏秋两季^[3]。

单环刺螠(*Urechis unicinctus*)属于螠虫动物门(Echiura)刺螠属(*Urechis*),为我国黄、渤海常见的底栖动物^[4]。单环刺螠营养丰富,并具有一定的药用价值,在海洋动物资源开发利用方面具有较大价值^[5]。由于过度捕捞和海洋环境污染,单环刺螠自然资源量持续下降,亟待开展人工增养殖以满足市场需求^[6]。然而在养殖过程中,病害的发生造成了产量下降和经济损失。目前关于单环刺螠的研究多集中于硫化物代谢^[7]、环境胁迫^[8]和养殖^[9]等方面,对单环刺螠病害研究鲜有报道。

高通量测序技术可以获得一定条件下机体组织或细胞的转录本信息,是目前研究机体免疫防御关键基因及表达调控机制的有效方法^[10]。本研究以

常见水产病原菌——鳃弧菌为试验菌对单环刺螠进行人工感染试验,采集感染后的发病个体和抗感个体以及对照组的体腔细胞,采用高通量测序技术对鳃弧菌感染单环刺螠前后进行转录组测序,分析鳃弧菌感染对单环刺螠基因表达和信号通路的影响,为鳃弧菌感染水产动物的分子机制和单环刺螠对细菌的免疫应答研究提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用单环刺螠购于连云港市海宁路水产市场。选取体表完整、活力良好的个体作为试验对象,体质量为 (18.5 ± 2.3) g,体长为 (12.6 ± 1.5) cm。在实验室中暂养7 d,条件为:pH 8.0 ± 0.1 ,温度 $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$,盐度 25 ± 1 ,养殖密度为2条/L,连续充气,按体质量的0.5%每天投喂小球藻(*Chlorella vulgaris*)1次,每日换1/2体积的水。

试验所用鳃弧菌来源于江苏海洋大学海洋逆境

生物研究室。冻存菌株经过活化后,挑取菌落接种至 LB 液体培养基中,在转速 180 r/min、28 °C 下恒温震荡培养 12 h,5 000 r/min 离心 10 min,取沉淀用 0.1 mol/L 无菌磷酸盐缓冲液(pH=7.4)悬浮并将菌液浓度调整到 1×10^7 CFU/mL。

1.2 人工感染试验

设置对照组和试验感染组,各 3 个平行,每个平行随机放 20 条单环刺螭。根据预试验结果,并参考文献[11],感染组单环刺螭距头部 5 cm 处体腔注射 50 μ L 鳗弧菌悬液,对照组以等量无菌生理盐水代替菌悬液。试验期间环境条件和养殖密度与暂养时相同。处理 15 d 后,根据单环刺螭发病情况进行分组,如体表充血发红或者发黑甚至体壁有出血现象,作为易感组;如单环刺螭体表及行为无异常,则作为抗感组。每组随机选取 3 条,用 2 mL 针管按照抗凝剂与体腔液体积比为 1:1 的比例,吸取 ACD 抗凝剂(取 0.48 g 柠檬酸、1.32 g 柠檬酸三钠和 1.47 g 葡萄糖,纯水定容至 100 mL 高压灭菌后 4 °C 保存)和单环刺螭体腔液,于 4 °C、1 000 r/min 离心 2 min,取体腔液细胞沉淀置于液氮中速冻备用。

1.3 转录组测序与组装

采用 Trizol 法分别提取对照组、易感组和抗感组的体腔细胞总 RNA。用 DNase I 去除基因组 DNA 后,核酸检测仪 Agilent 2100(Agilent Technologie, 美国)分析 RNA 的质量和浓度。检测合格的总 RNA,由北京百迈克生物科技有限公司进行测序,采用 Illumina HiSeq 高通量测序平台构建 cDNA 文库。对测序所得原始数据进行质控,筛选掉接头序列及短序列后,用 Trinity 软件进行组装,获得单环刺螭的单基因序列(Unigene)库。

1.4 差异表达基因分析及富集分析

采用 DESeq2 进行样品组间的差异表达基因(differently expressed genes, DEGs)分析,筛选条件为 $|\text{Fold Change}| \geq 2$ 且 $\text{FDR} < 0.01$,对筛选出的 DEGs 进行 GO 富集分析、COG 分类和 KEGG 注释及通路富集分析。

1.5 qRT-PCR 验证

随机挑选 12 个 DEGs 进行验证,包含 6 个上调表达基因和 6 个下调表达基因,所用引物序列如表 1 所示。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences used in qRT-PCR

基因	引物序列(5'~3')	表达趋势
内参基因(β -actin)	F: CTCAACCCCAAGGCTAAC R: GAAACACCATCTCCGGAA	—
热休克蛋白 70(HSP70)	F: TCGGCGTATGTGGTCAAAGT R: CCAGCACGATACAGTGAAGGA	上调
钙磷蛋白样(CAPSL)	F: ACATTGGCGTAGCAAGTAGT R: GCGTCAGACATGGAAGTTGT	上调
牛磺酸分解代谢双加氧酶($TauD$)	F: AGACCACCGACTGTTATCCAT R: CGTCAGGACCATTACCTCA	上调
半乳糖氧化酶(GLOX)	F: GCCAGCATACTGAGACTGTG R: GCCTGTGGTTGATGAAGAGA	下调
原卟啉 III 氧化酶(CPOX)	F: ATGAGGGCAAGAGGGAAAAGAT R: TGAAGAATCAACGACAGCGAA	下调
ABC-2 家族(ABC-2)	F: TCAGAAGCGGAAGATCATCGT R: TCAGGCAGTTGGTCAACATG	下调
氨基酸通透酶(AAPs)	F: AAGTCTGGTTCCGCACTGG R: GTTCTCTACGCCTTCCTCTT	上调
组氨酸磷酸酶(LHPP)	F: TCTCTGCTCACGGTAACA R: CTAGGTAATAGTGCTTGATTGG	上调
细胞色素 P450(CYP450)	F: GAAGTGTTTCAGCCAGGTGTT R: TTCAAGGAAGTCTTACGGTTGT	上调
半乳糖氧化酶(GAO)	F: TTATGAAGGTCCAGCGAGTAGA R: CACTAGCCAGGAGAGGTTGT	下调
α 淀粉酶(α -amylase)	F: GACTGTGGAACCTGGTGATGATA R: CTTGACGCCTGAACCTGTGTA	下调
糖苷水解酶(GH)	F: GCAGTGGACATCTTTACAACCT R: ATCATTGGACCTATGGCAGACA	下调

选取 20 μL 反应体系,包括 TB Green C^{TM} Premix Ex Taq $^{\text{TM}}$ 10 μL , Rox Reference Dye(50 \times) 0.4 μL , cDNA 模板 2 μL , 正反特异性引物(20 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL , ddH₂O 6 μL 。以 $\beta\text{-actin}$ 为内参,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,共 40 个循环;溶解曲线分析:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。实验重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算各基因的相对表达水平。

2 结果

2.1 转录组测序与组装

组装共得到 15.26 GiB 高质量数据,样品 GC 含量区间为 47.01%~48.14%,Q30 碱基百分比均大于 92.43%。将各组样品数据与单环刺螠参考基因组进行序列比对,得到比对效率在 76.02%~79.66%之间,表明转录组测序数据质量较高,可用于后续生物信息分析(见表 2)。

表 2 测序数据与组装结果统计

Table 2 Summary of sequencing and transcriptome assembly

组别	读数	总碱基数	GC 含量 / Q30 / 比对效率 / %	%	%
对照组	22 214 973	6 606 590 622	47.01	93.20	79.66
易感组	22 285 813	6 662 846 306	47.66	93.25	76.02
抗感组	26 715 059	7 987 155 076	48.14	92.43	79.40

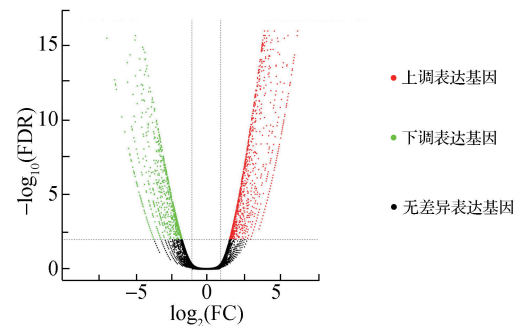
注:Q30 是指 Clean data 质量值 ≥ 30 的碱基所占的百分比。

2.2 差异表达基因分析

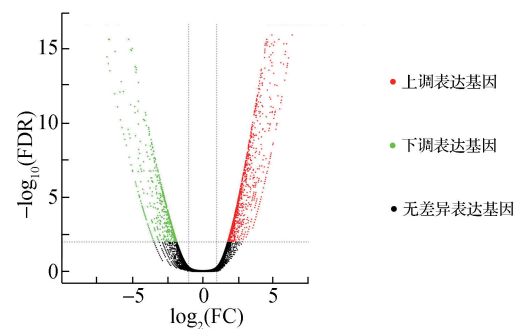
2.2.1 差异表达基因筛选 将单环刺螠感染鳗弧菌后体腔细胞转录组文库和对照组进行比较分析,结果如图 1 所示。易感组和对照组的对比结果共筛选出 2 309 个 DEGs,包括 1 451 个基因上调表达和 858 个基因下调表达(见图 1a),其中有 1 628 个 DEGs 得到注释,包括 COG 591 个、GO 565 个、KEGG 788 个;抗感组和对照组的对比结果共筛选出 1 955 个 DEGs,其中包括 1 311 个上调表达基因和 644 个下调表达基因(见图 1b),其中有 1 505 个 DEGs 得到注释,包括 COG 588 个、GO 589 个、KEGG 731 个。

2.2.2 差异表达基因 GO 分类 对 DEGs 进行 GO 功能分析,结果显示显著富集 GO 的条目主要集中于生物学过程、细胞组分和分子功能(见图 2)。易感组中,共有 565 个 DEGs 被归类到 GO 二级功能分类中,其中生物学功能中主要富集于细胞过程(273)、新陈代谢过程(252)、单个有机体过程(232)以及生物调

节(94);在细胞组分中主要富集在膜(187)、细胞(145)、细胞组分(144)以及膜组分(99);在分子功能中主要富集于催化活性(144)和结合(129)等功能(见图 2a)。抗感组中,共有 589 个 DEGs 被归类到 GO 二级功能分类中,在细胞组分中主要富集在细胞(196)、细胞组分(190)、膜(161)和器官(122);在生物学功能中主要富集在细胞过程(307)、单个有机体过程(229)、新陈代谢过程(265)以及生物调节(100);在分子功能中主要富集在催化活性(290)、结合(255)以及转运活性(27)等(见图 2b)。



a 易感组 vs 对照组



b 抗感组 vs 对照组

图 1 差异表达基因火山图

Fig. 1 Volcano plot of differentially expressed genes

2.2.3 差异表达基因 COG 分类 利用 COG 数据库对单环刺螠的易感组、抗感组分别和对照组的 DEGs 进行直系同源分类(见图 3)。在易感组和对照组的对比中共获得 591 个注释信息,其中富集基因数量较多的功能有:信号传导机制(72)、翻译后修饰、蛋白质转换和分子伴侣(62)、碳水化合物运输和代谢(58)、氨基酸运输和代谢(45)(见图 3a)。

在抗感组和对照组的对比中共获得 588 个注释信息,其中富集基因数量较多的功能有:信号传导机制(63)、氨基酸运输和代谢(55)、碳水化合物运输和代谢(53)、翻译后修饰、蛋白质转换和分子伴侣(52)(见图 3b)。

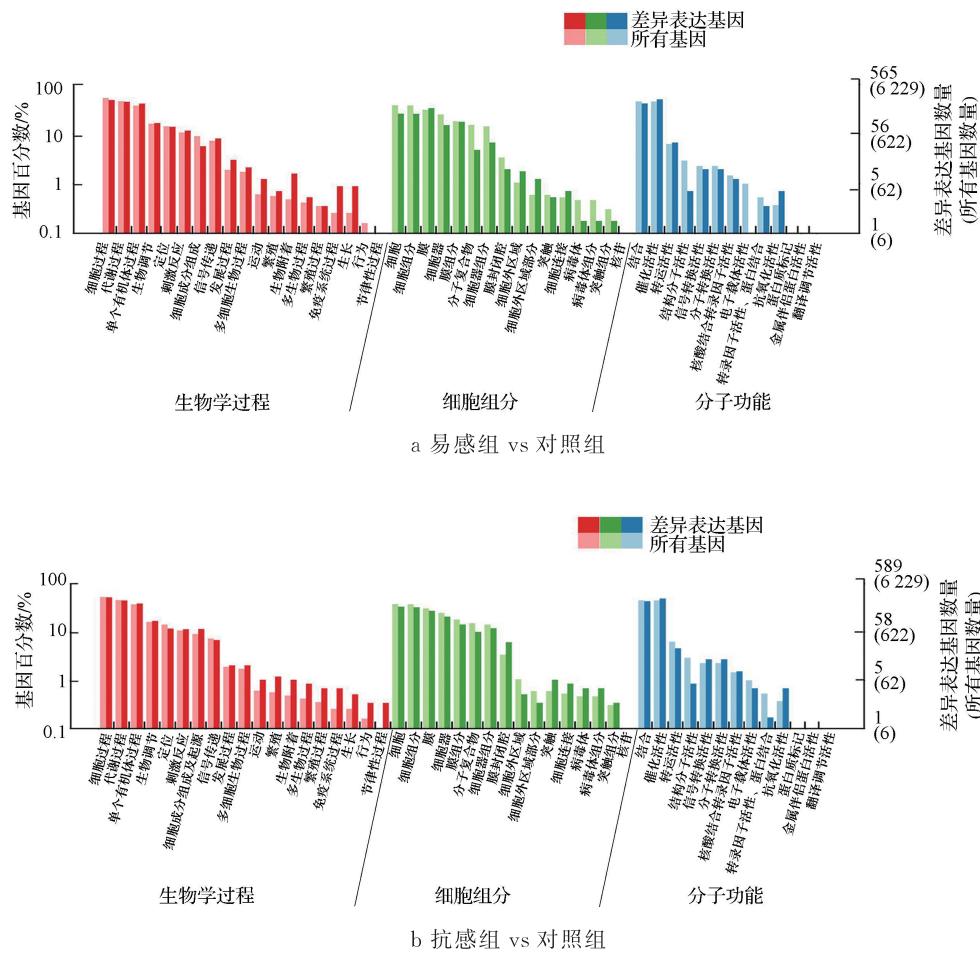


图 2 差异表达基因 GO 分类

Fig. 2 GO classification of the differentially expressed genes

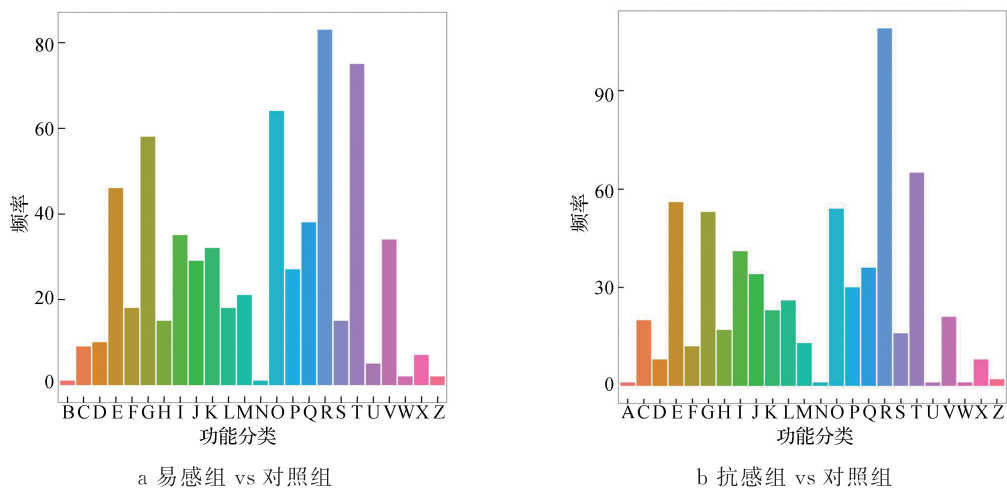


图 3 差异表达基因 COG 功能分类

Fig. 3 COG function classification of the differentially expressed genes

注: A—RNA 加工和修饰, B—染色质结构与动力学, C—能量产生和转换, D—细胞周期调控、细胞分裂、染色体分离, E—氨基酸运输和代谢, F—核酸运输和代谢, G—碳水化合物运输和代谢, H—辅酶转运和代谢, I—脂类转运和代谢, J—翻译、核糖体结构和生物合成, K—转录, L—复制、重组和修复, M—细胞壁/膜/外被生物合成, N—细胞运动, O—翻译后修饰、蛋白质转换和分子伴侣, P—无机离子转运和代谢, Q—一次级代谢物的合成、转运和分解, R—仅限一般功能预测, S—未知功能, T—信号传导机制, U—胞内运输、分泌和膜泡转运, V—防御机制, W—细胞外结构, X—移动; 前吞噬体、转座子, Z—细胞骨架。

2.2.4 差异表达基因 KEGG 富集分析 为了明确 DEGs 的生物学功能,选取富集最为显著的 20 个信号通路进行 KEGG 富集分析。在易感组和对照组的对比中,共有 298 个 DEGs 注释到 187 个代谢通路中,其中富集到内质网中的蛋白质加工的通路中的差异表达基因数量最多为 29 个,其次是溶酶体(26)、嘌呤代谢(17)、内吞作用(13)、ABC 转运蛋白

(12)、泛素介导的蛋白质水解(12)、ECM-受体相互作用(11)以及细胞凋亡(11)等信号通路(见图 4a)。上调表达基因主要富集在内质网中的蛋白质加工、内吞作用、泛素介导的蛋白质水解以及细胞凋亡等信号通路(见图 4b);下调表达基因主要富集在溶酶体、嘌呤代谢、过氧化物酶体、ABC 转运蛋白以及 ECM-受体相互作用等信号通路(见图 4c)。

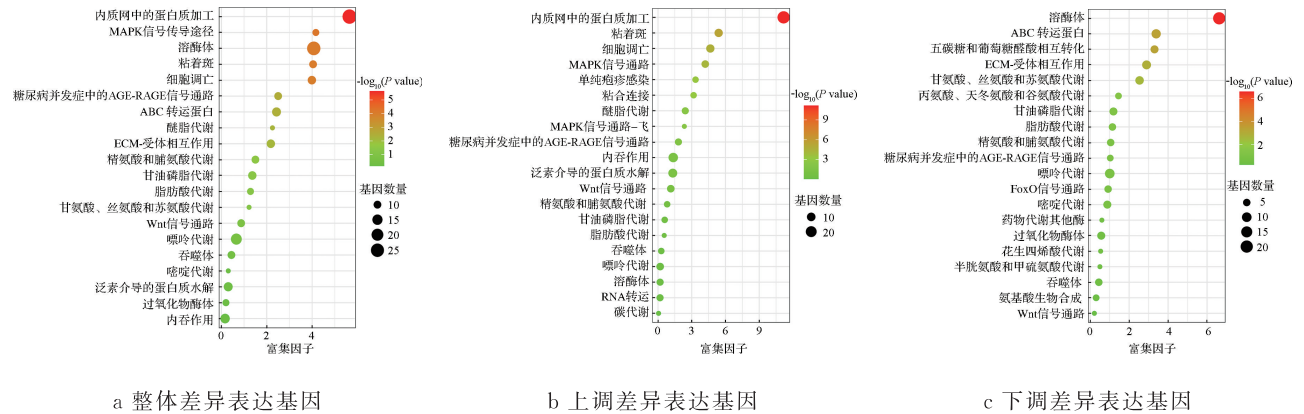


图 4 易感组 vs 对照组差异表达基因 KEGG 通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of the differentially expressed genes between susceptible group and control group

在抗感组和对照组的对比中,共有 289 个 DEGs 注释到 173 个代谢通路中,其中富集 DEGs 最多的信号通路是真核生物核糖体生物合成(27),其次是碳代谢(18)、溶酶体(15)、内吞作用(13)、精氨酸和脯氨酸代谢(12)、嘌呤代谢(11)、氨基酸生物合成(11)、内质网中的蛋白质加工(10)以及糖酵解/

糖异生(10)等(见图 5a)。由图 5b 可以看出,上调表达基因主要富集在碳代谢、内吞作用、糖酵解/糖异生、内质网中的蛋白质加工以及精氨酸和脯氨酸代谢等信号通路;下调表达基因主要富集在溶酶体、RNA 降解、氨酰 tRNA 生物生成、mTOR 信号通路以及嘌呤代谢等信号通路(图 5c)。

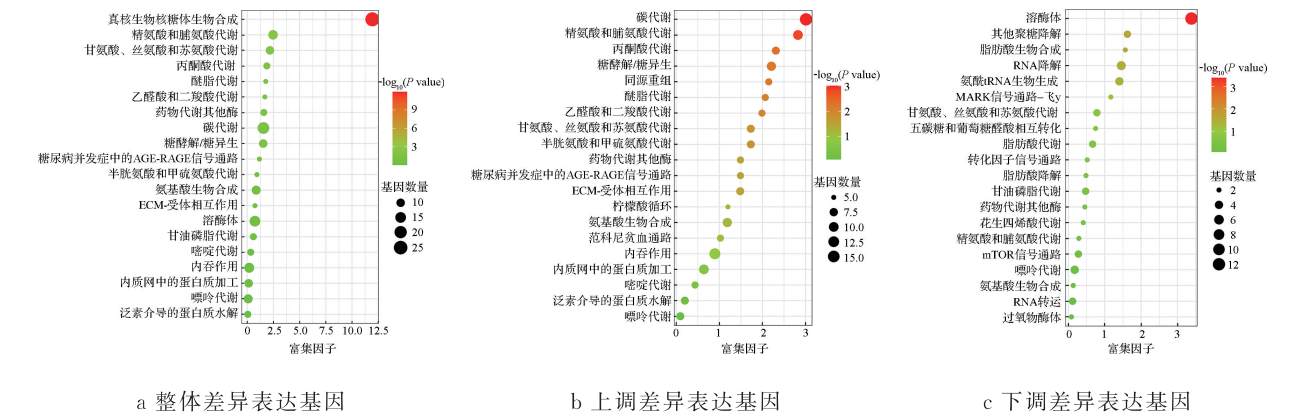


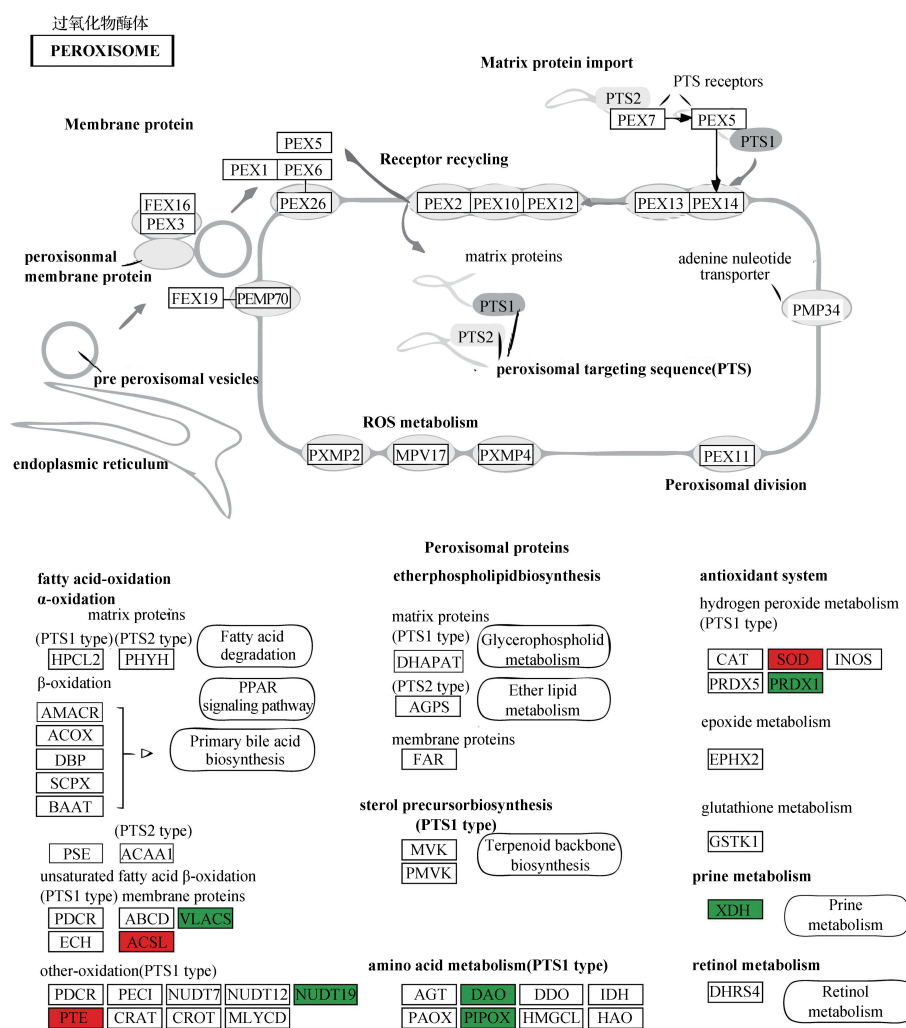
图 5 抗感组 vs 对照组差异表达基因 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis of the differentially expressed genes between disease resistant group and control group

根据显著富集的前 20 个 KEGG 信号通路显示,参与鳃弧菌感染单环刺螠诱导免疫应答过程的

通路主要有 MAPK 信号通路、过氧化物酶体、内吞作用、溶酶体、氨基酸生物合成、粘着斑以及真核生物核糖体生物合成等。过氧化物酶体通路分析结果见图 6, 显示单环刺蝟在感染鳃弧菌后引起长链脂酰辅酶 A 合成酶(Long-chain acyl-CoA synthetase, ACSL)、磷酸三酯酶(Phosphotriesterase, PTE)以及超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)基因显著上调, 而脂肪酸转运蛋白(Fatty acid transporter, VLACS)、Nudix 水解酶(Nudix hydrolase 19, NUDT19)、D-氨基酸氧化酶(D-amino-acid oxidase, DAO)、哌可酸氧化酶(Pipecolate oxidase, PIPOX)、过氧化还原酶 1 (Peroxi-redoxin 1,

PRDX1) 和黄嘌呤脱氢酶(Xanthine dehydrogenase, XDH)等基因表达显著下调。溶酶体代谢通路分析结果见图 7, 显示鳃弧菌感染可引起单环刺蝟抗酒石酸酸性磷酸酶(Acid Phosphatase 5, ACP5)和棕榈酰蛋白硫酯酶 1(Neuronal ceroid lipofuscinosis 1, CLN1)基因表达显著上调, 而组织蛋白酶(cathepsins)、芳基硫酸酯酶(Arylsulfatase, ARS)、天冬酰胺氨基葡萄糖苷酶(Actionable genomic alterations, AGA)、鞘磷脂水解酶 1(Sphingomyelin phosphodiesterase 1, SMPD1)以及 NPC 细胞内胆固醇转运蛋白 1(NPC intracellular cholesterol transporter1, NPC1)等基因表达显著下调。

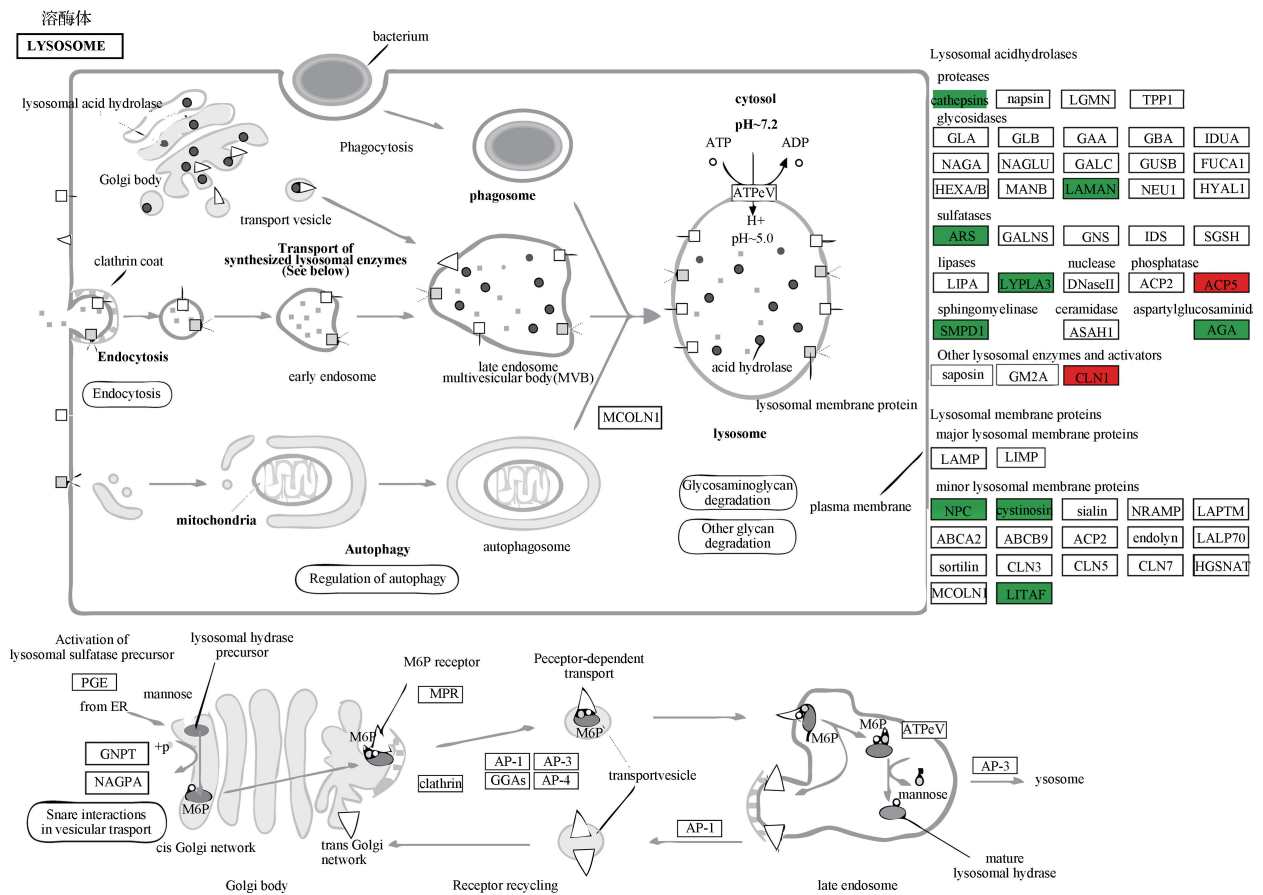


注: 红色代表基因表达上调, 绿色代表基因表达下调。

图 6 过氧化物酶体信号通路
Fig. 6 Peroxisome pathway in KEGG

2.3 单环刺蝟感染鳃弧菌后相关免疫基因的筛选
根据筛选出的 DEGs 在 GO, COG, KOG, KEGG

等数据库中得到的注释, 筛选出了 13 个潜在的抗感基因(见表 3)和 6 个易感基因(见表 4)。



注:红色表示基因表达上调,绿色表示基因表达下调。

图 7 溶酶体信号通路

Fig. 7 Lysosome pathway in KEGG

表 3 单环刺螭潜在的抗感基因

Table 3 Potential disease resistance genes in *U. unicinctus*

基因编号	基因名称	COG 注释	KOG 注释	差异倍数对数值
c37023_graph_c0	牛磺酸分解代谢双加氧酶(<i>TauD</i>)	次生代谢产物的生物合成、运输和分解代谢	脂质运输和代谢	6.90
c42783_graph_c0	细胞色素 P450(<i>CYP450</i>)	次生代谢产物的生物合成、运输和分解代谢	—	4.84
c40909_graph_c0	热休克蛋白 70(<i>HSP70</i>)	翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣	翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣	3.85
c31877_graph_c0	氨基酸通透酶(<i>AAPs</i>)	氨基酸运输和代谢	氨基酸运输和代谢	3.79
c34937_graph_c0	细胞分裂周期 42(<i>CDC42</i>)	仅一般功能预测	仅一般功能预测	3.67
c36190_graph_c0	乙醛酸和羟基丙酮酸还原酶(<i>GRHPR</i>)	辅酶转运与代谢	能量产生和转换	3.05
c37675_graph_c0	胱硫醚 β-合酶(<i>CBS</i>)	信号转导机制	氨基酸运输和代谢	2.56
c29443_graph_c0	组氨酸磷酸酶(<i>LHPP</i>)	碳水化合物运输和代谢	碳水化合物运输和代谢	2.47
c39794_graph_c0	肌动蛋白相关蛋白 3(<i>ACTR3</i>)	—	细胞骨架	2.21
c39704_graph_c1	Casitas B 细胞淋巴瘤 b(<i>Cbl-b</i>)	—	防御机制	2.20
c37952_graph_c0	谷草酰乙酸转氨酶 2(<i>GOT2</i>)	氨基酸运输和代谢	氨基酸运输和代谢	2.16
c38580_graph_c0	编码葡萄糖激酶(<i>GCK</i>)	碳水化合物运输和代谢	碳水化合物运输和代谢	1.96
c41156_graph_c0	乳酸脱氢酶(<i>LDH</i>)	能量产生和转换	能量产生和转换	1.88

注:“—”表示基因在该数据库没有注释。

表 4 单环刺螈潜在的易感基因

Table 4 Potential susceptibility genes in *U. uncinatus*

基因编号	基因名称	COG 注释	KOG 注释	差异倍数对数值
c37820_graph_c0	ADP 核糖激化因子(<i>ARF</i>)	仅一般功能预测	细胞内运输、分泌和囊泡运输	8.28
c35315_graph_c0	钙网蛋白(<i>CALR</i>)	—	翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣	3.07
c37240_graph_c0	Ras 相关蛋白-8A(<i>Rab8A</i>)	仅一般功能预测	仅一般功能预测	2.90
c40157_graph_c0	EH 结构域蛋白 1(<i>EHD1</i>)	复制、重组和修复	—	2.53
c41614_graph_c1	细胞粘附素(<i>CYTH</i>)	仅一般功能预测	细胞内运输、分泌和囊泡运输	2.45
c38289_graph_c0	Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1(<i>RAC1</i>)	—	仅一般功能预测	2.05

注:“—”表示基因在该数据库无注释。

2.4 差异表达基因 qRT-PCR 验证结果

为了验证测序数据的准确性,随机选择了 12 个 DEGs 进行 qRT-PCR 验证,所得结果与高通量测序结果趋势一致,表明转录组测序结果准确(见图 8)。

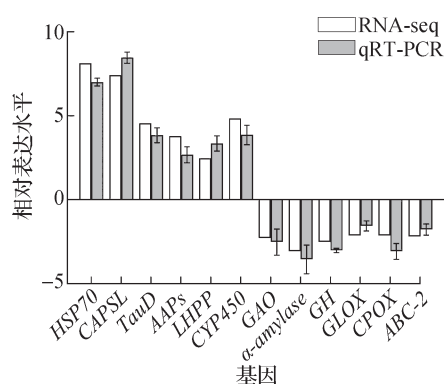


图 8 鳗弧菌感染单环刺螈后差异表达基因 qRT-PCR 分析
Fig. 8 The qRT-PCR analysis of differentially expressed genes of *U. uncinatus* infected with *V. anguillarum*

3 讨论

为了探究鳗弧菌对水产经济动物的致病机理,本实验对单环刺螈感染鳗弧菌的体腔细胞转录组数据进行了分析,挖掘免疫相关基因,为阐明单环刺螈抗鳗弧菌感染的分子机制提供数据参考。

3.1 鳗弧菌感染对单环刺螈体腔细胞转录组的影响

单环刺螈感染鳗弧菌后,GO 功能分类结果显示 DEGs 显著富集于膜、细胞过程、代谢过程、催化活性以及单个有机体过程等功能,COG 功能分类显示 DEGs 富集在信号转导机制、碳水化合物运输和代谢以及氨基酸运输和代谢等方面。这些功能均与入侵病原菌的识别、宿主自身防御以及清除病原菌等密切相关,表明单环刺螈在鳗弧菌感染后,细胞的

代谢和物质交换等生命活动受到较大影响,从而促使免疫相关酶或者免疫因子参与机体的免疫应答过程。

朱鑫海等^[12]对翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)后的头肾组织进行了转录组分析,结果显示共有 21 693 个基因被注释,筛选到 526 个 DEGs,其中上调表达基因 254 个,下调表达基因 272 个。李欣荣等^[13]对感染灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)的刺参(*Stichopus japonicus*)进行转录组测序,筛选到 DEGs 496 个,包括 214 个上调基因和 282 个下调基因。马慧^[14]分析了感染鳗弧菌的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)头肾组织转录组数据,筛选出 962 个 DEGs,包含 442 个上调基因和 520 个下调基因。本实验在单环刺螈对鳗弧菌感染的易感组中,筛选到 2 309 个 DEGs,其中 1 451 个上调表达基因,858 个下调表达基因;在抗感组中筛选出 1 955 个 DEGs,包括 1 311 个上调表达基因和 644 个下调表达基因。多数 DEGs 都与机体免疫防御功能有关,主要涉及细菌感染时细胞表面对病原菌的识别,并通过一系列的反应,激活机体内的相关抗菌肽、免疫相关酶和补体等免疫成分,以及时清除入侵的病原体。

3.2 单环刺螈抗鳗弧菌感染的免疫应答基因

本研究发现,单环刺螈感染鳗弧菌后,*HSP70*, *TauD*, *AAPs*, *LHPP* 以及 *CYP450* 等基因表达显著上调,表明这些基因参与了单环刺螈对鳗弧菌入侵机体的防御和免疫应答。当生物受到外界不利刺激时,*HSP70* 基因家族会被诱导表达,进而提高生物对外部压力的抵抗能力以减轻损伤程度,在先天性免疫和适应性免疫中发挥着重要的作用^[15]。司凯歌^[16]发现中华鲟(*Acipenser sinensis*)在感染嗜水气单胞菌后,9 个 *HSP70* 家族成员 mRNA 表达量在脾脏和肾脏中显著增加。在感染嗜水气单胞菌

的鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)^[17]和感染鳃弧菌的地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)^[18]研究中也得到了类似的结果。*TauD*基因可以保护细胞免受氧化应激以及影响牛磺酸的同化能力。有相关研究表明,牛磺酸与其代谢相关酶在被弧菌感染的南美白对虾(*Penaeus vannamei*)病虾中表达上调,而在垂死虾中表达下调,且牛磺酸水平和细菌丰度之间存在负相关,同时在副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的刺激下,补充一定浓度的牛磺酸可以提高对虾2%的存活率,表明适量的牛磺酸能够调节微生物菌群和宿主免疫反应,并增强对细菌的抵抗能力^[19]。*AAPs*作为一种氨基酸通透酶基因,能够促进氨基酸的渗透和吸收,维持正常的生理功能。*LHPP*编码蛋白质组氨酸磷酸酶,在多种细胞过程中起着重要的调节作用,涉及细胞周期、信号转导、增殖、分化和凋亡等^[20]。该酶介导的组氨酸磷酸化作用在脊椎动物研究中被广泛报道,但在水生无脊椎动物中的研究相对较少。Wang等^[20]在南美白对虾体内鉴定了一种组氨酸磷酸酶同源物,发现对虾感染副溶血弧菌后该物质对其体腔细胞凋亡起到促进作用。此外,在脂多糖刺激下,南美白对虾体内的组氨酸磷酸酶表达上调,表明其是参与南美白对虾先天免疫应答的一个诱导因子^[21]。细胞色素P450酶主要分布在内质网膜和线粒体内膜上,在药物、甾体化合物、脂溶性维生素、致癌物、杀虫剂和其他类型化学物质的代谢中起到重要作用^[22]。本实验发现CYP450酶基因(*CYP450*)参与了单环刺螭脂肪酸代谢通路,产生能量以供免疫细胞活动。

3.3 单环刺螭免疫相关信号通路

本研究通过KEGG富集通路分析,发现与免疫相关的信号通路有溶酶体、过氧化物酶体、内吞作用、MAPK信号通路和ECM-受体相互作用代谢等通路,其中DEGs在溶酶体和过氧化物酶体信号通路显著富集,表明其在单环刺螭的先天性免疫中发挥重要作用。溶酶体是存在于真核细胞中的细胞器,含多种水解酶,起着消化降解蛋白质、多糖、核糖及病原的作用^[23]。溶酶体可通过内吞、吞噬以及自噬作用获得靶蛋白,这些蛋白大多与自身免疫密切相关^[24],在感染早期发挥重要作用。内吞作用主要由受体介导产生,当病原体入侵时,细胞膜表面的受体会形成“网格蛋白外套”,特异性地将外来细胞外蛋白或者化合物包裹起来,并在结合部位的胞质面产生一些附着蛋白,与细胞质膜分离后形成晚期胞内体。自噬作用作为一种细胞的自我保护机制,为

了细胞内环境的稳定会选择性地包裹受损的线粒体,形成自噬体。晚期胞内体、自噬体或者吞噬体都会被运输到溶酶体中,通过多种水解酶的降解作用使病原体被分解。从本试验单环刺螭体腔细胞溶酶体通路中可以看出,上调表达基因(*ACP5*,*CLN1*)和下调表达基因(*ARS*,*SMPD1*,*AGA*,*NPC1*,*Cathepsins*等)参与溶酶体水解酶、膜以及膜蛋白的合成,以影响溶酶体的发生。其中,*ACP5*和*AGA*分别编码酸性水解酶和糖苷水解酶,在溶酶体中可将病原体逐步分解消化;*CLN1*和*Cathepsins*基因编码蛋白水解酶,参与溶酶体降解过程中蛋白质的分解代谢;合成的*NPC1*是一种晚期胞内体膜蛋白,这种蛋白质将低密度脂蛋白转运到晚期胞内体,接着被水解并释放为游离胆固醇。总体而言,外界病原体通过网格蛋白介导的各种吞噬作用形成胞内体,被运输到溶酶体中,通过一系列酶的降解过程使病原体被分解。

过氧化物酶体是一种在真核生物体中普遍存在的细胞器,其在氧化代谢、脂质代谢和解毒中起关键作用,如脂肪酸氧化、醚类脂质的生物合成和自由基解毒等^[25]。过氧化物酶体不仅是代谢细胞器,还可作为调节各种生理和病理过程的信号转导平台,包括炎症、先天免疫和细胞命运转变等^[26]。过氧化物酶体能通过调节控制肌动蛋白网络组装的信号转导来介导吞噬体形成和病原体消化,进而影响宿主对感染的反应^[27]。过氧化物酶体的代谢功能和线粒体代谢活动密切相关,且两者具有许多共同特征,对于多细胞过程(脂肪酸 β 氧化)和控制细胞中的氧化还原稳态具有重要作用^[28]。有研究表明,线粒体是免疫应答和炎症反应的主要枢纽,能够参与信号转导和细胞内区室化过程,并抵御多种病原体入侵^[29]。过氧化物酶体还参与多不饱和脂肪酸的降解和合成,二十碳五烯酸和二十二碳五烯酸等多不饱和脂肪酸构成了一系列调节炎症反应的介质骨架^[30]。从本实验过氧化物酶体通路中可以看出,*ACSL*和*PTE*基因在不饱和脂肪酸的 β 氧化过程中显著上调表达,而*VLACS*和*NUDT19*基因下调表达。*ACSL*编码脂肪代谢关键酶,能够促进脂肪酸合成与分解代谢和供能;*PTE*可以催化单环刺螭体内生物清除剂,以减少病原体入侵而对机体产生的毒害。此外,*SOD*基因在过氧化氢代谢过程中表达上调,*DAO*和*PIPOX*基因在氨基酸的氧化代谢过程中表达下调,表明单环刺螭感染鳃弧菌后,过氧化物酶体信号通路中的表达基因不仅涉及细胞的抗氧化

反应和供能,还与机体免疫防御机能有关^[31]。

由于目前基因数据库中单环刺螠基因信息有限,本实验转录组测序结果中有超过半数的 Uni-gene 未能得到注释,需要在今后的研究中进行补充,并结合多组学技术深入探索单环刺螠病原感染后机体的免疫应答机制。

4 结论

通过分析鳎弧菌感染单环刺螠后易感组、抗感组和对照组体腔细胞的转录表达差异,发现 DEGs 主要涉及信号转导、代谢和防御等功能,与免疫相关的通路主要有 MAPK 信号通路、过氧化物酶体、内吞作用、溶酶体、氨基酸生物合成等,其中过氧化物酶体和溶酶体信号通路在抗鳎弧菌感染过程中可能起重要作用。筛选出了潜在的抗感基因(*TauD*, *CYP450*, *Cbl-b*, *ACTR3*, *HSP70*, *AAPs*, *GCK*, *GRHPR*, *CBS*, *LHPP*, *GOT2*, *LDH*, *CDC42*)和易感基因(*ARF*, *CYTH*, *EHD1*, *Rab8A*, *CALR*, *RAC1*)。研究结果可为解析鳎弧菌对水产养殖动物的感染机制提供依据,也为阐明单环刺螠抵御鳎弧菌感染的分子机制提供数据参考。

参考文献:

- [1] 王凤青,孙玉增,任利华. 海水养殖中水产动物主要致病弧菌研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2018, 8(2):49-56.
- [2] AUSTIN B, AUSTIN D A. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish[M]. New York-Chichester: Springer-Praxis Publishing, 2007: 99.
- [3] FRANS I, MICHIELS C W, BOSSIER P, et al. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention[J]. Journal of Fish Diseases, 2011, 34(9): 643-661.
- [4] 李诺,宋淑莲,唐永政. 单环刺螠[J]. 生物学通报, 1998, 33(8):12-14.
- [5] 刘万顺,成慧中,韩宝芹,等. 单环刺螠溶酶 UFEI 药效作用和免疫原性的初步研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(Z1):88-92.
- [6] 许星鸿,朱佶轩,霍伟,等. 单环刺螠人工育苗及养殖技术[J]. 海洋与渔业, 2016(3):53-55.
- [7] ZHANG Tingting, QIN Zhenkui, LIU Danwen, et al. A novel transcription factor MRPS27 up-regulates the expression of *sqr*, a key gene of mitochondrial sulfide metabolism in echiuran worm *Urechis unicinctus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2021, 243: 108997.
- [8] 丁子媛,刘顺,王思婕,等. 双酚 A(BPA)对单环刺螠急性毒性及消化酶活力的影响[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2022, 31(1):9-15.
- [9] 丁子媛,刘统昊,刘顺,等. 主要环境因子和混养对单环刺螠幼螠成活和生长的影响[J]. 水产学杂志, 2023, 36(1):72-81.
- [10] 郭志涛,武慧慧,耿淑慧,等. 基于高通量测序技术对染色体外环状 DNA 研究的最新进展[J]. 生命科学, 2023, 35(6):824-832.
- [11] 朱兴华,王金龙,袁廷柱,等. 鳎弧菌和迟钝爱德华氏菌对短蛸肝脏菌群结构的影响[J]. 水产科学, 2022, 41(6):976-984.
- [12] 朱鑫海,张紫瑞,周丽颖,等. 嗜水气单胞菌感染翘嘴鲈头肾转录组分析[J]. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 208-217.
- [13] 李欣容,廖梅杰,李彬,等. 刺参响应灿烂弧菌感染的基因组 DNA 甲基化水平和转录组差异及其关联分析[J]. 渔业科学进展, 2022, 43(3):176-185.
- [14] 马慧. 不同病原菌感染半滑舌鳎后免疫组织和免疫细胞转录组分析及免疫调控研究[D]. 青岛:青岛大学, 2022.
- [15] JUNPRUNG W, SUPUNGUL P, TASSANAKAJON A. HSP70 and HSP90 are involved in shrimp *Penaeus vannamei* tolerance to AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* after non-lethal heat shock [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2017, 60: 237-246.
- [16] 司凯歌. 中华鲟热休克蛋白 HSP30 基因和 HSP70 家族基因的克隆及其在高温胁迫和细菌感染下的表达分析[D]. 上海:上海海洋大学, 2019.
- [17] WANG Pengfei, XU Peng, ZENG Shuang, et al. Comparative analysis of sequence feature and expression of two heat shock cognate 70 genes in mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. Gene, 2015, 560(2): 226-236.
- [18] CELLURA C, TOUBIANA M, PARRINELLO N, et al. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2006, 30(11): 984-997.
- [19] WANG Zhongyan, AWEYA J J, YAO Defu, et al. Taurine metabolism is modulated in *Vibrio*-infected *Penaeus vannamei* to shape shrimp antibacterial response and survival[J]. Microbiome, 2022, 10(1): 213.

- [20] WANG Zhongyan, ZHANG Yueling, AWEYA J J, et al. The histidine phosphatase LHPP of *Penaeus vannamei* is involved in shrimp hemocytes apoptosis [J]. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2023, 5: 100109.
- [21] ZHANG Yueling, GAO Guicai, LIN Ruihong, et al. Transcriptome analyses reveal *Litopenaeus vannamei* hemocytes response to lipopolysaccharide [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 76: 187-195.
- [22] GUENGERICH F P, WATERMAN M R, EGLI M. Recent structural insights into cytochrome P450 function [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2016, 37(8): 625-640.
- [23] RIZZOLLO F, MORE S, VANGHELUWE P, et al. The lysosome as a master regulator of iron metabolism [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2021, 46(12): 960-975.
- [24] ZHENG Hongmei, LI Gangjian, MIN Jingli, et al. Lysosome and related protein degradation technologies [J]. *Drug Discovery Today*, 2023: 28(11): 103767.
- [25] COSTELLO J L, KOSTER J, SILVA B S C, et al. Differential roles for ACBD4 and ACBD5 in peroxisome-ER interactions and lipid metabolism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(8): 105013.
- [26] WANG B, APANASETS O, NORDGREN M, et al. Dissecting peroxisome-mediated signaling pathways: a new and exciting research field [J]. *Molecular Machines Involved in Peroxisome Biogenesis and Maintenance*, 2014: 255-273.
- [27] PUERTOLLANO M A, DE PABLO M A, ALVAREZ DE CIENFUEGOS G. Immunomodulatory effects of dietary lipids alter host natural resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection [J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2001, 32(1): 47-52.
- [28] FRANSEN M, LISMONT C, WALTON P. The peroxisome-mitochondria connection: how and why? [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(6): 1126.
- [29] MOHANTY A, TIWARI-PANDEY R, PANDEY N R. Mitochondria: the indispensable players in innate immunity and guardians of the inflammatory response [J]. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 2019, 13(3): 303-318.
- [30] SERHAN C N, LEVY B D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128(7): 2657-2669.
- [31] DI C F, ANDREOLETTI P, TROMPIER D, et al. Peroxisomes in immune response and inflammation [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(16): 3877.

(责任编辑:秦海明,李琴 实习编辑:张昌保)