

DOI: 10.12264/JFSC2024-0185

poly (I : C)刺激马氏珠母贝血淋巴外泌体 miRNA 差异表达分析

王萍¹, 谭婉琦¹, 任紫绮¹, 李芷晴¹, 左贤¹, 屈佳¹, 王庆恒^{1, 2, 3, 4}, 郑哲^{1, 2, 3, 4}

1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;
2. 广东省珍珠科技创新中心, 广东 湛江 524088;
3. 广东省珍珠养殖与加工工程技术研究中心, 广东 湛江 524088;
4. 广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室, 广东 湛江 524088

摘要: 外泌体 miRNAs 在调控脊椎动物的免疫应答过程中发挥重要作用。为探究外泌体 miRNA 在马氏珠母贝免疫应答过程中的作用, 通过向马氏珠母贝闭壳肌血窦中注射 poly (I : C)和 PBS 进行免疫刺激, 分析血淋巴中差异表达的外泌体 miRNAs, 预测其靶基因及调控的免疫相关信号通路。结果显示, 马氏珠母贝血淋巴外泌体为球形或近似球形的囊泡, 膜结构完整、轮廓清晰, 粒径为 75~150 nm。PBS 组和 poly (I : C)组共鉴定到 101 条 miRNA, 其中 76 条为已知 miRNA。与 PBS 组相比, poly (I : C)组有 7 条 miRNA 显著上调, 5 条 miRNA 显著下调。以上差异 miRNA 共获得 570 个靶基因。KEGG 富集分析发现了与免疫相关的信号通路包括“acute myeloid leukemia” “JAK-STAT signaling pathway”和“chemokine signaling pathway”, 与代谢相关的“glycerolipid metabolism” “purine metabolism”和“arginine and proline metabolism”以及与内分泌相关的“relaxin signaling pathway” “prolectin signaling pathway”和“insect hormone biosynthesis” ($P<0.05$)。其中, novel_mir2、novel_mir22、miR-2b_5、miR-279 等 8 个 miRNAs 在免疫相关的信号通路中发挥调控作用, 并通过 FOXO 偶联调控代谢影响马氏珠母贝的免疫应答。以上研究表明马氏珠母贝血淋巴外泌体 miRNA 通过调控免疫、代谢和内分泌等协调响应 poly (I : C)刺激, 结果为深入研究贝类中外泌体 miRNA 在免疫应答中的作用提供基础资料。

关键词: 马氏珠母贝; poly (I : C); 免疫应答; 外泌体; miRNA

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)11-1375-12

MicroRNA (miRNA)是一类动植物普遍存在的内源性小分子非编码 RNA, 可与 mRNA 的 3' 非翻译区、5'非翻译区以及编码区域相互作用, 通过影响 mRNA 的稳定性或抑制核糖体在 mRNA 的滑动等方式, 在转录后水平调控靶基因的表达, 进而调节细胞增殖与分化、生长发育、生物矿化、免疫应答等多种生物过程^[1]。在贝类中, 血细胞是非特异性免疫的主要承担者, 参与损伤修复、贝壳重建、吞噬异物颗粒和消除有毒物质等过程^[2]。已有研究显示, 贝类 miRNA 可以靶向多种免疫

相关分子调节血细胞参与的免疫应答过程。例如, 长牡蛎(*Crassostrea gigas*) miR-2d 通过靶向 IkB2 提高血细胞的吞噬能力^[3]; 马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) miR-29a 通过抑制神经肽受体 Y2R 的表达, 激活白细胞介素 1 和 NF- κ B 来促进炎症反应的发生^[4]。厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*) 血细胞 miRNA 通过调控 Toll 样受体(TLR)、转化生长因子- β (TGF- β)以及 mTOR 信号通路等调节溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)感染引发的免疫反应^[5]。紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)血细胞

收稿日期: 2024-07-01; 修订日期: 2024-08-01.

基金项目: 湛江市科技计划项目(2022A01010); 广东海洋大学科研项目经费(060302022305); 广东海洋大学创新创业训练计划项目(CXXL2022011); 广东省自然科学基金项目(2023A1515030048, 2024A1515011617).

作者简介: 王萍(2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产生物技术. E-mail: 1760012150@qq.com

通信作者: 郑哲, 副教授, 研究方向为海产无脊椎动物生物学及增养殖技术. E-mail: haidazhengzhe@163.com

miRNA 通过调控模式识别受体途径、细胞吞噬、NO 合成、ROS 合成以及细胞稳态等响应 LPS、poly (I : C) 和 β -glucans 等多种免疫原激^[6]。

外泌体是大小为 40~100 nm 的杯状囊泡, 可从多种类型细胞释放并进入细胞外环境中^[7], 转运核酸、蛋白质、脂质等生物活性分子, 参与细胞间信息传递并发挥调节作用^[8]。研究发现, 外泌体 miRNA 在动物的免疫调节中发挥重要作用。例如, 外泌体 miR-155 通过抑制 PU.1 和肿瘤坏死因子的表达, 促进系统性红斑狼疮的发生^[9]。肿瘤源的外泌体 miR-1468-5p 通过介导淋管的免疫抑制重编程, 促进肿瘤细胞的免疫逃逸^[10]。乳汁中的外泌体 miRNAs 通过抑制肠上皮细胞 TLR4/NF-kappaB 和 p53 途径减轻脂多糖诱导的细胞凋亡^[11]。水生无脊椎动物外泌体 miRNA 研究报道较少。在拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 中, 外泌体 miR-137 和 miR-7847 通过调控线粒体诱导的血细胞凋亡抑制 WSSV 病毒的复制进而发挥抗病毒作用^[12]。Liu 等^[13]也发现外泌体 miRNA 参与太平洋牡蛎应对弧菌感染的免疫应答。

马氏珠母贝是我国最主要的海水育珠贝, 对地区经济发展和乡村振兴具有重要贡献。研究发现, 在珍珠贝完成外套膜小片移植手术后, 血淋巴外泌体中可以鉴定到差异表达的 miRNA 和 piRNA, 表明在马氏珠母贝中外泌体 miRNA 参与免疫应答过程^[14], 但其调控作用和机制并不清楚。本研究通过注射 poly (I : C) 和 PBS 对马氏珠母贝进行免疫刺激后, 分离血淋巴外泌体, 通过高通量测序筛选和鉴定差异表达的 miRNA, 预测其靶基因并分析潜在的调控作用途径, 以期为深入研究外泌体 miRNA 在贝类免疫防御中的作用机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

取生长旺盛, 壳面无明显损伤, 规格基本一致[壳长(69.23±3.80) mm]的 1.5 龄马氏珠母贝为实验对象。将珍珠贝体表附着物清除后带回实验室, 在 25~27 °C 的循环海水中暂养 72 h 后用于实验。

实验设对照组(PBS 组)和 poly (I : C) 组, 每组均为 45 只贝。分别向闭壳肌血窦中注射 0.5 mg/mL 的 PBS 和 0.5 mg/mL poly (I : C) 溶液, 注射量均为 100 μ L/贝。注射 12 h 后, 从每个组随机取 30 只贝, 使用 2 mL 一次性注射器从马氏珠母贝的闭壳肌血窦中抽取血淋巴, 4 °C, 3500 r/min 离心 10 min, 取上层血清。每 5 个个体的血清混合作为一个样本用以提取外泌体, 每个样本取 5 μ L 外泌体悬液做成混合样进行电镜检测, 剩余外泌体用于提取小 RNA。小 RNA 用于构建文库和测序及 qRT-PCR 的验证。

1.2 实验方法

1.2.1 血淋巴外泌体的提取 将马氏珠母贝血清 4 °C 4450 r/min 离心 10 min, 取上清; 5600 r/min 再次离心 15 min, 取上清, 经 0.22 μ m 的滤膜过滤后利用 30 kD 超滤管富集。最后使用 ExoQuick™ Exosome 沉淀溶液试剂盒(System Biosciences)分离外泌体。

1.2.2 外泌体的粒径检测、电镜鉴定 将外泌体悬液通过纳米流式检测仪(NanoFCM, Flow NanoAnalyzer U30E)检测外泌体粒径及颗粒浓度。取 20 μ L 外泌体悬液滴加至电镜铜网栅中, 5 min 后用 2%醋酸双氧乙铀负染固定 5 min, 利用透射电子显微镜(Zeiss, Libra 120)检测外泌体形态。

1.2.3 外泌体 miRNA 的提取和鉴定 用 Trans-Exo™ Serum/Plasma Exosome miRNA Extraction Kit 试剂盒提取血清外泌体的小 RNA, 使用安捷伦 2100 生物分析仪(Agilent RNA 6000 Nano Kit)检测样品完整度和浓度。利用小 RNA 建库试剂盒(VAHTS Small RNA Library Prep Kit for Illumina)构建小 RNA 文库, 取 1 μ g 的 RNA 样品, 使用聚丙烯酰胺凝胶, 电泳回收 18~30 nt small RNA; 得到的 small RNA 分别连接 5'接头和 3'接头, 以带 UMI 的 RT 引物进行逆转录延伸, 合成一链 cDNA, 反应条件: 42 °C 1 h; 70 °C 15 min; PCR 扩增反应条件: 95 °C 3 min; 98 °C 20 s, 56 °C 15 s, 72 °C 15 s, 共 20 个循环; 72 °C 10 min。使用 PAGE 电泳分离 110~130 bp 范围 PCR 产物, 将分离产物切胶送去深圳华大基因股份有限公司测序,

在 BGISEQ-500 测序仪上完成测序并通过 AASRA.20 分析软件鉴定 miRNA 在内的各种类型小 RNA, 先对每个样品的原始测序数据进行处理, 得到小 RNA 的 tag 序列; 再对 tag 序列进行注释分析, 鉴定 miRNA。

1.2.4 差异 miRNA 的筛选和靶基因的鉴定 差异 miRNA 的筛选: 将各个样品鉴定的 miRNA 进行汇总, 并计算每条 miRNA 的 TPM (tags per million)表达量, 公式为 $TPM=T\times10^6/N$ (T 表示 miRNA 的 tags, N 表示总 miRNA 的 tags), 得到了所有样品的全部 miRNA 的表达谱。差异检验的 P -value 作多重比较检验^[15], 通过控制 FDR 来决定 P -value 的域值^[16]。FDR<0.05, 代表结果有显著性差异。

靶基因的预测和富集: 以马氏珠母贝基因组序列为参考^[17], 获取基因的 CDS 序列和 3'UTR 序列。通过 RNAhybrid (<http://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahyb>)和 miRanda (<http://www.microrna.org/>)来预测差异 miRNA 的靶基因。预测软件的参数如下: RNAhybrid: -b 100 -c -f 2,8 -m 100000 -v 3 -u 3 -e -20 -p 1 -s 3utr_human; miRanda: -en -20 -strict。使用 NR、KEGG、Interpro 数据库为参考对靶基因进行功能注释。以 KEGG 数据库为参考, 以 $Q\ value\leq0.05$ 为阈值, 获得 KEGG 显著性富集的通路。根据通路间的交叉对话关系, 使用 biorender (<https://www.biorender.com/>)绘制外泌体 miRNA 与信号通路中基因的调控网络。

1.2.5 差异表达 miRNA 的验证 取 8 μ L miRNA, 用 miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录获得所需的 cDNA 模板。采用 miRNA 特异性引物(表 1), 参照 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒说明书配置反应体系, 利用 LightCycle 96 荧光定量 PCR 仪进行检测。qRT-PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 15 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 共 45 个循环; 熔解曲线分析 1 个循环: 95 $^{\circ}$ C 10 s, 65 $^{\circ}$ C 60 s, 97 $^{\circ}$ C 1 s; 37 $^{\circ}$ C 30 s。

以 PBS 组为对照, 以 U6 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 miRNA 在实验组和对照组中的相对表达量。采用 T -test 方法, 利用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计学分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 荧光定量引物

Tab. 1 The primers for RT-qPCR

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')
U6-F	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT
miR-8-3p_1	TAATACTGTCAGGTAAAGATGTC
miR-279	TGACTAGATCCACACTCATCC

2 结果与分析

2.1 外泌体的分离和鉴定

使用透射电子显微镜观察发现马氏珠母贝血淋巴外泌体为球形或近似球形的囊泡, 膜结构完整、轮廓清晰(图 1a, 1b), 粒径为 75~150 nm, 其形状与直径符合外泌体的典型特征。PBS 与 poly (I : C)组中分离出的外泌体的平均粒径别为 90.80 nm 与 84.9 nm (图 1c, 1d)。

2.2 血淋巴外泌体的 miRNA 测序和分类注释

PBS 组和 poly (I : C)组分别获得 27247000 和 25620351 条序列, 与马氏珠母贝参考基因组进行比对, 分别有 20505623 条和 21091527 条比对成功, 比对率分别为 75.26%和 82.32%。使用的 GenBank 和 Rfam 数据库对 sRNA 分类注释, 血淋巴外泌体中 sRNA 序列包括 rRNA、miRNA、scRNA、snoRNA、snRNA、tRNA 等, 鉴定得到 PBS 组和 poly (I : C)组中 miRNA 分别为 160452 条和 216826 条, 占比分别为 0.59% (图 2a)和 0.85% (图 2b)。通过与 miRbase 同源比对, 获得已知 miRNA 的成熟体序列 68 条; 通过 RNA 二级结构分析, 获得 27 条新的 miRNA。

2.3 poly (I : C)刺激后血清外泌体差异 miRNA 的筛选

与 PBS 组相比较, poly (I : C)组马氏珠母贝血清外泌体中共有 12 条 miRNA 的表达量存在显著差异($P<0.05$), 包括已知 miRNA 7 条, 新的 miRNA 5 条(表 2, 图 3)。其中, poly (I : C)组显著性上调的 miRNA 有 7 条, 包括已知的 miR-2b_5 和 let-7-5p, 以及新的 miRNA 如 novel_mir1、novel_mir3、novel_mir5 和 novel_mir22。其中 novel_mir5 和 novel_mir22 在 PBS 组中几乎不表达。显著性下调的 miRNA 有 5 条, 包括已知的 miR-279, miR-315a, miR-278-3p 和 miR-8-3p 以及

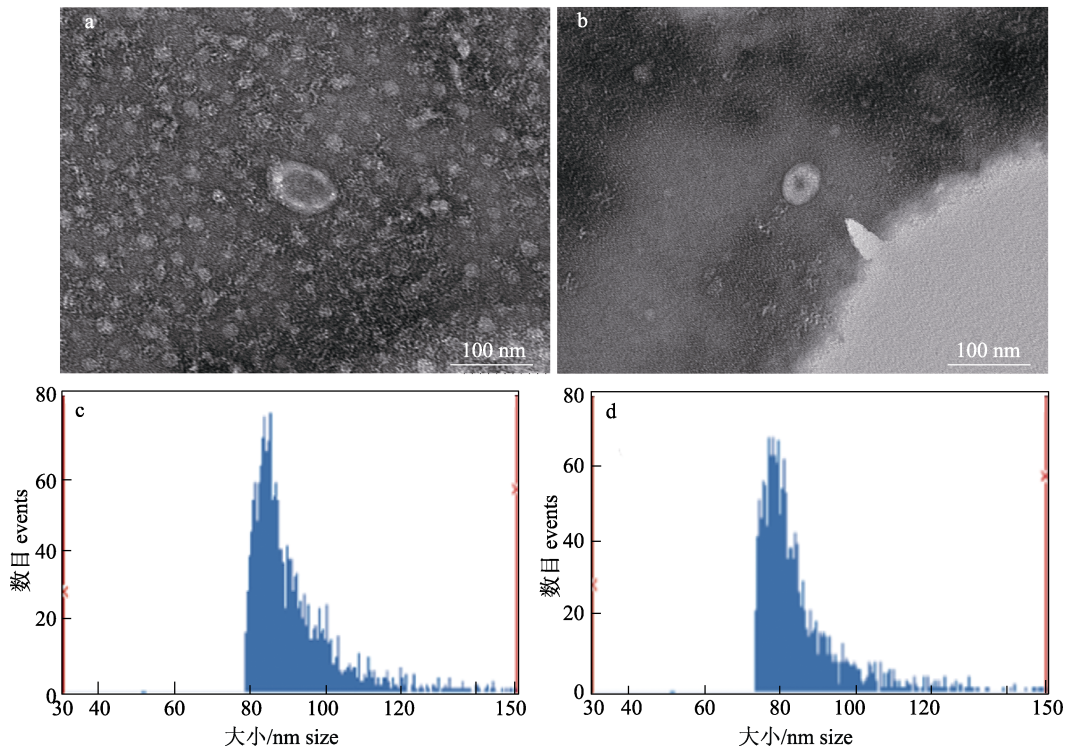


图 1 马氏珠母贝血淋巴外泌体的鉴定

a. PBS 处理组外泌体电镜检测; b. poly (I : C) 处理组外泌体电镜检测;
c. PBS 处理组外泌体粒径;d. poly (I : C) 处理组外泌体粒径.

Fig. 1 Identification of extracellular vesicles from lymphatic fluid of *Pinctada fucata martensii*
a. Electron microscopy detection of extracellular vesicles from the PBS-treated group; b. Electron microscopy detection of extracellular vesicles from the poly (I : C)-treated group; c. Particle size of extracellular vesicles from the PBS-treated group; d. Particle size of extracellular vesicles from the poly (I : C)-treated group.

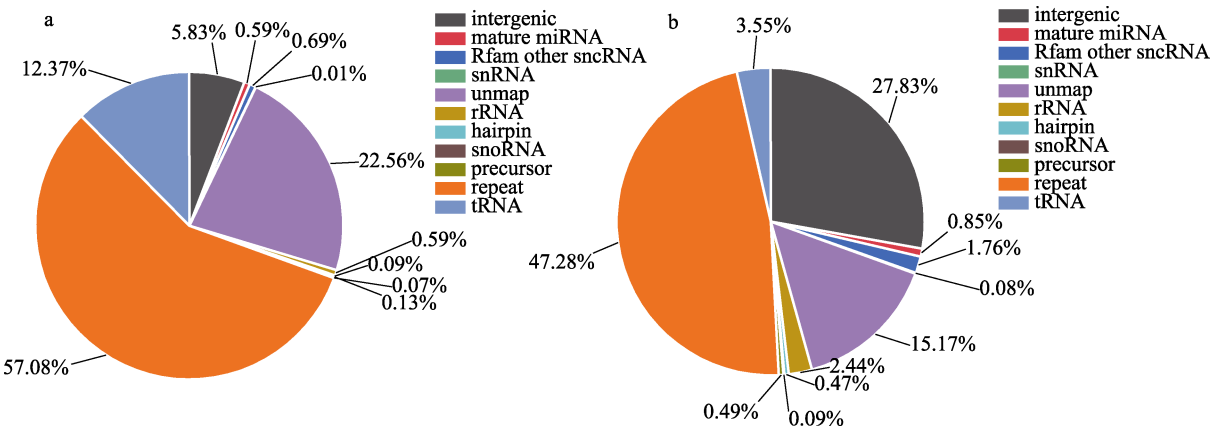


图 2 PBS 组(a)和 poly (I : C)组(b)马氏珠母贝血淋巴外泌体 miRNA 的鉴定

Fig. 2 The identification of miRNAs in the exosomes of the hemolymph of pearl oysters in the PBS group (a) and the poly (I : C) group (b)

1 个新的 miRNA novel_mir2。

2.4 差异表达 miRNA 的验证

本研究选取了在 poly (I : C)与 PBS 组显著性

差异表达的 miR-8-3p_1、miR-279 miRNA 进行 qRT-PCR 验证, 结果显示 miR-8-3p_1、miR-279 均在 poly (I : C)处理组的相对表达量显著低于

表 2 poly (I : C)组与 PBS 组中显著差异表达的 miRNA

Tab. 2 Differentially expressed miRNAs between the poly I : C-treated group and the PBS-treated group			
小 RNA 名称 miRNA id	序列(5'-3') sequence (5'-3')	(polyI_C_12h/PBS_12h) log ₂ 值 log ₂ ratio (polyI_C_12h/PBS_12h)	P 值 P-value
miR-2b_5	TATCACAGCCAGCTTTGATGAGCT	1.916443	0.000157
let-7-5p_4	TGAGGTAGTAGGTTGTATAG	1.853991	9.02E-11
let-7-5p_3	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	1.020338	3.37E-57
novel_mir22	CCUCGUUCAGUUUGGCUGUG	6.609618	4.12E-40
novel_mir3	UGCCCUAUCCGUCAGUCGCGC	3.203433	1.62E-13
novel_mir1	GAGGUCCGGUGAGUCUAGGUUAUC	2.462339	1.45E-122
novel_mir5	GAUGCUCGAACGGCCAUUGCUCGGC	14.335970	1.30E-06
miR-315a	TTTTGATTGTTGCTCAGAAAGCC	-1.524500	4.02E-05
miR-279	TGACTAGATCCACACTCATCC	-1.282650	5.31E-33
miR-278-3p_1	TCGGTGGGACTTTCGTTTCGATT	-1.036950	6.02E-11
miR-8-3p_1	TAATACTGTCAGGTAAAGATGTC	-1.069540	1.96E-39
novel_mir2	AAUUGCACCUGUCCCGGCCUGC	-1.246270	3.46E-07

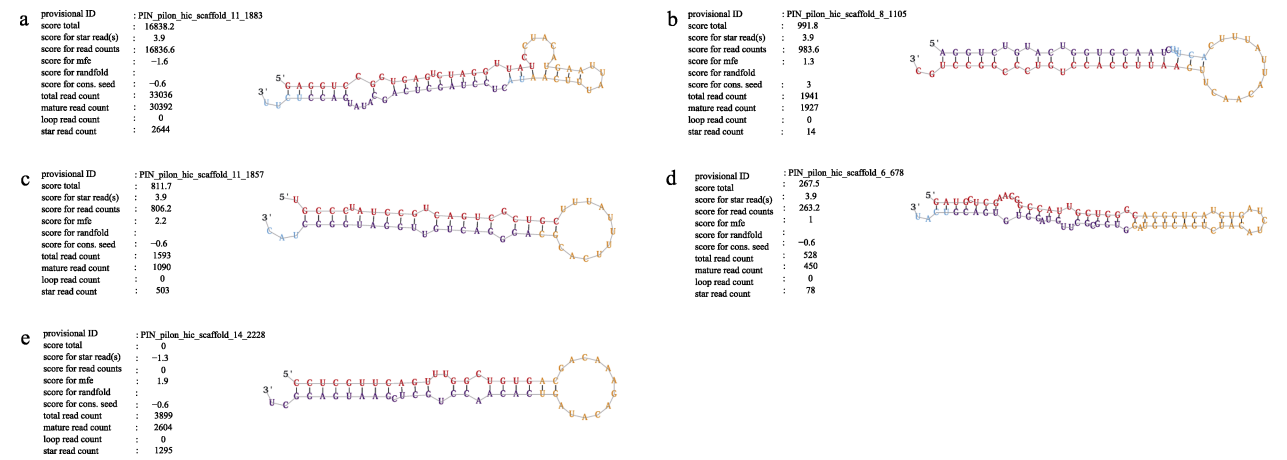


图 3 poly (I : C)和 PBS 组差异表达的 5 个新的 miRNA 前体茎环结构

a. Novel_mir1 前体, b. Novel_mir2 前体, c. Novel_mir3 前体, d. Novel_mir5 前体, e. Novel_mir22 前体.

Fig. 3 Five novel miRNA precursor stem-loop structures differentially expressed in poly (I : C) and PBS groups

a. The novel_mir1 precursor, b. The novel_mir2 precursor, c. The novel_mir3 precursor, d. The novel_mir5 precursor, e. The novel_mir22 precursor.

PBS 组($P<0.05$), 该结果与转录组测序结果一致 (图 4)。

2.5 差异 miRNA 靶基因的筛选和功能富集分析

利用 miRanda 和 RNAhybrid 同时预测 PBS 组和 poly (I : C)组马氏珠母贝血清外泌体差异表达的 miRNA 的靶基因, 共获得 570 个靶标基因。对这些基因进行 KEGG 富集分析, 发现共有 18 条通路被显著性富集($P<0.05$), 包括与免疫相关的信号通路包括“acute myeloid leukemia” “Jak-STAT signaling pathway” 和 “chemokine signaling

pathway”、与代谢相关的“glycerolipid metabolism” “purine metabolism” 和 “arginine and proline metabolism”以及与内分泌相关的“relaxin signaling pathway” “prolectin signaling pathway”和“insect hormone biosynthesis”等信号通路(图 5)。

在免疫相关信号通路中, “Jak-STAT signaling pathway”和“chemokine signaling pathway”两条通路通过 JAK2、PI3K 和 SOS 等发生交叉对话。其中, novel_mir2、novel_mir22、miR-2b_5 等 8 种 miRNA 调控这两个信号通路(图 6), 如 miR-278-

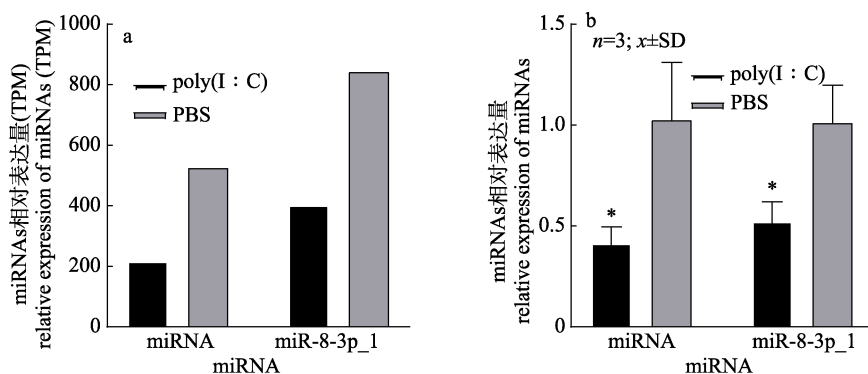


图 4 转录组数据验证

RNA-seq (a)和 qRT-PCR (b)检测获得的 miR-279 和 miR-8-3p_1 的表达量。*代表具有显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 4 Transcriptome data validation

The relative expression levels of miR-279 and miR-8-3p_1 were tested by RNA-seq (a) and qRT-PCR (b).

* indicates significant difference ($P<0.05$).

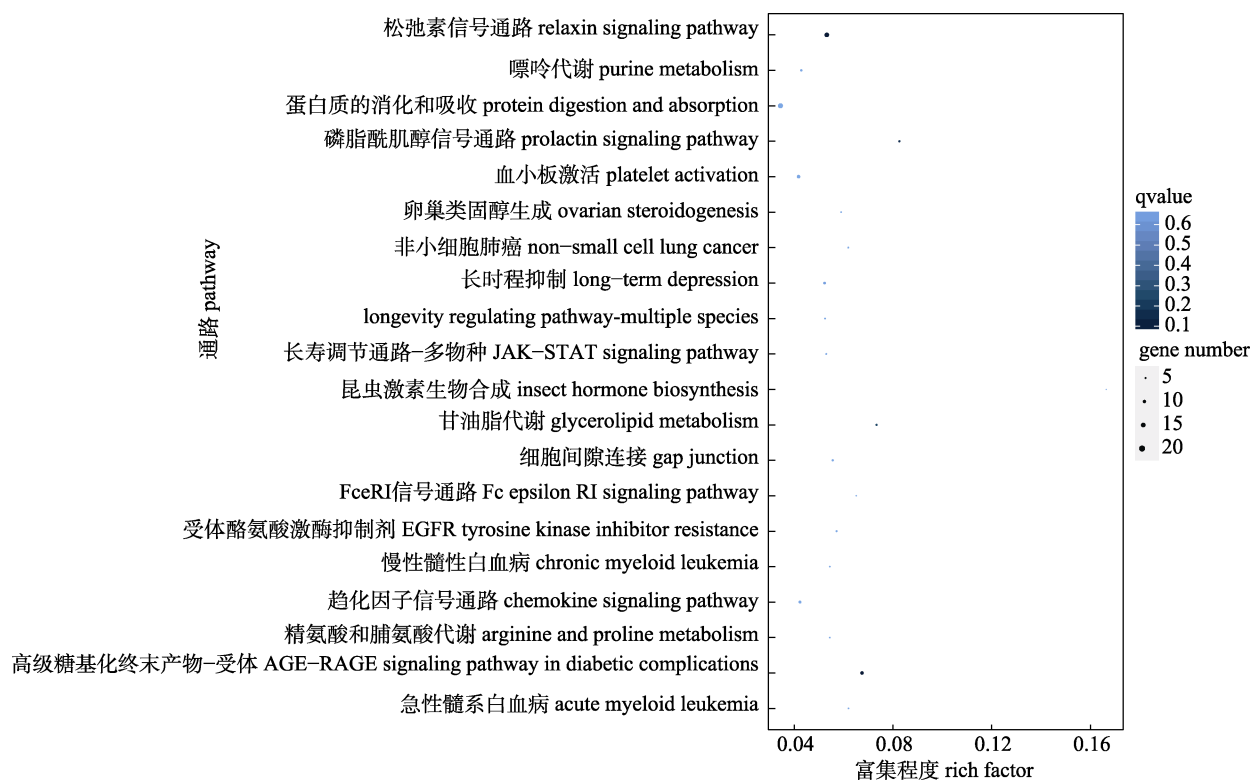


图 5 poly (I:C)组与 PBS 组中差异表达 miRNA 的靶基因 pathway 富集散点图

Fig. 5 Scatter plot of enriched pathways for target genes of differentially expressed miRNAs in poly (I:C) and PBS groups

3p_1 调控磷脂酰肌醇特异性磷脂酶(PLCβ, PIN_scaffold_9_1095), novel_mir3 调控 FOXO (PIN_scaffold_7_1116)。

此外, novel_mir5 与胞质磷脂酶 A2 (PIN_scaffold_8_2110)之间、novel_mir2 与过氧化物酶(SOD, PIN_scaffold_8_0609)之间、miR-2b_5 与 E3 泛素连接酶 Topors (PIN_scaffold_10_0258)和

生长因子 Wnt-4 (PIN_scaffold_4_1182)之间分别存在靶向调控关系(图 7)。

3 讨论

本研究利用 poly (I : C)模拟 RNA 病毒激活马氏珠母贝的免疫应答反应, 同时从血淋巴中成功分离了外泌体并鉴定了外泌体 miRNA。这些外泌

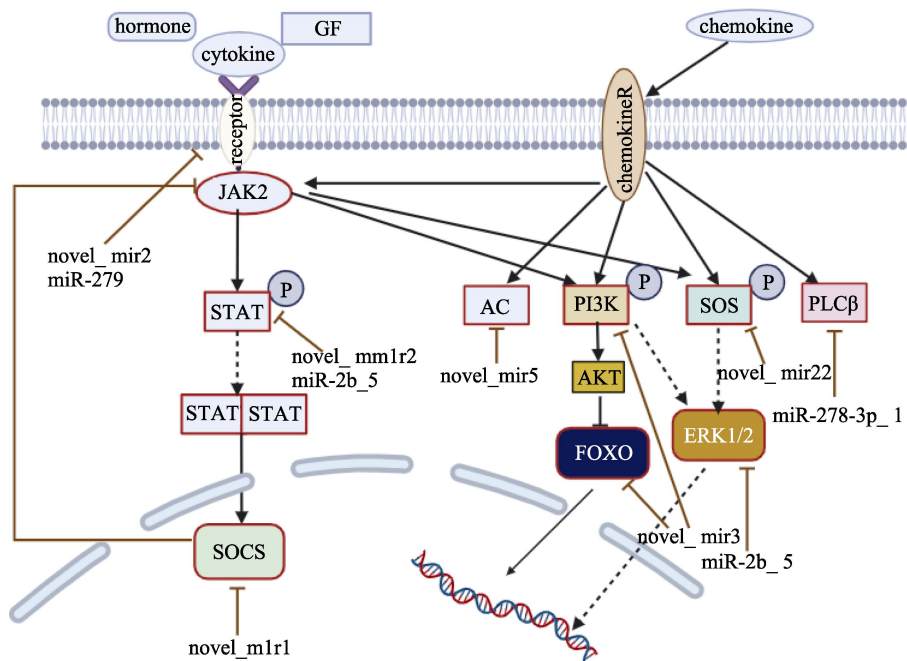


图 6 外泌体 miRNA 与 JAK-STAT 通路和趋化因子信号通路中基因的潜在作用关系
红色框表示 miRNA 调控的靶基因; P 代表磷酸化。

Fig. 6 Potential roles of exosomal miRNAs in relation to genes in the JAK-STAT pathway and chemokine signaling pathway
Red boxes indicate miRNA-regulated target genes; P stands for phosphorylation.

a novel_mir1: 3' cuaUUGAUCUGAGUGGCGUGAG 5' PIN_scaffold_14_0104: 5' gccGACATTGACTCAACGGACCTc 3' Energy: -30.020000 kCal/Mol	f miR-2b_5: 3' tcGAGTAGTTTCG-ACCGACACTAt 5' PIN_scaffold_4_1182: 5' aactTA-CAAGTGTGGCTGTGATa 3' Energy: -30.260000 kCal/Mol	k novel_mir2: 3' cgUCCG-GCCUG-UCCACGUAA 5' PIN_scaffold_3_0341: 5' tcAGGTACAGTGTGGGTGCAATc 3' Energy: -25.700001 kCal/Mol
b novel_mir5: 3' cgGCUUGUACCGGCAAGCUGUAG 5' PIN_scaffold_5_1166: 5' ttCAAGAGCTGGCT-TCCGAGCAtc 3' Energy: -26.049999 kCal/Mol	g miR-2b_5: 3' tcGAG-TAGTTTCGACC--GACACTAt 5' PIN_scaffold_10_0258: 5' agCTCAAGCAGAG--GGAATCTGTGATa 3' Energy: -25.260000 kCal/Mol	l novel_mir22: 3' guGCGGUUGACUGUCUc 5' PIN_scaffold_8_1704: 5' gaCAGCT-GTCTGACAGGg 3' Energy: -28.860001 kCal/Mol
c novel_mir3: 3' cgUCCGUGAGUG-CCUACCCG 5' PIN_scaffold_7_1116: 5' ttAGAGCTGACTTATATAGGCTc 3' Energy: -25.150000 kCal/Mol	h novel_mir5: 3' cgGC-UCGUACCGGCAAGCUGUAG 5' PIN_scaffold_8_2110: 5' ccGTACCGCTGGTGTACGACATc 3' Energy: -28.719999 kCal/Mol	m miR-2b_5: 3' tcgagtaGTT-TCG-ACCGACACTAt 5' PIN_scaffold_9_0779: 5' gacgcccCAACAGCAGGCTGTGATg 3' Energy: -23.350000 kCal/Mol
d miR-278-3p_1: 3' ttaGCTTGCTTTTCAAGGTGGct 5' PIN_scaffold_9_1095: 5' ataTGTTACGGACTTCCACCGa 3' Energy: -27.049999 kCal/Mol	i novel_mir2: 3' cgUC-CGCGGUGUCCACGUAA 5' PIN_scaffold_8_0609: 5' acAGTGTCTGGAT--GTGCAATa 3' Energy: -27.400000 kCal/Mol	n novel_mir3: 3' cgUGGUGAGUCCUACCCG 5' PIN_scaffold_10_2531: 5' tttGTGATG-TGGATAGCGGc 3' Energy: -26.830000 kCal/Mol
e miR-279: 3' ccTACTCACACC--TAGATCAGt 5' PIN_scaffold_10_2908: 5' caGTGAGGGTGGGTATCTAGTca 3' Energy: -25.709999 kCal/Mol	j miR-2b_5: 3' tcGAGTAGTTTCGACCGACACTAt 5' PIN_scaffold_13_0697: 5' ctTCATCATCACTAAGTGTGAtc 3' Energy: -20.730000 kCal/Mol	o miR-8-3p_1: 3' ctGT-AGAAATG-GACTGTCTAATt 5' PIN_scaffold_11_1609: 5' gaCATTCTTTACTCCGACAGTATTt 3' Energy: -22.520000 kCal/Mol

图 7 miRNAs 和靶基因互作位点的预测

a. TIGD4 (PIN_scaffold_14_0104); b. AC (PIN_scaffold_5_1166); c. FOXO (PIN_scaffold_7_1116); d. PLCβ (PIN_scaffold_9_1095); e. IL6R (PIN_scaffold_10_2908); f. Wnt-4 (PIN_scaffold_4_1182); g. TOPORS (PIN_scaffold_10_0258); h. PLA2 (PIN_scaffold_8_2110); i. SOD (PIN_scaffold_8_0609); j. ERK (PIN_scaffold_13_0697); k. DAZ (PIN_scaffold_3_0314); l. SOS (PIN_scaffold_8_1704); m. DDB (PIN_scaffold_9_0779); n. PI3K (PIN_scaffold_10_2531); o. CAT (PIN_scaffold_11_1609).

Fig. 7 The prediction of interaction sites of miRNAs and potential targets

a. TIGD4 (PIN_scaffold_14_0104); b. AC (PIN_scaffold_5_1166); c. FOXO (PIN_scaffold_7_1116); d. PLCβ (PIN_scaffold_9_1095); e. IL6R (PIN_scaffold_10_2908); f. Wnt-4 (PIN_scaffold_4_1182); g. TOPORS (PIN_scaffold_10_0258); h. PLA2 (PIN_scaffold_8_2110); i. SOD (PIN_scaffold_8_0609); j. ERK (PIN_scaffold_13_0697); k. DAZ (PIN_scaffold_3_0314); l. SOS (PIN_scaffold_8_1704); m. DDB (PIN_scaffold_9_0779); n. PI3K (PIN_scaffold_10_2531); o. CAT (PIN_scaffold_11_1609).

体具有典型的盘状结构, 且粒径平均值 90 nm 左右。已知人血清外泌体直径大约 91 nm^[18], 小鼠血清外泌体粒径在 100 nm 左右^[19]。由此可见, 贝类

的外泌体在形态和大小与高等动物基本一致。血液中外泌体携带的 miRNA 在免疫调节中发挥重要的功能, 但血清外泌体的 miRNA 数目远低于

血细胞中的 miRNA 的数目。例如,本研究在血清中共鉴定到了 95 条外泌体 miRNA。而植核免疫后马氏珠母贝血细胞中鉴定到 186 条 miRNAs^[20],近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)血细胞中鉴定到 222 条 miRNA^[21]。虽然血清外泌体 miRNA 含量少,但是其在调节细胞间通讯和免疫反应中发挥关键作用,外泌体 miRNA 的稳定性和它们在体液中的传播能力使它们成为疾病诊断和治疗的潜在生物标志物^[22]。

为了进一步揭示血淋巴外泌体在马氏珠母贝免疫应答中的作用,本研究筛选出了 12 条在 poly (I : C)刺激后差异表达的外泌体 miRNA,并利用 qRT-PCR 证明了 miR-279 和 miR-8-3p_1 等表达量与转录测序结果一致。在果蝇中,miR-8 可以靶向调控 Toll 信号通路来抑制多种免疫基因,以防止免疫活性异常激活,保护宿主免受慢性免疫激活引起的潜在损害^[23]。本研究中, poly (I : C)刺激后 12 h, miR-8-3p_1 发生显著性下调, miR-8-3p_1 与肉碱乙酰转移酶(CAT)存在靶向关系, CAT 是一种关键的代谢途径酶,在能量稳态和脂肪代谢中起着重要作用^[24]。该结果提示在未受到免疫胁迫时,外泌体中的 miR-8-3p_1 可能起到免疫抑制的作用,防止免疫细胞的异常激活,而在 poly (I : C)刺激后 12 h,也就是免疫反应初期,机体降低外泌体中 miR-8-3p_1 的含量,促进马氏珠母贝免疫系统的激活。细胞凋亡是一种细胞程序性死亡过程,在抗病毒免疫中发挥重要作用^[25]。在虾中的研究发现, miR-279 在 z-vad-fmk 处理导致的细胞凋亡抑制组显著性上调并在抑制细胞凋亡中发挥调控作用^[26]。本研究发现在 poly (I : C)刺激后免疫反应初期,马氏珠母贝外泌体中 miR-279 的表达量发生显著性下调,表明机体可能通过降低免疫细胞中 miR-279 的含量激活细胞凋亡,促进免疫细胞的抗病毒免疫反应。此外,马氏珠母贝 miR-2b_5 的表达量发生显著性上调。miR-2 家族是无脊椎动物特有的 miRNA 家族,在埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)中,基孔肯雅病毒(chikungunya virus)感染后会显著性上调 miR-2b 的表达以调控泛素相关修饰因子(URM)来控制病毒复制^[27]。本

研究发现 miR-2b_5 与 E3 泛素连接酶 Topors 存在靶向关系。在脊椎动物中, Topors 是 p53 和拓扑异构酶 I 结合蛋白,可与腺相关病毒(AAV-2) Rep78/68 蛋白相互作用并增强 AAV-2 基因表达^[28]。因此推测,在贝类中可能通过外泌体介导 miR-2b 来调控蛋白泛素化进而调节病毒感染。由此可见,马氏珠母贝外泌体 miRNA 在响应 poly (I : C)的免疫应答中发挥调控作用。

因此,本研究中进一步对 poly (I : C)刺激后外泌体差异表达 miRNA 的靶基因进行功能富集,发现富集到的通路如“platelet activation”“Jak-STAT signaling pathway”和“chemokine signaling pathway”与免疫应答相关。“Jak-STAT signaling pathway”参与细胞增殖、分化、凋亡、免疫应答等多种生理过程, STAT 通路的异常激活与多种疾病有关,包括癌症、自身免疫疾病和慢性感染^[29]。“chemokine signaling pathway”在免疫细胞的迁移、炎症反应、组织修复、肿瘤发展和转移等过程中发挥重要作用,维持着机体的免疫平衡和组织稳态^[30]。“Jak-STAT signaling pathway”和“chemokine signaling pathway”通路均可以通过 STAT 参与细胞生长和免疫反应的调节^[31]。抑制 Jak 表达后,马氏珠母贝的免疫相关基因如 NF- κ B、IKK (I-kappaB kinase)和 IL-17 的表达有明显降低^[32]。细胞因子信号转导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)是一类重要的负反馈调节因子,通过结合 JAK 激酶的特定位点来直接抑制其活性,阻断 JAK-STAT 信号通路的激活^[33]。在珍珠贝中, SOCS 负调节 JAK/STAT 信号系统介导珍珠贝的免疫应答调控^[34]。在本研究中 poly (I : C)组和 PBS 组中差异表达的 novel_mir1 与靶向调控 SOCS 有关,在 poly (I : C)刺激后, novel_mir1 表达量上调,抑制 SOCS 的表达,从而促进 JAK/STAT 信号通路中其他免疫基因的表达。在趋化因子信号通路中, SOS (son of sevenless)和 ERK 通常不直接相互作用, SOS 通过激活 RAS 影响 ERK 的上游激活^[35], ERK 在灯盏花乙素通过 miRNA-7036a 激活的小胶质细胞过程中发挥了抗炎作用^[36]。在本研究中, miR-2b_5 通过抑制 ERK,调节细胞因子的产生和

免疫细胞的活性,从而避免过度的炎症反应。趋化因子信号通路能够与不同信号通路偶联,如 JAK/STAT 信号通路、PI3K 信号通路等,这些信号通路可以介导细胞迁移、生长和转录激活^[37]。PI3K 作为趋化因子刺激细胞迁移的关键介质,能影响 ERK (细胞外信号调节激酶)的活性,进而调控细胞的生长和代谢^[38]。在本研究中 PI3K 受到 novel_mir3 的调控,推测马氏珠母贝受到病毒刺激后,激活 PI3K-Akt 信号通路,从而导致 FOXO 的磷酸化和从细胞核到细胞质的转移,降低其转录活性,novel_mir3 也会通过干扰其 DNA 结合能力直接抑制 FOXO 的活性。有研究表明在病毒感染的环境下,miR-182 过表达能够抑制 FOXO 的表达,增强 IFR7 的转录活性,诱导 I 型干扰素 (IFN-I)和其他炎症因子的表达^[39]。因此结合本研究推测 novel_mir3 可以通过 FOXO 参与马氏珠母贝对病毒的免疫应答。FOXO 除了参与调控免疫细胞的发育和功能外,还参与调节血糖水平,调控脂质和能量的代谢过程^[40]。

外泌体是一种旁分泌途径,可以远距离调控不同组织细胞类群的基因表达。本研究中鉴定到的 miRNA 的靶点除了免疫以外,还显著富集到代谢相关的通路“glycerolipid metabolism”“purine metabolism”和“arginine and proline metabolism”。脂代谢的紊乱与免疫系统异常活化有关,如血清脂肪浓度增加会促进炎症因子的释放^[41],嘌呤核苷酸水平的增加诱导 MICA 的表达调控免疫细胞^[42],精氨酸代谢不仅影响周围免疫细胞行为还参与调节生长过程^[43]。除此之外还有差异基因富集到内分泌相关的信号通路。有研究表明松弛素抑制与炎症相关的基因的转录^[44]。在免疫应答过程中,代谢会影响免疫,内分泌也会影响免疫和生长之间能量的分配。在马氏珠母贝中,机体在生长和免疫间进行了协同调控以保证在病原胁迫下的生存。

综上所述,本研究结果显示,以 poly (I : C)模拟病毒进行免疫刺激,马氏珠母贝血淋巴外泌体中的 novel_mir2、novel_mir22、miR-2b_5、miR-279 等 miRNA 表达量发生显著变化,在“platelet activation”“chemokine signaling pathway”“Jak-STAT signaling pathway”等免疫相关的信号通路

中发挥调控作用,并通过 FOXO 偶联调控代谢影响马氏珠母贝的免疫应答。研究结果为深入研究贝类中外泌体 miRNA 在免疫应答中的作用提供理论基础。

参考文献:

- [1] Makeyev E V, Maniatis T. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs[J]. Science, 2008, 319(5871): 1789-1790.
- [2] Sun J F, Wu X Z. The progress of studies on molluscan hemocyte and its immunological function[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(5): 601-607. [孙敬锋, 吴信忠. 贝类血细胞及其免疫功能研究进展[J]. 水生生物学报, 2006, 30(5): 601-607.]
- [3] Chen H. The regulatory role of miRNA in the environmental stress response of the long oyster[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2017. [陈浩. miRNA 在长牡蛎环境胁迫应答中的调控作用[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2017.]
- [4] Burgos-Aceves M A, Cohen A, Smith Y, et al. A potential microRNA regulation of immune-related genes in invertebrate haemocytes[J]. Science of the Total Environment, 2018, 621: 302-307.
- [5] Yang H, Xu Z T, Guo B Y, et al. Integrated analysis of miRNAome and transcriptome reveals miRNA-mRNA network regulation in *Vibrio alginolyticus* infected thick shell mussel *Mytilus coruscus*[J]. Molecular Immunology, 2021, 132: 217-226.
- [6] Moreira R, Romero A, Rey-Campos M, et al. Stimulation of *Mytilus galloprovincialis* hemocytes with different immune challenges induces differential transcriptomic, miRNomic, and functional responses[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 606102.
- [7] Harding C V, Heuser J E, Stahl P D. Exosomes: Looking back three decades and into the future[J]. Journal of Cell Biology, 2013, 200(4): 367-371.
- [8] Booth A M, Fang Y, Fallon J K, et al. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane[J]. Journal of Cell Biology, 2006, 172(6): 923-935.
- [9] Sha X Q, Ge X Y, Jin Y, et al. Exosomal microRNAs: An emerging player in systemic lupus erythematosus[J]. Acta Physiologica Sinica, 2021, 73(6): 1035-1042. [沙小琪, 葛星宇, 金怡, 等. 外泌体源性 microRNA 在系统性红斑狼疮中的研究进展[J]. 生理学报, 2021, 73(6): 1035-1042.]
- [10] Zhou C F, Wei W F, Ma J, et al. Cancer-secreted exosomal miR-1468-5p promotes tumor immune escape via the immunosuppressive reprogramming of lymphatic vessels[J].

- Molecular Therapy, 2021, 29(4): 1512-1528.
- [11] Xie M Y, Hou L J, Sun J J, et al. Porcine milk exosome MiRNAs attenuate LPS-induced apoptosis through inhibiting TLR4/NF- κ B and p53 pathways in intestinal epithelial cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(34): 9477-9491.
- [12] Gong Y, Kong T T, Ren X, et al. Exosome-mediated apoptosis pathway during WSSV infection in crustacean mud crab[J]. PLoS Pathogens, 2020, 16(5): e1008366.
- [13] Liu L, Gao L, Zhou K L, et al. The expression patterns of exosomal miRNAs in the Pacific oyster after high-temperature stress or *Vibrio* stimulation[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2024, 156: 105174.
- [14] Huang S Q, Nishiumi S, Asaduzzaman M, et al. Exosome-derived small non-coding RNAs reveal immune response upon grafting transplantation in *Pinctada fucata* (Mollusca) [J]. Open Biology, 2022, 12(5): 210317.
- [15] Midway S, Robertson M, Flinn S, et al. Comparing multiple comparisons: Practical guidance for choosing the best multiple comparisons test[J]. PeerJ, 2020, 8: e10387.
- [16] He L, Heyse J F. Improved power of familywise error rate procedures for discrete data under dependency[J]. Biometrical Journal Biometrische Zeitschrift, 2019, 61(1): 101-114.
- [17] Zheng Z, Hao R J, Yang C Y, et al. Genome-wide association study analysis to resolve the key regulatory mechanism of biomineralization in *Pinctada fucata martensii*[J]. Molecular Ecology Resources, 2023, 23(3): 680-693.
- [18] Li Y J, Diao Z Y, Xue P P, et al. Isolation and identification of placental exosomes from maternal serum[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2015, 28(6): 632-636. [李玉静, 刁振宇, 薛平平, 等. 血清中胎盘来源外泌体的分离与鉴定[J]. 医学研究生学报, 2015, 28(6): 632-636.]
- [19] Qiu S T, Zhang H, Shen Y L, et al. Comparison of different extraction methods of mouse serum exosomes[J]. Gansu Animal Husbandry and Veterinary, 2021, 51(3): 39-42. [邱山桐, 张昊, 沈雅丽, 等. 小鼠血清外泌体不同提取方法的比较[J]. 甘肃畜牧兽医, 2021, 51(3): 39-42.]
- [20] Zhang Y T. Screening and functional study of miRNAs related to shell implantation immunity in *Pinctada martensii* [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2021. [张雨婷. 马氏珠母贝植核免疫相关 miRNAs 的筛选与功能研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2021.]
- [21] Zhou Q J, Luo B, Lu L L, et al. Screening of microRNAs related to *Vibrio parahaemolyticus* infection in the Hong Kong giant oyster (*Magallana hongkongensis*)[J]. Journal of Applied Oceanography, 2023, 42(2): 218-224. [周齐家, 罗帮, 陆莉莉, 等. 香港巨牡蛎抗副溶血弧菌感染相关 microRNA 的筛选[J]. 应用海洋学学报, 2023, 42(2): 218-224.]
- [22] Sohn W, Kim J, Kang S H, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2015, 47(9): e184.
- [23] Lee G J, Hyun S. Multiple targets of the microRNA miR-8 contribute to immune homeostasis in *Drosophila*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 45(2): 245-251.
- [24] Chalmers R A, Roe C R, Tracey B M, et al. Secondary carnitine insufficiency in disorders of organic acid metabolism: Modulation of acyl-CoA/CoA ratios by l-carnitine *in vivo*[J]. Biochemical Society Transactions, 1983, 11(6): 724-725.
- [25] Wang L, Zhi B, Wu W L, et al. Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2008, 32(6): 706-715.
- [26] Yang L, Yang G, Zhang X B. The miR-100-mediated pathway regulates apoptosis against virus infection in shrimp[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(1): 146-153.
- [27] Dubey S K, Shrinet J, Jain J, et al. *Aedes aegypti* microRNA miR-2b regulates ubiquitin-related modifier to control chikungunya virus replication[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 17666.
- [28] Weger S, Hammer E, Heilbronn R. Topors, a p53 and topoisomerase I binding protein, interacts with the adeno-associated virus (AAV-2) Rep78/68 proteins and enhances AAV-2 gene expression[J]. Journal of General Virology, 2002, 83(Pt 3): 511-516.
- [29] Rawlings J S, Rosler K M, Harrison D A. The JAK/STAT signaling pathway[J]. Journal of Cell Science, 2004, 117(Pt 8): 1281-1283.
- [30] Keane M P, Strieter R M. Chemokine signaling in inflammation[J]. Critical Care Medicine, 2000, 28(4 Suppl): N13-N26.
- [31] Soldevila G, García-Zepeda E A. The role of the Jak-Stat pathway in chemokine-mediated signaling in T lymphocytes [J]. Signal Transduction, 2007, 7(5-6): 427-438.
- [32] Gu Z F, Cao Y F, Yang H X, et al. Effect of Janus kinase 3 inhibitor on the development of pearl sac and the expression of immune-related genes in pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2020, 40(2): 1-6. [谷泽丰, 曹艳飞, 杨海霞, 等. Janus 激酶 3 抑制剂对马氏珠母贝珍珠囊发育和免疫相关基因表达的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(2): 1-6.]
- [33] Babon J J, Kershaw N J, Murphy J M, et al. Suppression of cytokine signaling by SOCS3: Characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity[J]. Immunity,

- 2012, 36(2): 239-250.
- [34] Liu W G, Huang X D, Wang Q, et al. Gene cloning and function analysis of cytokine-induced suppressor of cytokine signaling (SOCS) from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(3): 849-854.
- [35] Li M Z, Hale J S, Rich J N, et al. Chemokine CXCL12 in neurodegenerative diseases: An SOS signal for stem cell-based repair[J]. Trends in Neurosciences, 2012, 35(10): 619-628.
- [36] Jia W J. Mechanism study of ligustrazine regulating neuroinflammation in microglia via the miR-7036a/MAPT/PRKCG/ERK axis[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2022. [贾文姬. 灯盏乙素经 mir-7036a/MAPT/PRKCG/ERK 轴调控小胶质细胞神经炎症的机制研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2022.]
- [37] Curnock A P, Logan M K, Ward S G. Chemokine signalling: Pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases[J]. Immunology, 2002, 105(2): 125-136.
- [38] Zhu C F, Qi X L, Chen Y N, et al. PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways are involved in IGF-1-induced VEGF-C upregulation in breast cancer[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2011, 137(11): 1587-1594.
- [39] He X. MicroRNA-182 targets FOXO3 to activate type I interferon immune response against human cytomegalovirus in neurons[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2019. [何霞. 神经细胞中 MicroRNA-182 靶向 FOXO3 激活 I 型干扰素免疫应答发挥抗人巨细胞病毒作用[D]. 郑州: 郑州大学, 2019.]
- [40] Dong S Q, Lu Y, Gao F, et al. Research progress of FoxO1 in the mechanisms of glucose and lipid metabolism[J]. Journal of Dalian Medical University, 2021, 43(5): 445-450. [董书琴, 卢宇, 高菲, 等. FoxO1 在糖脂代谢机制中的研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2021, 43(5): 445-450.]
- [41] Ouyang Q. Correlation study of gut microbiota, inflammatory factors and adipokines in children with simple obesity[D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2018. [欧阳倩. 单纯性肥胖儿童肠道菌群、炎症因子及脂肪因子的相关性研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2018.]
- [42] McCarthy M T, Moncayo G, Hiron T K, et al. Purine nucleotide metabolism regulates expression of the human immune ligand *MICA*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(11): 3913-3924.
- [43] Matos A, Carvalho M, Bicho M, et al. Arginine and arginases modulate metabolism, tumor microenvironment and prostate cancer progression[J]. Nutrients, 2021, 13(12): 4503.
- [44] Martin B, Gabris-Weber B A, Reddy R, et al. Relaxin reverses inflammatory and immune signals in aged hearts[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0190935.

Identification of differentially expressed miRNAs in haemolymph exosomes after poly (I : C) stimulation in *Pinctada fucata martensii*

WANG Ping¹, TAN Wanqi¹, REN Ziqi¹, LI Zhiqing¹, ZUO Xian¹, QU Jia¹, WANG Qingheng^{1,2,3,4}, ZHENG Zhe^{1,2,3,4}

1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Guangdong Science and Innovation Center for Pearl Culture, Zhanjiang 524088, China;

3. Guangdong Pearl Cultivation and Processing Engineering and Technology Research Centre, Zhanjiang 524088, China;

4. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Disease Control and Healthy Culture, Zhanjiang 524088, China

Abstract: Exosomal miRNAs are crucial in regulating the immune response of vertebrates. This study explored the function of exosomal miRNAs in the immune response of *Pinctada fucata martensii* by injecting poly(I : C) and PBS into the blood sinuses of the adductor muscle of *P. f. martensii* to stimulate an immune response, followed by the analysis of differentially expressed exosomal miRNAs in the hemolymph. The study aimed to predict their target genes and the immune-related signaling pathways regulated by exosomal miRNAs, providing preliminary insights into their roles in the immune response of *P. f. martensii*. The results showed that the hemolymph exosomes of *P. f. martensii* are spherical or nearly spherical vesicles with intact membrane structures and clear contours, ranging in size from 75 nm to 150 nm. A total of 101 miRNAs were identified in the PBS and poly(I : C) groups, of which 76 were known miRNAs. In the poly(I : C) group, seven miRNAs were significantly upregulated, and five miRNAs were significantly downregulated compared to the PBS group. These differential miRNAs were associated with 570 target genes. KEGG enrichment analysis identified immune-related signaling pathways, including “Acute myeloid leukemia” “JAK-STAT signaling pathway” and “Chemokine signaling pathway” metabolism-related pathways such as “Glycerolipid metabolism” “Purine metabolism” and “Arginine and proline metabolism,” as well as endocrine-related pathways such as “Relaxin signaling pathway” “Prolactin signaling pathway” and “Insect hormone biosynthesis” ($P < 0.05$). Notably, eight miRNAs, including novel_mir2, novel_mir22, miR-2b_5, and miR-279, were found to regulate immune-related signaling pathways and influence the immune response of *P. f. martensii* by modulating metabolism through FOXO coupling. This study suggests that hemolymph exosomal miRNAs in *P. f. martensii* coordinately respond to poly(I : C) stimulation by regulating immune, metabolic, and endocrine processes, providing foundational data for further research into the roles of exosomal miRNAs in the immune response of shellfish.

Key words: *Pinctada fucata martensii*; poly (I : C); immune response; exosomes; microRNA.

Corresponding author: ZHENG Zhe. E-mail: haidazhengzhe@163.com