

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16221

副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化酶活性和基因表达的影响

赵伟^{1,3}, 王雷^{1,2}, 刘梅^{1,2}, 蒋克勇^{1,2}, 齐灿灿^{1,2}, 杨广³, 王宝杰^{1,2}

1. 中国科学院 海洋研究所, 中国科学院实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071;
3. 天津农学院 水产学院, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384

摘要: 为了研究致病性副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肝胰腺抗氧化酶活性及相关基因表达的影响, 本研究选取始体重(2.20 ± 0.24) g 的健康凡纳滨对虾初 270 尾, 将其随机分为 2 组, 分别以 0 CFU/mL 和 5×10^7 CFU/mL 剂量的致病性副溶血弧菌对凡纳滨对虾进行浸浴攻毒实验。在实验第 6 小时、12 小时、24 小时和 36 小时取肝胰腺, 进行抗氧化酶活性及免疫相关基因表达测定。结果显示, 感染副溶血弧菌后, 实验组对虾肝胰腺中超氧化物歧化酶(SOD)活性显著高于对照组($P < 0.05$), 而过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和谷胱甘肽-S 转移酶(GST)活性随感染时间的增加呈现先上升后下降的趋势, CAT 活性于第 12 小时达到最大值, 而 GSH-PX 和 GST 分别在第 6 小时和第 24 小时达到最大值, 此结果表明副溶血弧菌感染对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化酶活性有显著影响, 对其机体免疫防御系统有明显的破坏作用。Rab 蛋白基因(*Rab*)和干扰素- α 联合应用诱导细胞凋亡相关基因(*Grim-19*)表达水平显著高于对照组($P < 0.05$), 抗菌肽 crustin 和酚氧化酶原基因(*ProPO*)的表达水平呈现先升高后降低趋势, 分别在第 12 小时和第 24 小时达到最大值, 分别为 11.4 倍和 28.2 倍, 而 GST 基因表达水平在第 12~36 小时显著低于对照组($P < 0.05$)。mTOR 信号通路中真核细胞启动因子 4E 结合蛋白(*4EBP*)基因的表达水平显著高于对照组($P < 0.05$), 真核细胞翻译启动因子 1(*eIF4E1A*)和真核细胞翻译启动因子 2(*eIF4E2*)基因的表达水平呈现先升高后降低的趋势, 分别在第 12 小时和第 6 小时达到最大值, 分别为 2.6 倍和 1.6 倍, 核糖体 S6 蛋白激酶基因(*P70s6k*)的表达水平显著低于对照组($P < 0.05$)。上述结果表明, 凡纳滨对虾感染致病性副溶血弧菌后, 肝胰腺抗氧化酶活性及免疫相关基因的表达均受到显著影响。

关键词: 凡纳滨对虾; 副溶血弧菌; 肝胰腺; 抗氧化酶; 基因表达

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1261-10

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是目前世界养殖产量最高的对虾种类之一, 具有生长周期短、繁殖力强、成活率高、环境抗逆能力强、便于活虾运输等优点^[1]。20 世纪 80 年代末由南美洲引入中国后, 现在普遍于各沿海和内陆地区养殖并且成为中国水产养殖经济的重要支柱产业。随着养殖规模的不断扩大和集约化程度的不断提高, 暴发性疾病也随之而来, 如急性肝胰腺坏死病(AHPND)、肝胰腺微孢子虫病(HPM)、白斑病

(WSD)、黄头病(YHD)、桃拉病(TSV)、早期死亡综合征(EMS)等, 给中国乃至全球水产养殖经济带来了巨大的损失^[2]。

弧菌病是由弧菌属细菌引起的一类细菌性疾病, 当养殖水环境恶化, 会引起对虾免疫机能失常或组织损伤, 降低了对入侵病原体的防御能力, 严重时造成死亡^[3]。弧菌病不仅给对虾养殖业造成严重经济损失, 还对海水鱼类和贝类等海水动物造成严重危害^[4]。人类通过进食被弧菌感染的

收稿日期: 2016-12-15; 修订日期: 2017-02-20.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2015BAD17B03); 山东省科技重大专项(2015ZDZX05002).

作者简介: 赵伟, 硕士, 研究方向为水产动物疾病与免疫学. E-mail: zwtjnxysc@163.com

通信作者: 王宝杰, 助理研究员, 研究方向水产动物营养与免疫学. E-mail: wangbaojie@qdio.ac.cn

海洋生物会引起严重的肠胃炎疾病,严重时甚至可危害生命安全^[5]。哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)等是主要危害对虾的致病性弧菌^[6]。自 2009 年以来,EMS 在世界对虾养殖地区大面积暴发,造成了对虾养殖业重大经济损失,到目前为止,对于该病仍未确定真正的病原菌和十分有效的防控措施^[7]。而有研究发现,在患病对虾肝胰腺中有大量弧菌存在,经分离鉴定为副溶血弧菌和哈维弧菌^[4]。因此,本研究在已有副溶血弧菌对水产动物影响研究的基础上,测定了致病性副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化酶活性及免疫相关基因的表达,与目前针对凡纳滨对虾的非特异性免疫多集中在研究病菌侵染后机体免疫因子的变化不同,本研究首次探究了副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺 mTOR 信号通路的调控,以期对对虾健康养殖和病害防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

凡纳滨对虾由青岛瑞滋海珍品发展有限公司提供,随机挑选健康无病、规格均一的对虾,初始体重(2.20±0.24) g,将凡纳滨对虾暂养在水族箱中 1 周后开始实验。

1.2 感染实验

实验采取浸浴攻毒的方式,经预实验后,设计 0 CFU/mL 的对照组和 5×10^7 CFU/mL 实验组,每组设 3 个平行样。

实验在 100 L 白色塑料桶中进行,实验用水为砂滤后的天然海水,盐度 30。每箱放虾 45 尾。按照体重的 5% 投喂饲料。每天分别在 8:00、14:00、19:00 各投喂 1 次。水温平均为(28±1.0)℃,水中溶氧量≥6 mg/L, pH 8.0±0.5。

致病性副溶血弧菌由中国水产科学院黄海水产研究所莫照兰研究员惠赠。

1.3 基因表达测定

分别在第 6 小时、12 小时、24 小时和 36 小时取对照组和实验组的凡纳滨对虾样品,每个平行取 2 只虾,将肝胰腺完整分离后,取米粒大小的组织保存于多管 RNA 组织样本保存液中,4℃

冰箱过夜,然后将样品冷冻于-80℃冰箱保存备用。

RNA 的提取:按照 RNA 提取试剂盒(TaKaRa)的说明书进行。

RNA 的反转:利用 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Kit (全式金生物科技有限公司),按其说明书进行。

基因表达测定所用引物见表 1。

表 1 本研究所用的引物及序列
Tab. 1 Primer sequences used in this study

基因 gene	引物序列(5'→3') primer(5'→3')	来源 sources
<i>β-actin</i>	F-GCCCATCTACGAGGGATA R-GGTGGTCTGTGAAGGTGTAA	[8]
<i>Rab</i>	F-GACAGTGGTGTGGAAAG R-GCCGTCTAGTTCATTGTTCG	[9]
<i>Grim-19</i>	F-TGTTGAAGGCTGGGAAGTTG R-AGAGTGAGTGTCTGTGAAGGAA	[10]
<i>crustin</i>	F-CGGAGTAGGTGTTGGTGGTGGTT R-CTCGCAGCAGTAGGCTTGAC	[8]
<i>GST</i>	F-CCAGACTACGACAAGAGCGAATG R-TAGGCCAGGAAGTCGATGTAGG	[11]
<i>ProPO</i>	F-CGGTGACAAAGTTCCTCTTC R-GCAGGTCGCCGTAGTAAG	[8]
<i>4EBP</i>	F-ATGTCTGCTTCGCCCGTCGCTCGCC R-GGTTCTTGGGTGGGCTCTT	[12]
<i>P70s6k</i>	F-GCAAGAGGAAGACGCCATA R-CCGCCCTTGCCCAAAACCT	本研究 this study
<i>eIF4E1A</i>	F-TCCCTTTCCCTAACCCCTCA R-GTTTTGCTGTCTCGCTTCC	[12]
<i>eIF4E2</i>	F-TGGAATCAAACCTATGTGGG R-GTCCTCCTGGAAGCGTA	[12]

实时定量 PCR(qPCR):参照说明书利用 TransStar Top Green qPCR PCR Supermix(全式金生物科技有限公司)进行相关基因表达的测定。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法对基因表达数据进行处理。

1.4 免疫酶活性测定

分别在攻毒后 6 h、12 h、24 h 和 36 h 取对虾肝胰腺,每个平行取 3 只,每组样品共 9 只对虾混样,-80℃保存,用于超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽-S 转移酶(GST)活性的测定。酶活测定按照试剂盒(南京建成)说明书进行。

1.5 统计分析

数据均采用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。用 SPSS 18.0 统计软件中的单因素变量方差分析方法(one-way ANOVA)对数据进行统计学分析。 $P < 0.05$ 代表差异显著。

2 结果与分析

2.1 副溶血弧菌对凡纳滨对虾存活率的影响

凡纳滨对虾感染副溶血弧菌 6 h 时出现反应症状, 并开始出现死亡现象, 12 h 的累积存活率达 80%。感染 24 h 后, 实验组对虾活力减弱、反应迟钝、摄食量减少, 出现大量死亡, 累积存活率为 44%。濒临死亡的对虾肌肉呈乳白状, 部分对虾肝胰腺有轻微糜烂现象, 呈现灰白色。对照组对虾则活力正常、摄食积极, 未出现大量死亡。

表 2 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后累计存活率
Tab. 2 Accumulative survival rate of *Litopenaeus vannamei* after *Vibrio parahaemolyticus* challenge
%; n=3; $\bar{x} \pm \text{SD}$

组别 group	感染后时间/h hours after infected			
	6	12	24	36
对照组 control group	98.7±0.05 ^a	98.7±0.05 ^a	94.6±0.31 ^a	94.6±0.31 ^a
实验组 treatment group	91.1±0.02 ^b	80.0±0.22 ^b	44.0±0.22 ^b	31.1±0.34 ^b

注: 同列数据上标不同表示存在显著性差异($P<0.05$)。
Note: Different letters in the same row mean significantly different at 0.05 level.

2.2 副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺免疫酶活性的影响

2.2.1 超氧化物歧化酶 实验期间, 实验组凡纳滨对虾肝胰腺 SOD 活力均显著高于对照组 ($P<0.05$), 在第 6 小时达到最大值 23.53 U/mg。

2.2.2 过氧化物酶 实验期间, 实验组凡纳滨对虾肝胰腺 CAT 活力随浸浴攻毒时间的增加呈现先升高后降低的趋势, 在第 4 小时达到最大值 6.81 U/mg, 而在第 36 小时下降至与对照组相近水平。

2.2.3 谷胱甘肽-S 转移酶 实验期间, 实验组凡纳滨对虾肝胰腺 GST 活力随浸浴攻毒时间的增加呈现先升高后降低的趋势, 在第 24 小时达到最大值 12.97 U/mg, 而在第 36 小时显著低于对照组 ($P<0.05$)。

2.2.4 谷胱甘肽过氧化物酶 实验期间, 实验组凡纳滨对虾肝胰腺 GSH-PX 活力呈现先升高后下降的趋势, 在第 6 小时显著上调 ($P<0.05$), 达到最大值 17.74 活力单位, 而在第 12 小时、24 小时和 36 小时显著低于对照组 ($P<0.05$)。

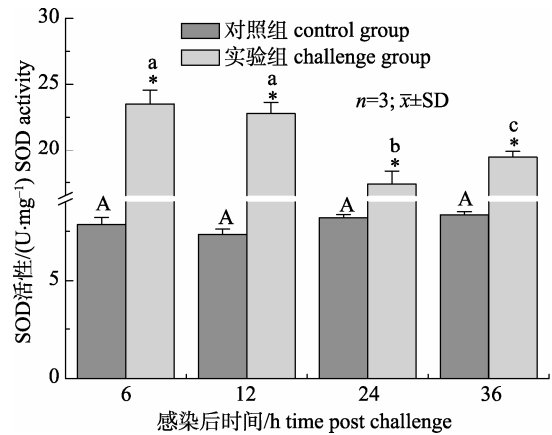


图 1 副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺超氧化物歧化酶活性的影响
大写字母表示对照组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$); 小写字母表示实验组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$); “*”代表各时间点对照组和实验组之间显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 1 SOD activity of *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas after *Vibrio parahaemolyticus* challenge
Capital letters indicate significant differences between the control group at each time point ($P<0.05$); lowercase letters indicate significant differences between the experimental group at each time point ($P<0.05$); “*” indicates significant differences between the control group and the experimental group at each time point ($P<0.05$).

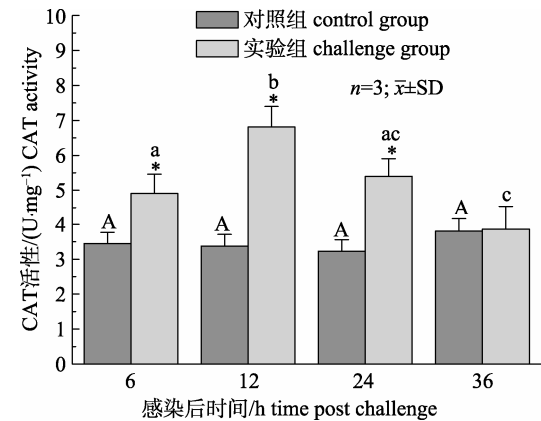


图 2 副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺过氧化物酶活性的影响
大写字母表示对照组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$); 小写字母表示实验组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$); “*”代表各个时间点对照组和实验组之间的显著性差异 ($P<0.05$)。

Fig. 2 CAT activity of *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas after *Vibrio parahaemolyticus* challenge
Capital letters indicate significant differences between the control group at each time point ($P<0.05$); lowercase letters indicate significant differences between the experimental group at each time point ($P<0.05$); “*” indicate significant differences between the control group and the experimental group at each time point ($P<0.05$).

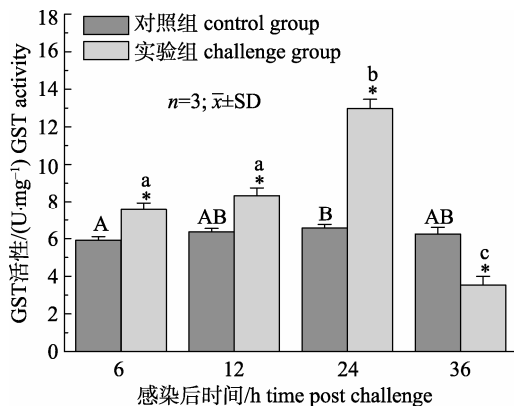


图 3 副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺谷胱甘肽-S 转移酶活性的影响

大写字母表示对照组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$);小写字母表示实验组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$);“*”代表各个时间点对照组和实验组之间的显著性差异($P<0.05$).

Fig. 3 GST activity of *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas after *Vibrio parahaemolyticus* challenge
Capital letters indicate significant differences between the control group at each time point ($P<0.05$); lowercase letters indicate significant differences between the experimental group at each time point ($P<0.05$); “*” indicate significant differences between the control group and the experimental group at each time point ($P<0.05$).

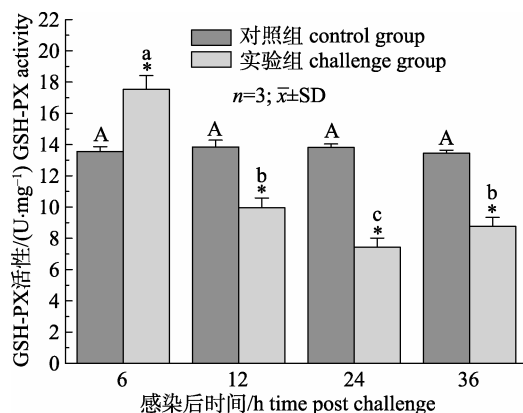


图 4 副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺谷胱甘肽过氧化酶活性的影响

大写字母表示对照组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$);小写字母表示实验组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$);“*”代表各个时间点对照组和实验组之间的显著性差异($P<0.05$).

Fig. 4 GSH-PX activity of *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas after *Vibrio parahaemolyticus* challenge
Capital letters indicate significant differences between the control group at each time point ($P<0.05$); lowercase letters indicate significant differences between the experimental group at each time point ($P<0.05$); “*” indicate significant differences between the control group and the experimental group at each time point ($P<0.05$).

2.3 副溶血弧菌对凡纳滨对虾营养和免疫相关基因表达的影响

2.3.1 肝胰腺中免疫相关基因的表达 与对照组相比,实验组对虾肝胰腺中 *Rab* 和 *Grim-19* 基因在浸浴攻毒期间表达水平均显著高于对照组 ($P<0.05$); *ProPO* 和 *crustin* 基因表达水平呈现先上升后下降的趋势,分别在第 24 小时和 12 小时上调幅度最大,为对照组的 28.2 倍和 11.4 倍; *GST* 基因在第 12~36 小时表达水平均显著低于对照组 ($P<0.05$)。

2.3.2 肝胰腺中营养相关基因的表达 与对照组相比,实验组对虾肝胰腺中 *P70s6k* 基因的表达水平在浸浴攻毒期间均低于对照组,而在第 12 小时和第 24 小时显著低于对照组 ($P<0.05$),在第 24 小时下调幅度最大,仅为对照组的 0.41 倍; *4EBP* 基因在浸浴攻毒期间表达水平均显著高于对照组 ($P<0.05$),在第 36 小时上调幅度最大,为对照组的 28.52 倍; *eIF4E1A* 和 *eIF4E2* 基因的表达水平呈现先上升后下降的趋势, *eIF4E1A* 基因在第 12 小时上调幅度最大,为对照组的 11.40 倍,而在第 24 小时和第 36 小时显著低于对照组 ($P<0.05$), *eIF4E2* 基因在第 6 小时上调幅度最大,为对照组的 1.65 倍,而在第 36 小时显著低于对照组 ($P<0.05$)。

3 讨论

2010 年以来,对虾早期死亡综合征(EMS)在中国大面积暴发,造成了对虾养殖业的重大经济损失。发病对虾肝胰腺异常肿大,质地松软弥散,颜色呈淡白色或淡黄色,感染后期甚至出现萎缩坏死,因此也给予了该病另一个名称——“急性肝胰腺坏死综合征”^[13]。该病的病情发展十分迅速,死亡率极高。有研究表明副溶血弧菌是 EMS 致病菌之一^[4],因此研究副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺损伤机制的研究具有重要意义。

呼吸暴发是甲壳动物对抗微生物(细菌、真菌、病毒等)入侵的一种重要防御策略,它发生迅速而且短暂,能够产生大量的活性氧(ROS)^[14]。当副溶血弧菌侵入凡纳滨对虾体内时,会激发对虾天然免疫系统,产生 ROS 以对抗弧菌的入侵,虽

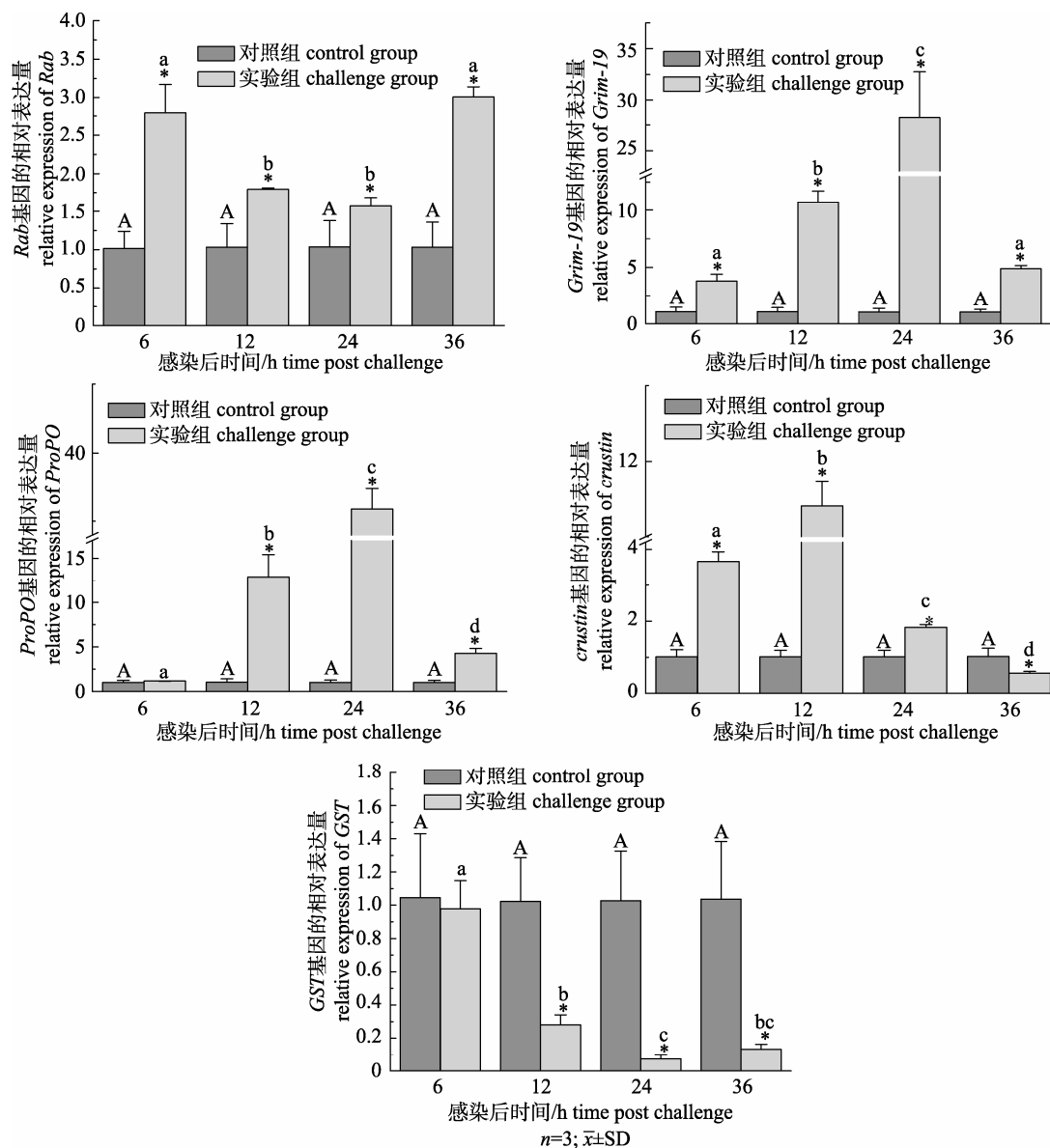


图 5 副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺中免疫相关基因表达的影响

大写字母表示对照组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$); 小写字母表示实验组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$);

“*”代表各个时间点对照组和实验组之间的显著性差异($P<0.05$).

Fig. 5 Relative expression of immune-related genes in the hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* after *Vibrio parahaemolyticus* challenge

Capital letters indicate significant differences between the control group at each time point ($P<0.05$); lowercase letters indicate significant differences between the experimental group at each time point ($P<0.05$); “*” indicate significant differences between the control group and the experimental group at each time point ($P<0.05$).

然释放 ROS 是甲壳动物对抗微生物感染的重要防御机制,但是产生过量会导致细胞损伤,而大多数细胞具有酶促体系,能够清除 ROS 和维护细胞氧化还原平衡,阻止或修复氧化损伤^[15]。肝胰腺被认为是甲壳动物最主要的免疫器官,是产生清除病原菌的免疫防御分子的主要场所,也是 ROS 产生和释放的中心^[16-17]。本研究测定了肝胰

腺 SOD、CAT、GST 和 GSH-PX 的活性,结果显示, SOD 在攻毒期间活性均显著高于对照组, CAT、GST 和 GSH-PX 活性呈现先升高后降低的趋势,而 GST 基因的表达水平也呈下降趋势。与 Duan 等^[15]的研究结果相似,其研究发现中国对虾在副溶血弧菌浸浴攻毒后,肝胰腺中 SOD 和 GST 活性在第 1.5 小时显著升高,而在第 12~

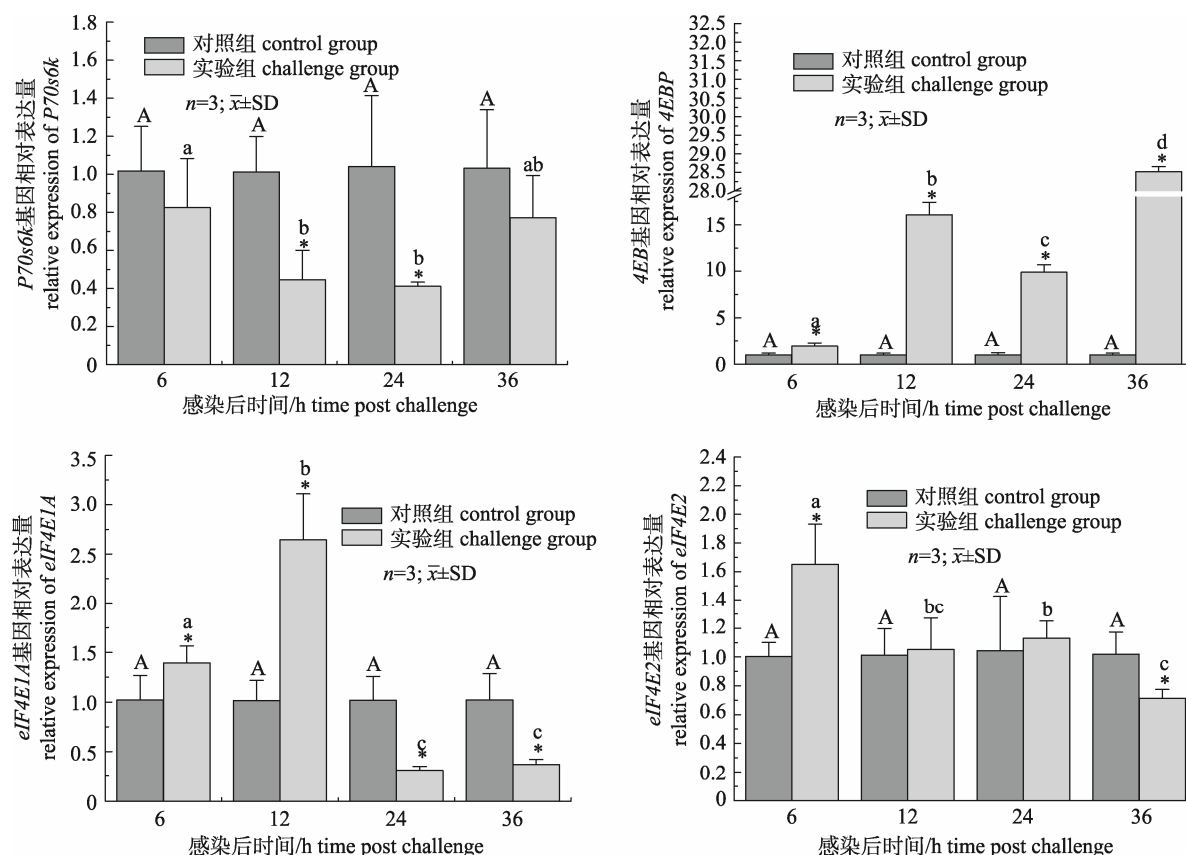


图 6 副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺中营养相关基因表达的影响

大写字母表示对照组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$); 小写字母表示实验组各个时间点之间的显著性差异($P<0.05$);

“*”代表各个时间点对照组和实验组之间的显著性差异($P<0.05$).

Fig. 6 Relative expression of nutrition-related genes in the hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* after *Vibrio parahaemolyticus* challenge

Capital letters indicate significant differences between the control group at each time point ($P<0.05$); lowercase letters indicate significant differences between the experimental group at each time point ($P<0.05$); “*” indicate significant differences between the control group and the experimental group at each time point ($P<0.05$).

48 小时显著低于对照组, GSH-PX 活性在第 12 小时显著升高, CAT 活性在第 12 小时和 24 小时显著低于对照组。张萌萌等^[18]研究表明, 感染了溶藻弧菌的日本对虾, 肝胰腺中 SOD 活性在第 6~12 小时有一个上升的过程, 但之后随时间的延长呈现下降趋势。本研究结果与上述的研究结果相同, 机体被副溶血弧菌感染前期, 肝胰腺中 SOD、CAT、GST 和 GSH-PX 的活性均显著高于对照组, 表明在副溶血弧菌侵入机体后, 机体产生天然免疫应答反应, 激活酶促体系, 机体抗氧化系统起到了清除机体多余 ROS 的作用; 而随感染时间的增加, GST、GSH-PX 和 CAT 活性的降低, 可能是由于产生了多余的 ROS, 造成细胞生理机能严重破坏, 降低了机体的抗氧化防御能力^[19-20]。

Rab 蛋白是内膜系统的重要组成部分, 存在于内质网、高尔基体、核内体和溶酶体等位置, 在生长和分化、形态发生、细胞分裂和运动、胞质分裂和囊泡运输等生物过程中起到了重要作用^[21-22]。最近有研究发现, Rab 在细胞吞噬体的形成、成熟以及在机体先天免疫中, 对清除外来病原菌起到了重要作用^[23]。本研究结果显示, 凡纳滨对虾被副溶血弧菌感染后, 肝胰腺中 Rab 基因的表达水平显著高于对照组, 与 Ren 等^[24]研究结果一致, 其研究发现哈维弧菌和白斑病毒病毒感染中国对虾后, 肝胰腺中 Rab 基因的表达水平显著上调。Huang 等^[25]研究显示, 罗氏沼虾被白斑综合征病毒和副溶血弧菌感染后, 肝胰腺中 Rab 基因表达量均有显著变化。以上研究结果表明, Rab 基因参

与了机体抗细菌和病毒等先天免疫过程。*Grim-19* 是一种与细胞死亡调控相关的基因, 在细胞凋亡、线粒体呼吸链和免疫反应中起到了重要作用^[26-27]。本研究结果显示, *Grim-19* 基因的表达水平在浸浴攻毒期间均显著高于对照组, 与 Peng 等^[10] 研究结果相似, 其研究结果显示注射 8×10^9 CFU/mL 溶藻弧菌的凡纳滨对虾, 肝胰腺中 *Grim-19* 基因的表达水平在第 1.5 小时下调, 而在第 12 小时显著上调。现有研究表明, *Grim-19* 基因的表达促进细胞凋亡, 且 *Grim-19* 基因的表达会抑制 *STAT3* 基因的表达, 从而抑制了 JAK/STAT 免疫信号通路^[28]。因此可以将 *Grim-19* 基因表达水平变化作为机体损伤的参考指标。在对虾等低等无脊椎动物中, Crustin 是一类具有广谱抗菌活性的抗菌肽, 是抵御病原感染的重要体液因子之一, 它还可以通过调节信号转导和细胞因子的产生和释放参与免疫调节机制^[29]。Wang 等^[30] 研究结果显示, 在注射了 1.2×10^9 cell/mL 鳗弧菌 1 h 后, 对虾 *crustin* 的表达水平显著升高, 而在第 6~24 小时表达水平下降。Zhang 等^[19] 研究发现, 感染副溶血弧菌的拟穴青蟹 *crustin* 的表达水平显著高于对照组。而 Vargas-Albores 等^[31] 研究显示凡纳滨对虾被溶藻弧菌感染后 *crustin* 表达水平显著下调。由此可见, 不同物种、不同类型的刺激和不同类型 *crustin* 基因的表达趋势存在很大差别。本研究结果显示, 副溶血弧菌对凡纳滨对虾攻毒后, 在第 6~24 小时 *crustin* 表达水平均显著高于对照组, 而在第 36 小时表达水平下降。感染副溶血弧菌后, 凡纳滨对虾肝胰腺中 *crustin* 基因的表达水平有显著变化, 这表明 *crustin* 基因在对虾抗菌的非特异性免疫过程中发挥了作用, 可以作为病原侵染前期的参考指标。酚氧化酶原系统是甲壳动物最重要的免疫反应体系, 其 PO 活力的强弱与机体的免疫力直接相关, 可作为衡量甲壳动物免疫功能大小的指标之一^[32]。本研究结果显示, 实验组中 *ProPO* 的表达量在第 12~36 小时均显著高于对照组, 但呈现先升高后降低的趋势, 与王丹丽等^[33] 研究结果相似, 其研究发现注射了白斑病病毒的凡纳滨对虾肝胰腺中 *ProPO* 表达水平在第 24 小时显著高于空白组, 随着感染时间延长 *ProPO* 基因表达水

平呈下降趋势。这表明 *ProPO* 基因在对虾抗病原菌和毒素的非特异性免疫过程中发挥了作用, 可以作为病原菌和毒素侵染前期的参考指标。本研究结果表明, 副溶血弧菌侵入机体后, 与吞噬机能相关的 *Rab* 基因表达水平显著升高, 作为对虾先天免疫过程中重要一环的吞噬防御作用在机体清除弧菌侵入的过程中起到了重要作用; *crustin* 和 *ProPO* 基因的表达水平下降, 对虾的抗菌能力和免疫机能受到抑制; 而与细胞死亡相关基因 *Grim-19* 表达水平升高, 促进了细胞凋亡, 且其可抑制了 JAK/STAT 免疫信号通路, 从而破坏了对虾对弧菌侵入的免疫防御能力。

mTOR 信号通路整合了细胞外生长因子、营养以及环境胁迫等的压力信号, 通过胞内信号传递, 在蛋白和脂质的合成以及细胞自体吞噬过程起着决定性的调控作用, 而其主要是通过调节下游 2 个重要的蛋白 4EBP 和 P70s6k 来实现的^[34-35]。本研究结果显示, *4EBP* 基因在实验期间表达水平均显著高于对照组, 而 *P70s6k* 基因表达水平均显著低于对照组, *eIF4E1A* 和 *eIF4E2* 基因的表达水平随攻毒时间的增加而呈现先上升后下降的趋势, 表明凡纳滨对虾被副溶血弧菌侵染后, mTOR 信号通路显著受到抑制, 与其他研究发现毒素会显著抑制 mTOR 信号通路结果相似^[36-37], 这可能是由于弧菌与毒素破坏了机体的免疫机能, 产生了多余的 ROS, 抑制 mTOR 信号通路、诱导细胞死亡^[38-39]。同时, mTOR 通路的抑制在一定程度上促进了促炎因子的产生, 炎症因子也会对 mTOR 通路产生一定的影响^[40-41]。由此可以推测, 副溶血弧菌对对虾肝胰腺 mTOR 通路的抑制可能受到多种因素的影响, 如 ROS 及炎症因子等。因此 mTOR 通路可作为机体异常的标志性通路。

4 结论

本研究以 5×10^7 cfu/mL 致病性副溶血弧菌对凡纳滨对虾进行浸浴攻毒实验, 探讨了致病性副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺的氧化损伤, 并首次研究了副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺 mTOR 信号通路、*Rab* 基因和 *Grim-19* 基因的影响。结果显示副溶血弧菌侵入凡纳滨对虾后, 破坏其免

疫机能,造成肝胰腺抗氧化酶活性下降,36 h 死亡率就已达到了 68.9%,且 mTOR 信号通路受到抑制;*Rab* 基因参与了凡纳滨对虾抗细菌的先天免疫过程,表明吞噬作用在对虾清除副溶血弧菌方面起到了重要作用;*Grim-19* 基因的表达促进了细胞凋亡,可能是凡纳滨对虾被弧菌感染后死亡的原因之一。本研究期望为凡纳滨对虾健康养殖和病害防控提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Wang J. Toxic effects of aflatoxin B1 on growth performance, biochemical and hepatopancreas microstructure of *Litopenaeus vannamei*[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei Province, 2014: 7–10. [王静. 饲料中黄曲霉毒素 B1 对凡纳滨对虾生长、生化指标及肝胰腺显微结构的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2014: 7–10.]
- [2] Thitamadee S, Prachumwat A, Srisala J, et al. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia[J]. Aquaculture, 2016, 452: 69–87.
- [3] Zhai X M, Wang B, Mao L J, et al. The effects of physiological and biochemical index for *Penaeus vannamei* infected with *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2007, 16(2): 162–168. [翟秀梅, 王斌, 毛连菊, 等. 副溶血弧菌对南美白对虾生理生化指标的影响[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(2): 162–168.]
- [4] Su S Y. Preliminary Study on the Early Mortality Syndrome of *Litopenaeus vannamei*[D]. Hainan: Hainan University, 2013: 8–10. [苏树叶. 凡纳滨对虾“早期死亡综合症”的初步研究[D]. 海南: 海南大学, 2013: 8–10.]
- [5] He Y, Jin L, Sun F, et al. Antibiotic and heavy-metal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh shrimps in Shanghai fish markets, China[J]. Environ Sci Pollut R, 2016, 23(15): 15033–15040.
- [6] Huang H H. Study on immune response characteristics of *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio harveyi* infection[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2014: 4–6. [黄海洪. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)抗哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染的免疫应答特征研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014: 4–6.]
- [7] Leñaño E M, Mohan C V. Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms[J]. Global Aquaculture Advocate, 2012, 2012(7–8): 38–39.
- [8] Sha Y J. Studies on probiotic mechanism of lactic acid bacteria in *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016: 77–78. [沙玉杰. 乳酸菌对凡纳滨对虾益生机理的研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院海洋研究所, 2016: 77–78.]
- [9] Wang L, Wang X R, Liu J, et al. Rab from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and its regulation upon environmental stress[J]. Ecotoxicology, 2015, 24(7–8): 1765–1774.
- [10] Peng T, Gu M M, Zhao C S, et al. The GRIM-19 plays a vital role in shrimps' responses to *Vibrio alginolyticus*[J]. Fish Shellfish Immun, 2016, 49: 34–44.
- [11] Contreras-Vergara C A, Harris-Valle C, Sotelo-Mundo R R, et al. A mu-class glutathione S-transferase from the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and active-site structural modeling[J]. J Biochem Mol Toxic, 2004, 18(5): 245–252.
- [12] Xin F. Gene Cloning and Functional Study on the Important Genes of m TOR Signaling in *Litopenaeus vannamei*[D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences, 2016: 14. [辛芳. 凡纳滨对虾 mTOR 信号通路中重要基因的克隆和功能的初步研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2016: 14.]
- [13] Leñaño E M, Mohan C V. Emerging threat in the Asian shrimp industry: early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS)[J]. FHS-AFS, 2012, 10: 1–7.
- [14] Liu K F, Yeh M S, Kou G H, et al. Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages[J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34(9): 935–944.
- [15] Duan Y, Zhang J, Dong H, et al. Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge[J]. Fish Shellfish Immun, 2015, 46(2): 354–365.
- [16] Rameshthangam P, Ramasamy P. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* Fabricius[J]. Aquaculture, 2006, 254(1): 32–39.
- [17] Bianchini A, Monserrat J M. Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: protective role of sesamol[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2007, 67(1): 100–108.
- [18] Zhang M M, Ning J J, Xu S L, et al. Effect of *Vibrio alginolyticus* infection on immune function of *Charybdis japonica* hepatopancreas[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(12): 1863–1871. [张萌萌, 宁俊佳, 徐善良, 等. 感染溶藻弧菌对日本对虾肝胰腺免疫功能的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(12): 1863–1871.]
- [19] Zhang Z, Li S, Xie C, et al. Innate immune response and gene expression of *Scylla paramamosain* under *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. Aquac Res, 2013, 46(2): 462–471.
- [20] Li C C, Yeh S T, Chen J C. The immune response of white

- shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection[J]. Fish shellfish immun, 2008, 25(6): 853–860.
- [21] Wang R, Zhang Y, Liu S, et al. Analysis of 52 Rab GTPases from channel catfish and their involvement in immune responses after bacterial infections[J]. Dev Comp Immunol, 2014, 45(1): 21–34.
- [22] Exton J H. Small GTPases minireview series[J]. J Biol Chem, 1998, 273(32): 19923.
- [23] Wang L, Wang X R, Liu J, et al. Rab from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and its regulation upon environmental stress[J]. Ecotoxicology, 2015, 24(7–8): 1765–1774.
- [24] Ren Q, Zhou J, Jia Y P, et al. Cloning and characterization of Rap GTPase from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Dev Comp Immunol, 2012, 36(1): 247–252.
- [25] Huang Y, Ren Q. Identification and function of 11 Rab GTPases in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish Shellfish Immun, 2015, 43(1): 120–130.
- [26] Chen Y, Lu H, Liu Q, et al. Function of GRIM-19, a mitochondrial respiratory chain complex I protein, in innate immunity[J]. J Biol Chem, 2012, 287(32): 27227–27235.
- [27] Kalvakolanu D V. The GRIMs: a new interface between cell death regulation and interferon/retinoid induced growth suppression[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(2–3): 169–194.
- [28] Zhang J, Yang J, Roy S K, et al. The cell death regulator GRIM-19 is an inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(16): 9342–9347.
- [29] Zhang Y Y. Isolation and identification pathogen of *Litopenaeus vannamei* molecular cloning of *Crustin-Like* gene and its mRNA expression with *Vibrio parahaemolyticus* challenge[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012: 9–10. [张艳艳. 凡纳滨对虾病原菌分离与鉴定和类 *Crustin* 基因的克隆及在副溶血弧菌感染条件下的表达分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012: 9–10.]
- [30] Wang D, Li F, Li S, et al. Expression profiles of antimicrobial peptides (AMPs) and their regulation by relish[J]. Chin J Oceanol Limnol, 2012, 30: 611–619.
- [31] Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G, Jiménez-Vega F, et al. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins[J]. Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol, 2004, 138(4): 415–422.
- [32] Su J, Wang B J, Wang L, et al. The full length cDNA cloning and expression profile of Prophenoloxidase of *Fenneropenaeus Chinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(1): 56–66. [孙杰, 王宝杰, 王雷, 等. 中国明对虾酚氧化酶原基因 cDNA 的克隆与表达特征[J]. 水产学报, 2010, 34(1): 56–66.]
- [33] Wang D L, Zuo D, Wang L M, et al. cDNA cloning and expression analysis of prophenoloxidase in *Cherax quadricarinatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(1): 43–54. [王丹丽, 左迪, 王兰梅, 等. 红螯光壳螯虾酚氧化酶原基因的克隆与表达[J]. 水产学报, 2013, 37(1): 43–54.]
- [34] Laplante M, Sabatini D M. mTOR signaling in growth control and disease[J]. Cell, 2012, 149(2): 274–293.
- [35] Dazert E, Hall M N. mTOR signaling in disease[J]. Curr Opin Cell Biol, 2011, 23(6): 744–755.
- [36] Rubiolo J A, López-Alonso H, Martínez P, et al. Yessotoxin induces ER-stress followed by autophagic cell death in glioma cells mediated by mTOR and BNIP3[J]. Cell Signal, 2014, 26(2): 419–432.
- [37] Colpoys W E, Cochran B H, Carducci T M, et al. Shiga toxins activate translational regulation pathways in intestinal epithelial cells[J]. Cell Signal, 2005, 17(7): 891–899.
- [38] Chen L, Xu B, Liu L, et al. Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPK α leading to apoptosis of neuronal cells[J]. Lab Invest, 2010, 90(5): 762–773.
- [39] Shang Y C, Chong Z Z, Wang S, et al. Erythropoietin and Wnt1 govern pathways of mTOR, Apaf-1, and XIAP in inflammatory microglia[J]. Curr Neurovasc Res, 2011, 8(4): 270–285.
- [40] Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response[J]. Immunity, 2008, 29(4): 565–577.
- [41] Lin J, Bai X C. mTOR signaling pathway linking chronic inflammation and malignant transformation[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2014, 41(1): 79–86. [林骏, 白晓春. mTOR 信号通路与“炎-癌”转变[J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(1): 79–86.]

The effects of *Vibrio parahaemolyticus* on hepatopancreas antioxidant enzyme activity and gene expression of *Litopenaeus vannamei*

ZHAO Wei^{1,3}, WANG Lei^{1,2}, LIU Mei^{1,2}, JIANG Keyong^{1,2}, QI Cancan^{1,2}, YANG Guang³, WANG Baojie^{1,2}

1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China
2. Laboratory of Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China
3. College of Fishery Science, Tianjin Agriculture University; Tianjin Key Laboratory of Aquaculture, Tianjin 300384, China

Abstract: In order to determine the impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) on the hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*, shrimps with weights of (2.2 ± 0.24) g were challenged with Vp at a concentration of 5×10^7 CFU/mL for 36 h. The hepatopancreas tissues from the experimental and control groups were collected at 6 h, 12 h, 24 h, and 36 h after the start of the experiment to evaluate antioxidant enzyme activities and immune and mTOR signal pathway-related gene expression levels. The results showed that after challenge with Vp, SOD activity was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$), while CAT, GSH-PX, and GST activities all increased at first and subsequently decreased, reaching the peak value at 12 h, 6 h and 24 h, respectively ($P < 0.05$). The relative expression levels of *Rab* and *Grim-19* were significantly higher than in the control group ($P < 0.05$), *crustin* and *ProPO* were up-regulated at first and then decreased after reaching their peaks at 12 h and 24 h, respectively, while the level of the *GST* gene was significantly lower than that of the control group during the time 12–36 h ($P < 0.05$). These results showed that functions of the immune system were affected by Vp. Several important genes in mTOR signal pathway were also been quantified by qRT-PCR. The relative expression levels of *4EBP* gene were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$). *eIF4E1A* and *eIF4E2* were both up-regulated at first and then decreased after reaching peak values at 12 h and 6 h, respectively ($P < 0.05$). The level of *P70s6k* was significantly lower than that of the control group after challenge ($P < 0.05$). The results indicated that Vp challenge had a noticeable impact on antioxidant enzyme activities and immune and mTOR signal pathway-related gene expression of *Litopenaeus vannamei*, with significant destructive effect on the shrimp's immune system.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *Vibrio parahaemolyticus*; hepatopancreas; antioxidantase; gene expression

Corresponding author: WANG Baojie. E-mail: wangbaojie@qdio.ac.cn