

昆虫围食膜结构与功能概述及其对对虾 WSSV 病防治研究的启示

Review on structure and function of insect peritrophic membrane for facilitating research on prevention of WSSV disease in shrimp

桂朗, 王兵, 王丽燕, 李富花, 相建海

(中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071)

中图分类号: Q31

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)04-0126-06

围食膜(Peritrophic matrix, PM)是无脊椎动物肠道内包围摄入食物的一种特殊结构,是由几丁质纤维网在黏附于其上的蛋白质(围食膜蛋白)相互作用下形成的半通透性膜状结构^[1]。已发现的围食膜有两种类型,即I型和II型^[2]。I型围食膜是由中肠上皮细胞分泌并覆盖于整个中肠表面;II型则由贲门附近的细胞分泌,随着取食产生,包在食物表面并随着消化废物排出体外^[3]。类似于脊椎动物消化道的黏液层,它是中肠上皮细胞和食物之间的一个物理屏障,可有效保护中肠细胞免受食物颗粒的损伤,促进营养物质的消化吸收,也是经口进入发生感染的病原体防卫前哨。由于围食膜后即敏感的肠道细胞表层,因此它被认为是昆虫等节肢动物最重要的肠道物理免疫屏障^[3],在节肢动物先天性病毒免疫体系中具有重要地位^[4]。

目前,与昆虫同属于节肢动物的对虾,其围食膜研究报道很少,只有对虾近缘物种——锐脊单肢虾(*Sicyonia ingentis*)肠道围食膜的研究见诸报道^[5]。近年来,病害每年都给对虾养殖业造成了巨大的经济损失,尤其是对虾白斑症病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)^[6]。通常情况下,在动物摄食活动过程中,肠道是极易接触病原的薄弱部位^[7],对虾肠道是最早可检测到WSSV感染的组织之一^[8-10]。由于通过消化道侵入的病毒必须穿过围食膜屏障^[3]。因此认为,对虾围食膜必然在抵御病原侵染过程中发挥着重要的作用。

鉴于围食膜具有重要的生理功能,在昆虫害虫防治中,以围食膜为靶标的生物防治技术已日渐兴

起。作者概述了昆虫围食膜的结构及其功能,并对目前以昆虫围食膜为靶标的害虫生物防治技术进行了总结,旨在通过逆向思维,借鉴昆虫害虫防治途径,在本实验室已经获得的中国对虾围食膜相关实验结果的基础上,探索新的以围食膜保护为基本手段的对虾WSSV病毒病防治新策略。

1 昆虫围食膜

1.1 昆虫围食膜结构与围食膜蛋白

昆虫属于节肢动物门,昆虫纲(Insecta)。2001年Wang等^[11]报道了第一个鳞翅目(Lepidoptera)围食膜结构的模型,它是几丁质-蛋白质构成的复合网状结构^[1]。在不同种类昆虫中,围食膜几丁质的含量有所不同,一般占围食膜组分的4%~20%^[12]。围食膜蛋白是围食膜的主要组成成分,占围食膜的20%~55%^[7]。

根据从PM上提取的难易程度,围食膜蛋白分为4类^[7]:(1)在缓冲液条件下即可移除的;(2)用温和的除垢剂如SDS等可被移除的;(3)用强的变性剂如尿素等才可移除的;(4)即使强的变性剂也很难移除的。其中第三类的围食膜蛋白最多。昆虫围食膜蛋白种类不尽一致,从几种到几十种的都有^[13-14],

收稿日期: 2011-05-06; 修回日期: 2011-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41076101)

作者简介: 桂朗(1984-),女,湖北武汉人,博士生,主要从事对虾免疫研究, E-mail: mywheats@126.com; 相建海,通信作者,电话: 0532-82898568, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

同种昆虫因发育时期, 饵料营养等不同也可影响围食膜蛋白的种类。

目前已鉴定的昆虫围食膜蛋白都是在强变性剂作用下, 可从围食膜上的几丁质纤维网状结构上解离的蛋白, 统称为围食膜因子(Peritrophin)^[7]。最早被报道的围食膜蛋白是来自铜绿蝇(*Lucilia cuprina*)幼虫的 Peritrophin-44^[15], 以及来自粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)的一种具有高度糖基化的肠道黏蛋白(Invertebrate Intestinal Mucins, IIM)^[4]。它们都是几丁质结合蛋白, 具有几丁质结合结构域(Peritrophin Chitin Binding Domain, CBD)。这些 CBD 是围食膜蛋白功能的核心。已发现的围食膜蛋白具有数目不等的 CBD, 最多的有 19 个, 最少的有 1 个^[3]。根据氨基酸序列上保守半胱氨酸的排列组合不同, 可将围食膜因子分成 A、B 和 C 3 种类型。如图 1 所示, A 型围食膜因子(Peritrophin-A)CBD 内的 β 折叠通过保守半胱氨酸的二硫键形成一个保护疏水残基的口袋, 并形成与几丁质结合的氢键。

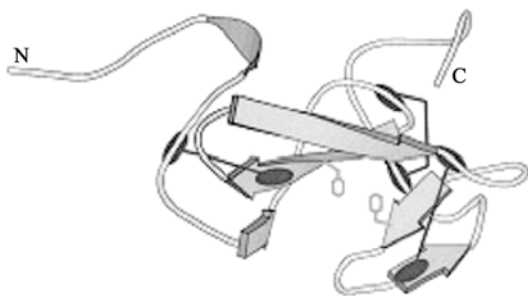


图 1 昆虫 A 型围食膜因子 CBD 的三维结构示意图(引自 Hegedus, 2009^[16])

1.2 昆虫围食膜作为杀虫剂的靶标

围食膜是昆虫体内的一道物理保护屏障, 具有特殊结构及重要的生理功能。昆虫通过保持其完整性以保证营养物质的消化吸收, 因此以围食膜为靶标, 如通过抑制其组分几丁质的合成或围食膜中几丁质与蛋白质的结合, 打破围食膜正常的维持的生理机制, 即可抑制昆虫的生长发育, 最终可以达到防治害虫的目的。目前, 化学农药残留易使昆虫产生耐药性等副作用引起人们的关注, 越来越多的国家开始重视生物防治的研究和应用。研究表明大多数经口感染的昆虫病毒都是通过降解围食膜侵入宿主^[17], 因此昆虫对病毒的敏感度一定程度取决于肠道围食膜的通透性。利用该原理, 在病毒侵染过程中, 辅助病毒冲破昆虫围食膜屏障的病毒基因已被应用

于病虫害防控^[18]。另发现, 将昆虫病毒与低残留化学农药联合使用, 使病毒首先通过破坏围食膜, 侵入宿主, 影响宿主的正常生理状态, 同时, 在宿主体内表达特定蛋白如磷酸酶/激酶等对农药特定靶蛋白受体进行调节, 使病虫害对农药的敏感性增强, 这样即使减少农药的使用量, 依然可以达到很高的杀虫效果。目前, 这种昆虫病毒与低残留化学农药复配的杀虫剂已投入生产应用^[19]。总得来说, 目前已知破坏围食膜的成份与方式主要有以下几种:

1.2.1 增强蛋白(enhancerin)——降解围食膜蛋白

增强蛋白最初是在杆状病毒科(Baculoviridae)的颗粒体病毒属(*Granulovirus*)中发现的^[20], 这种金属蛋白酶所作用的底物是昆虫中肠围食膜的主要蛋白成分——肠道黏蛋白 IIM^[4], 它能降解 IIM, 破坏宿主围食膜, 增加病毒与昆虫中肠细胞接触的机会, 从而提高病毒感染昆虫的几率^[17, 21, 22]。

1.2.2 几丁质酶(chitinase)——降解围食膜几丁质

几丁质酶存在于多种杆状病毒, 是一种具有生物催化活性的水解酶, 可以降解昆虫体内的几丁质。几丁质酶能够降解围食膜中的几丁质, 引起围食膜穿孔, 严重时导致昆虫消化道麻痹, 停止摄食, 最终饥饿而死。例如喂食重组表达几丁质酶蛋白的家蚕^[23]和松墨天牛(*Monochamus alternatus*)^[24], 食物消耗率显著减低, 昆虫体质量明显降低, 死亡率提高。

1.2.3 荧光增白剂——破坏围食膜蛋白与几丁质的结合

Wang 等^[25]的研究发现, 荧光增白剂(Calcofluor)可以竞争性地结合到中肠新合成的几丁质上, 从而阻断围食膜蛋白与几丁质的结合, 导致围食膜结构破坏, 结果可使幼虫发育迟缓, 增加幼虫对细菌病毒感染的敏感度, 增大死亡率。不过荧光增白剂对围食膜的破坏作用是短暂的、可恢复的。甜菜夜蛾活体试验中, 更换无荧光增白剂 FB28 的饲料和时间的延长均会使昆虫围食膜结构完整性恢复^[26]。鳞翅类昆虫实验结果表明作为配合昆虫毒素的增效剂(toxin enhancing agent), 荧光增白剂不及几丁质酶等对围食膜的破坏作用强^[27]; 但在粗脚粉螨(*Acarus siro*)中, 荧光增白剂^[28]对围食膜的破坏作用明显强于几丁质酶, 推测是内源性的蛋白酶降解了经口喂服的重组表达几丁质酶。

除了以上几种方式外, 研究还发现昆虫痘病毒(Entomopoxviruses, EPV)的纺锤形包涵体可以降解家蚕围食膜^[29]。痘病毒的 fusolin 蛋白可增加多角体病毒对黏虫(*Armyworm*)细胞系的附着, 增强病毒感

染率^[30]。而通过外源引入双链 RNA 破坏围食膜蛋白的技术,近年来也成为害虫防治研究上的热点^[3]。双链 RNA 可在宿主中肠环境中存活并被肠绒毛上皮吸收,形成 RNA 干扰,进而降低靶基因和蛋白的表达^[31-34]。

2 对虾围食膜

对虾属于节肢动物门(Arthropoda),甲壳纲(Crustacea),十足目(Decapoda)。对虾的消化道主要分为4个部分,依次是食道、胃、肠道以及消化腺——肝胰腺。中肠是对虾肠道的主要结构,其中包括与胃交界的一对前盲囊、中肠管和与后肠交界的一个后盲囊。前后盲囊有产生围食膜、分泌消化酶、吸收营养物质和调节渗透压的作用^[35]。对虾围食膜也是由几丁质-蛋白质复合物组成的非细胞结构,它覆盖在中肠内腔上皮细胞表面,前端有两个侧孔,通往前盲囊,后端的一背孔,通往后盲囊^[36]。若干虾类中肠的形态结构被前人不同程度描述过:淡水克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[37]、勒氏长唇虾(*Derocheilocaris remanei*)^[38]、海钩虾(*Gammarus oceanicus*)^[39]、糠虾(*Mysidacea*)^[40]、锐脊单肢虾(*Sicyonia ingentis*)^[5]和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[41-42]等。尽管围食膜是中肠重要组成部分,但是其与病毒相互作用的研究却属空缺。

最早的一类围食膜蛋白是1999年在果蝇中发现的,这是一种在胚胎气管(embryonic tracheae)中表达的蛋白,其分布在养分或气体交换的不同管道中,能抵抗外界微生物或病毒的入侵^[43]。近来人们在对虾中找出了一些与昆虫围食膜因子高度相似的并具有围食膜因子 CBD 的基因,但迄今为止对虾围食膜蛋白功能的研究尚未见明确报道。由于未明确与围食膜关系,它们大多被命名为类围食膜蛋白(peritrophin-like protein)。已发现的对虾类围食膜蛋白大都在病原刺激后有强烈变化,甚至有些具有抗菌活性。Khayat 等^[44]在研究短沟对虾(*Penaeoid semisulcatus*)卵子形成过程中,在虾卵中发现了两条高表达的类围食膜基因,并将其命名为虾卵巢围食膜蛋白(shrimp ovarian peritrophin, SOP),Du 等^[45]发现中国明对虾中 SOP 同时在细菌刺激后的血细胞、心脏、胃、肠道等器官中发生明显上调表达,Loongyai 等^[46]报导了在墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)中的 SOP 具有抗菌活性;Pongsomboon 等^[47]也发现在斑节对虾(*Penaeus monodon*)血细胞中存在

的 Peritrophin 同源基因在弧菌和 WSSV 分别刺激后均发生显著上调表达。这些都提示围食膜蛋白与对虾先天性免疫相关。

本实验室在进行中国明对虾 EST 比对时,获得了多条分别同昆虫围食膜非粘性蛋白(nonmucin)和肠道黏蛋白 IIM 高度相似的基因片段,它们都具有多个 CBD。这些基因片段在弧菌和 WSSV 刺激后 0~6 h 发生了显著表达变化^[48]。通过对所获得的类围食膜因子基因片段中 CBD 三维结构进行预测(图 2),可知其与昆虫 A 型围食膜因子 CBD 的空间结构(图 1)非常相似。这些已有的研究结果提示:(1)中国明对虾类围食膜蛋白可能是对虾先天性免疫系统中的重要组成部分;(2)在已获得的类围食膜蛋白基因中可能存在对虾围食膜蛋白基因。



图 2 本实验室所获得的 cDNA 类围食膜因子 CBD 的三维结构预测结果

3 围食膜研究对于防治对虾 WSSV 病的展望

对虾养殖业是中国沿海地区的重要支柱产业,2009 年中国对虾养殖总产量达到 130 万 t,为当年世界对虾养殖产量的 38%(世界水产资讯网)。随着对虾养殖业快速发展,病害问题日益显露,在众多病害中,对虾 WSSV 是危害最严重的,WSSV 发病虾池的死亡率在 3~10 d 即可达到 100%^[6]。自 90 年代初 WSSV 病爆发以来,每年都给水产养殖业带来巨大经济损失,迄今无有效对策。

目前,对虾先天性免疫研究工作基本都聚焦在体液免疫和细胞免疫方面,也取得了很大进展。人们已发现了多种免疫分子和抗病毒基因^[49-51],获得了抗菌肽^[52]、crustin^[53]、凝集素^[54]、蛋白酶抑制剂^[55]等,在实验水平可用 RNAi 抑制 WSSV^[56-57],甚至可以通过抑制免疫功能基因使对虾易感性增加^[58-59]。

然而相对于对虾体液和细胞免疫的研究,物理免疫屏障相关研究仍然处于滞后状态。

目前大多数学者认为 WSSV 主要是通过消化道感染对虾,其肠道是感染后最早可检测到 WSSV 分子的组织之一^[8-10]。通过消化道侵入的病毒必须穿过围食膜屏障^[3],然而针对对虾围食膜和病毒粒子相互关系的研究很少,目前只有对虾近缘物种——锐脊单肢虾(*Sicyonia ingentis*)肠道围食膜的研究见诸报道^[5]。锐脊单肢虾围食膜在实验条件下,允许通过的物体直径为 20 nm,与昆虫围食膜孔径约 17~36 nm^[60]相似,而最小的 WSSV 病毒完整颗粒直径一般在 70 nm 以上^[61]。因此 WSSV 必然用某种方式,或破坏对虾围食膜的正常结构,或通过围食膜蛋白相互作用,最终突破围食膜屏障,感染对虾。围食膜作为对虾肠道相关免疫系统的第一道物理防线,必然在抵御 WSSV 入侵中发挥了重要作用。对对虾围食膜蛋白-几丁质网络及其相互作用分子在病毒感染过程中的作用研究具有重要的理论意义和应用价值。

对昆虫病毒进行研究,其目的是为了寻找防控病虫害的有效方法,通过将病毒与化学试剂联合作用,使化学试剂用量小的情况下仍保持很高的杀虫效果,或将具有破坏昆虫围食膜的病毒基因插入转基因植物,使其永久获得抗击病虫害的能力,其作用途径最终都是通过破坏昆虫肠道围食膜的方法来促进杀虫效果^[18]。由此为对虾抗 WSSV 病毒的研究提出了新的问题及启示:(1) WSSV 是如何穿透对虾围食膜屏障的?(2) 对虾围食膜以及相关蛋白在 WSSV 入侵过程中扮演怎样的角色?(3) 既然破坏昆虫围食膜可以增加病毒的毒力,那么保护对虾围食膜或是增加围食膜蛋白的表达是否可以增加对虾的抗病毒能力?

随着对虾养殖业的快速发展,宿主对虾和病毒 WSSV 的基础理论研究滞后带来的负面效应日益显露,对虾围食膜的形态结构类型,对虾围食膜蛋白以及围食膜几丁质结构与组成的研究不仅可以为对虾先天性免疫系统提供理论基础,其研究结果还能对对虾病害的防治提供新思路和新策略。

参考文献:

- [1] Shi X, Chamankhah M, Visal-Shah S, et al. Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: characterization of a mamestra configurata intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34(10): 1101-1115.
- [2] Morales-Ramos J, Rojas M, Sittertz-Bhatkar H. Peritrophic matrix of the formosan subterranean termite (*Isoptera: Rhinotermitidae*)[J]. *Fla Entomol*, 2006, 89(1): 99-101.
- [3] Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, et al. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function[J]. *Annu Rev Entomol*, 2009, 54: 285-302.
- [4] Wang P, Granados R R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(13): 6977-6982.
- [5] Martin G G, Simcox R, Nguyen A, et al. Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: structure, formation, and permeability[J]. *Biol Bull*, 2006, 211(3): 275-285.
- [6] Van Hulten M C, Witteveldt J, Peters S, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence[J]. *Virology*, 2001, 286(1): 7-22.
- [7] Tellam R L, Wijffels G, Willadsen P. Peritrophic matrix proteins[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1999, 29(2): 87-101.
- [8] Di Leonardo V A, Bonnichon V, Roch P, et al. Comparative WSSV infection routes in the shrimp genera *Marsupenaeus* and *Palaemon*[J]. *J Fish Dis*, 2005, 28(9): 565-569.
- [9] Escobedo-Bonilla C M, Wille M, Alday Sanz V, et al. Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile, specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei*[J]. *Dis Aquat Organ*, 2007, 74(2): 85-94.
- [10] Robalino J, Bartlett T, Shepard E, et al. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response[J]. *J Virol*, 2005, 79(21): 13561-13571.
- [11] Wang P, Granados R R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2001, 47(2): 110-118.
- [12] 相静波, 刘惠霞, 吴文君. 昆虫围食膜的研究进展[J]. *昆虫知识*, 2004, 41(2): 116-122.
- [13] Adang M J, Spence K D. Biochemical comparisons of the peritrophic membranes of the lepidopterans *Orgyia pseudotsugata* and *Manduca sexta*[J]. *Comp Biochem Phys B*, 1982, 73(3): 645-649.
- [14] Moskalyk L A, Oo M M, Jacobs Lorena M. Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes*

- aegypti* [J]. *Insect Mol Biol*, 1996, 5(4): 261-268.
- [15] Elvin C M, Vuocolo T, Pearson R D, et al. Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-44, from the larvae of *Lucilia cuprina*. cDNA and deduced amino acid sequences [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(15): 8925-8935.
- [16] Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, et al. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function[J]. *Annual Review of Entomology*, 2009, 54: 285-302.
- [17] Slavicek J M, Popham H J. The *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus enhancins are components of occlusion-derived virus[J]. *J Virol*, 2005, 79(16): 10578-10588.
- [18] Liu S, Li H, Sivakumar S, et al. Virus-derived genes for insect-resistant transgenic plants[J]. *Adv Virus Res*, 2006, 68: 427-457.
- [19] Lapiéd B, Pennetier C, Apaire-Marchais V, et al. Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization[J]. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(4): 190-198.
- [20] Hashimoto Y, Corsaro B G, Granados R R. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus[J]. *J Gen Virol*, 1991, 72 (11): 2645-2651.
- [21] Peng J X, Zhong J, Granados R R. A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae[J]. *J Insect Physiol*, 1999, 45(2): 159-166.
- [22] 尹隽, 单梁, 宋大新, 等. 粉纹夜蛾颗粒体病毒增强蛋白锌离子结合域定点突变[J]. *昆虫学报*, 2007, 50(11): 1111-1115.
- [23] Rao R, Fiandra L, Giordana B, et al. AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34(11): 1205-1213.
- [24] Kabir K E, Sugimoto H, Tado H, et al. Effect of *Bombyx mori* chitinase against Japanese pine sawyer (*Monochamus alternatus*) adults as a biopesticide[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(1): 219-229.
- [25] Wang P, Granados R R. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, 30(2): 135-143.
- [26] 王俊平. FB28 对甜菜夜蛾围食膜蛋白影响的研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(18):8553-8554.
- [27] Rees J S, Jarrett P, Ellar D J. Peritrophic Membrane contribution to Bt Cry delta-endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor[J]. *J Invertebr Pathol*, 2009, 100(3): 139-146.
- [28] Sobotnik J, Kudlikova-Krizkova I, Vancova M, et al. Chitin in the peritrophic membrane of *Acarus siro* (Acari: Acaridae) as a target for novel acaricides[J]. *J Econ Entomol*, 2008, 101(3): 1028-1033.
- [29] Mitsunashi W, Miyamoto K. Disintegration of the peritrophic membrane of silkworm larvae due to spindles of an entomopoxvirus [J]. *J Invertebr Pathol*, 2003, 82(1): 34-40.
- [30] Hukuhara T, Wijonarko A. Enhanced fusion of a nucleopolyhedrovirus with cultured cells by a virus enhancing factor from an entomopoxvirus [J]. *J Invertebr Pathol*, 2001, 77(1): 62-67.
- [31] Turner C T, Davy M W, MacDiarmid R M, et al. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding [J]. *Insect Mol Biol*, 2006, 15(3): 383-391.
- [32] Baum J A, Bogaert T, Clinton W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1322-1326.
- [33] Mao Y B, Cai W J, Wang J W, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1307-1313.
- [34] Khajuria C, Buschman L L, Chen M S, et al. A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2010, 40(8): 621-629.
- [35] 姜永华, 颜素芬, 陈政强. 南美白对虾消化系统的组织学和组织化学研究[J]. *海洋科学*, 2003, 27(4): 58-62.
- [36] Dall W, Hill B J, Rpthlisberg P C, et al. The biology of the penaeidae[J]. *Advances in Marine Biology*, 1990, 27: 28-29.
- [37] To T H, Brenner T L, Cavey M J, et al. Histological organization of the intestine in the crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Acta Zoologica*, 2004, 85(2): 119-130.
- [38] Herrera-Alvarez L, Fernandez I, Benito J, et al. Ultrastructure of the midgut and hindgut of *Derocheilocaris remanei* (Crustacea, Mystacocarida)[J]. *J Morphol*, 2000, 244(3): 177-189.
- [39] Halcrow K. Ultrastructural features of the funnel of *Gammarus oceanicus* (Amphipoda)[J]. *J Crustacean Biol*, 2001, 21(3): 631-639.
- [40] Jong-Moreau L, Brunet M, Casanova J, et al. Comparative structure and ultrastructure of the midgut and hepatopancreas of five species of *Mysidacea* (Crustacea): functional implications [J]. *Canadian*

- Journal of Zoology, 2000, 78(5): 822-834.
- [41] 张志峰, 马爱军, 于利, 等. 中国对虾幼体中肠的超微结构[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 145-149.
- [42] 刘晓云, 张志峰, 廖承义. 中国对虾中肠的超微结构与细胞化学研究[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1): 58-61.
- [43] Barry M K, Triplett A A, Christensen A C. A peritrophin-like protein expressed in the embryonic tracheae of *Drosophila melanogaster*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 1999, 29(4): 319-327.
- [44] Khayat M, Babin P J, Funkenstein B, et al. Molecular characterization and high expression during oocyte development of a shrimp ovarian cortical rod protein homologous to insect intestinal peritrophins[J]. Biol Reprod 2001, 64(4): 1090-1099.
- [45] Du X J, Wang J X, Liu N, et al. Identification and molecular characterization of a peritrophin-like protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. Mol Immunol, 2006, 43(10): 1633-1644.
- [46] Loongyai W, Avarre J C, Cerutti M, et al. Isolation and functional characterization of a new shrimp ovarian peritrophin with antimicrobial activity from *Fenneropenaeus merguensis*[J]. Mar Biotechnol (NY), 2007, 9(5): 624-637.
- [47] Pongsomboon S, Wongpanya R, Tang S, et al. Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(5): 485-493.
- [48] Wang B, Li F, Luan W, et al. Comparison of gene expression profiles of *Fenneropenaeus chinensis* challenged with WSSV and *Vibrio* [J]. Mar Biotechnol (NY), 2008, 10(6): 664-675.
- [49] He N, Qin Q, Xu X. Differential profile of genes expressed in hemocytes of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization[J]. Antiviral Res, 2005, 66(1): 39-45.
- [50] Zhao Z Y, Yin Z X, Weng S P, et al. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 22(5): 520-534.
- [51] Zhang M, Wang H, Li D, et al. A novel focal adhesion kinase from *Marsupenaeus japonicus* and its response to WSSV infection[J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33(4): 533-539.
- [52] Bachere E, Gueguen Y, Gonzalez M, et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*[J]. Immunol Rev, 2004, 198: 149-168.
- [53] Shockey J E, O'Leary N A, de la Vega E, et al. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: an in vivo approach[J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33(5): 668-673.
- [54] Liu Y C, Li F H, Dong B, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Mol Immunol, 2007, 44(4): 598-607.
- [55] Donpuksa S, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33(4): 481-488.
- [56] Xu J, Han F, Zhang X. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRN [J]. Antiviral Res, 2007, 73(2): 126-131.
- [57] Wu Y, Lu L, Yang L S, et al. Inhibition of white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* shrimp by sequence-specific siRNA [J]. Aquaculture, 2007, 271(1-4): 21-30.
- [58] Rijiravanich A, Browdy C L, Withyachumnarnkul B. Knocking down caspase-3 by RNAi reduces mortality in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* challenged with a low dose of white-spot syndrome virus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24(3): 308-313.
- [59] Charoensapsri W, Amparyup P, Hirono I, et al. Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection[J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33(7): 811-820.
- [60] Edwards M J, Jacobs-Lorena M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae[J]. J Insect Physiol, 2000, 46(9): 1313-1320.
- [61] Wang Y G, Hassan M D, Shariff M, et al. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation [J]. Dis Aquat Organ, 1999, 39(1): 1-11.

(本文编辑: 谭雪静)