

溶藻弧菌体外刺激泥蚶(*Tegillarca granosa*) 血细胞后早期转录组研究*

钟爱华 王迎宾 毕澜方 徐浩磊

(浙江海洋大学水产学院 浙江舟山 316022)

摘要 泥蚶(*Tegillarca granosa*)是我国传统养殖贝类,细菌性疾病导致的死亡已成为制约泥蚶养殖业发展的重要因素,血细胞是泥蚶免疫防御的執行者,血细胞能直接吞噬异物,能通过包囊作用将异物包裹,血细胞还在炎症反应和伤口修复中发挥作用。采用 RNA-seq 测序技术研究了溶藻弧菌体外刺激后泥蚶血细胞 3 h 和 6 h 时转录组动态变化,与未受刺激血细胞相比,3 h 时 1 790 个基因表达发生显著改变,包括 1 319 个上调基因和 471 个下调基因;6 h 时 3 183 个基因表达发生显著改变,包括 2 629 个上调基因和 554 个下调基因。KEGG 通路富集分析发现溶藻弧菌刺激后免疫相关多个信号通路或生物学过程发生显著改变,如吞噬体、细胞凋亡、蛋白酶体、内质网加工、局部黏附等。部分免疫相关基因表达丰度 3 h 时变化不显著而 6 h 时发生显著改变,部分免疫相关基因 3 h 和 6 h 时表达丰度均显著改变。研究结果为泥蚶血细胞早期免疫反应提供了新的见解,为泥蚶抗病机理研究提供了理论基础。

关键词 泥蚶(*Tegillarca granosa*); 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*); 血细胞; 转录组

中图分类号 S917.4 doi: 10.11693/hyhz20220500123

贝类没有淋巴细胞介导的特异性体液免疫和细胞免疫,只有以血细胞为基础的固有免疫,贝类血细胞能吞噬外源性或内源性抗原,还能产生各种非特异性体液因子参与宿主免疫防御。吞噬后的病原主要通过两条途径被杀伤,第一条途径是吞噬小体与含有水解酶的溶酶体融合,水解消化病原微生物,包拉米虫感染后欧洲扁牡蛎(*Ostrea edulis*)血细胞中多种水解酶活力上升(Xue *et al.*, 2000);第二条途径是通过呼吸暴发激活细胞膜上的 NADPH 氧化酶,从而产生大量活性氧来杀灭病原微生物。

近年来,随着高通量转录组测序技术的应用,对特定组织、器官 mRNA 进行全貌分析成为可能。通过对特定组织或器官所表达的 mRNA 分析,能明确细胞内的调控网络及分子机制。目前,转录组测序已应用于鱼类、虾蟹类和贝类,如环境适应机制、免疫反应机制研究。Zhao 等(2015)研究了盐度胁迫下凡纳

滨对虾血细胞转录组,发现差异表达基因涉及免疫信号通路、细胞凋亡和能量代谢等。Hu 等(2022)研究了溶解氧和温度对硬壳蛤(*Merccenaria mercenaria*)鳃转录组影响,发现内质网蛋白质加工和泛素介导的蛋白质水解在响应低氧和高温胁迫中发挥重要作用。Ren 等(2021)通过转录组测序,获得了菲律宾蛤仔的 Toll 样受体种类及其对溶藻弧菌的响应特征。

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)属弧菌科、弧菌属,是一种短杆状革兰氏阴性菌,无荚膜和芽孢,与哈维氏弧菌、副溶血弧菌并称海洋三大优势弧菌,其中溶藻弧菌居首,是海洋中常见的条件致病菌。泥蚶(*Tegillarca granosa*)属软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、列齿目(Taxodonta)、蚶科(Arcidae),是我国传统养殖贝类。统计显示 2015 年以来我国蚶类养殖总面积约 4.534 万 hm^2 ,总产量约 417.31 万 t。随着泥蚶养殖规模的扩大,病害问题日益突出,当外界条

* 浙江省教育厅项目, Y202044632 号。钟爱华, E-mail: zhongpe@zjou.edu.cn

收稿日期: 2022-05-10, 收修改稿日期: 2022-07-21

件不良或生物本身抵抗力下降时, 往往能引发弧菌病流行, 近年来多地养殖泥蚶大量死亡, 弧菌病是导致死亡的重要原因。弧菌性疾病轻则影响泥蚶产量, 重则导致泥蚶大量死亡, 造成巨大经济损失, 使泥蚶养殖业面临挑战, 因此开展泥蚶抗病机制研究十分必要。血细胞是泥蚶免疫防御的主要执行者, 细菌入侵后, 血细胞会对入侵者做出反应以清除细菌。目前有关泥蚶研究主要集中在养殖技术、病害防治以及功能基因克隆等方面(李太武等, 2003; 朱泽闻等, 2011; 许家辉等, 2018), 溶藻弧菌入侵后泥蚶血细胞 mRNA 表达量变化规律研究较少, 本文拟研究溶藻弧菌体外刺激泥蚶血细胞后早期转录组动态变化, 明确泥蚶免疫反应的分子途径, 以确定有助于改善泥蚶健康状况和降低死亡率的免疫性能标记, 探索泥蚶免疫应答的分子机制, 以期对泥蚶抗病机理研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样本准备

实验用泥蚶来自浙江省舟山市南珍市场, 选择反应迅速、贝壳完整的泥蚶, 运回实验室暂养 5 d。暂养结束后, 随机选 30 个大小近似一致的泥蚶, 每 15 个泥蚶一组, 用无菌解剖刀小心割开闭壳肌后, 用无菌注射器从外套腔中小心抽取血淋巴置于无菌离心管中, 每组取 10 mL 血淋巴, 1 000 r/min 离心 3 min 后, 去上清液, 用 10 mL 无菌 Hanks 液(NaCl: 8 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O: 0.126 g/L; KH₂PO₄: 0.068 g/L, KCl: 0.48 g/L, MgSO₄: 0.098 8 g/L, CaCl₂: 0.148 g/L, D-葡萄糖: 18 g/L, NaHCO₃: 0.358 g/L)重悬浮。

实验用溶藻弧菌为 CICC21664 标准菌株, 将菌株划线接种在 TCBS 培养基上, 37 °C 培养 24 h 后, 挑取形态特征一致的菌落, 用无菌 Hanks 液制成悬浮液后, 调整细菌密度至 5×10^{10} CFU/mL。每组血淋巴中加入 100 μ L 溶藻弧菌悬浮液, 混匀后, 混合液置于 25 °C 培养箱中孵育。一组于孵育 0 h、3 h 和 6 h 取混合液 1 mL, 置于无菌离心管中, 1 000 r/min 离心 3 min 后, 去上清液, 向沉淀中加入 2 mL Trizol (Invitrogen, CA, USA)裂解液, 用移液器反复吹打裂解液, 直到无明显细胞团块, 室温静置 5 min, 待细胞完全裂解后保存于 -80 °C 超低温冰箱中用于转录组测序。一组用于血细胞染色观察。

1.2 RNA 提取、cDNA 文库构建与测序

总 RNA 提取按照 Trizol® Reagent 试剂盒操作步

骤进行, 获得的总 RNA 用 RNA 1000 Nano LabChip Kit 试剂盒(Agilent, CA, USA)和 Bioanalyzer 2100 进行定性定量检测, 选取高质量 RNA (浓度 200 ng/ μ L, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.2, 总量 5 μ g, RIN>9.0)进行文库构建。提取的总 RNA 用包含 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA, 然后用片段化试剂(Fragmentation Buffer)将富集的 mRNA 随机打断成短片段, 以短片段 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物(Random hexamers)合成 cDNA 第一链, 随后加入 RNaseH、dNTPs、DNA Polymerase I 和缓冲液合成二链 cDNA, 加入 End Repair Mix 将双链的 cDNA 修复成平末端, 然后在 3' 端加上碱基 A 并加上接头。获得的 cDNA 进行 PCR 扩增, 共 15 个循环, 扩增试剂盒为 Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA), 扩增产物用 1%琼脂糖电泳后, 回收 200~300 bp 的条带, 用 TBS380 (Picogreen)定量检测后, 进行高通量测序, 测序平台为 Illumina HiSeq NovaSeq 6000, 测序读长为双端 PE150。

1.3 转录组 *de novo* 组装

测序获得的原始数据(Raw Date)使用 Fastp 去除 reads 中的接头序列, 去除没有插入片段的 reads, 修剪掉序列 3'末端质量值小于 20 的碱基, 若修剪后的序列仍有质量值小于 10 的碱基, 则整条序列去除, 否则保留, 去除含模块碱基 N 的 reads, 舍弃质量修剪以及去除接头后长度小于 30 bp 的序列, 剩余序列用于后续分析。过滤后的数据(Clean reads), 用 Trinity 软件从头进行组装, 首先将 reads 拼接为长片段 contigs, 去除冗余后将 contigs 分组, 然后将 contigs 连接成两端不能再延长的片段即为 Unigenes。

1.4 基因功能注释

NCBI-NR (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>)数据库注释分析采用 DIAMOND (Buchfink *et al*, 2015)软件, 期望值为 $E < 1e-5$; 使用 BLAST2GO、HMMER3NR 和 KOBAS 软件在 GO (<http://www.geneontology.org/>)、Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)和 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)数据库中进行比对, 对 Unigenes 信息进行注释。

1.5 差异表达基因分析

先采用 RSEM 软件将质控后的 Clean reads 数据与组装的 Unigene 序列进行比对, 获得 Unigene 的 read 数目, 然后计算每百万读段中来自于某转录本的读段数 TPM (Transcripts Per Kilobase Million), 确定 Unigene 的表达量。使用 R 软件中的 DEGseq 包筛选

差异表达基因, 差异表达基因选择标准为多重检验校正后的 P -adjust 值 <0.001 且 $|\log_2\text{Fold Change}|>1$ 。采用 KOBAS 软件进行差异表达基因 KEGG 通路富集分析。

1.6 血涂片染色

溶藻弧菌和泥蚶血细胞孵育后 0、1、3、6 和 24 h, 取血细胞制作血涂片, 制作的血涂片采用瑞氏吉姆萨染色液(南京建成)染色, 染色方法参考说明书稍作修改, 具体为染色液 A 液染色 1 min, 然后加 B 液染色 8 min, 染色完成后水洗, 晾干后显微镜下观察, 10×100 倍下采用佳能数码相机拍照。

2 结果

2.1 测序数据质控和组装

在 0 h、3 h 和 6 h, 泥蚶血细胞中分别获得 7.11 G、7.01 G 和 6.96 G 原始数据(raw bases), 经修剪、过滤不合格序列后, 三个时间点有效数据(clean bases)分别为 6.81 G、6.71 G 和 6.67 G, 有效序列(clean reads)分别为 45 984 396、45 465 728 和 45 249 166 条, 有效序列 Q20 质量得分为 97.99%、97.85% 和 97.53%, Q30 得分为 93.85%、93.63%和 93.02%, GC 含量为 41.55%、40.97%和 40.43%。

获得的有效序列经从头组装后, 共获得 24 456 个 Unigenes, 最长 Unigene 长度为 17 988 bp, 最短 Unigene 长度为 201 bp, N50 长度为 879 bp。

2.2 基因功能注释

组装后的 Unigenes 分别比对到 NR、Swiss-Prot、Pfam、GO 和 KEGG 五个数据库, 10 649 个基因在五个数据库中获得注释, 注释率为 43.54% (图 1)。比对结果显示, 10 402 个 Unigenes 与 NR 数据库中已知基

因同源, 其中 18.45% 序列与欧洲扇贝 (*Pecten maximus*)同源、16.30% 序列与虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*) 同源、10.67% 序列与太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)同源(图 2), 89% 序列相似度高于 60%, 其中 49.68% 序列相似度在 80%~100%, 40.99% 序列相似度在 60%~80%。

为了解泥蚶血细胞中表达基因和蛋白功能, 将 24 456 个 Unigenes 在 GO 数据库中进一步比对分析, 7 934 个 Unigenes 在 GO 数据库中获得注释, 这些基因被归为“生物学过程”、“细胞成分”和“分子功能”三类, 细胞过程(3 129 个 Unigenes)、细胞组分(3 517 个 Unigenes)和结合(3 972 个 Unigenes)是三大类中包含 Unigenes 最多的次级 GO 类别(图 3)。

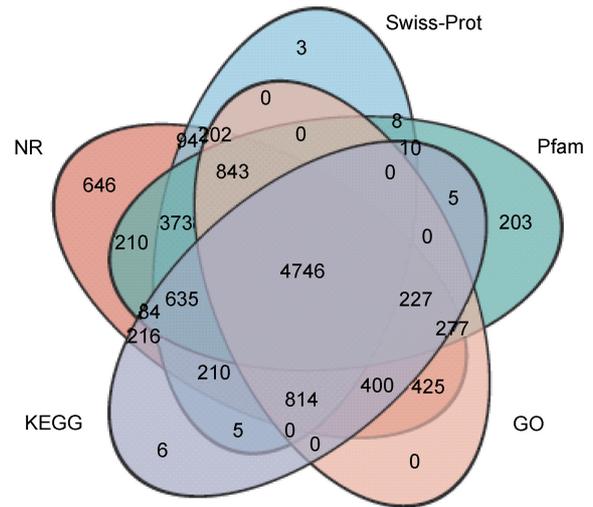


图 1 Unigenes 注释信息

Fig.1 The Venn diagram of the Unigenes annotated in five databases

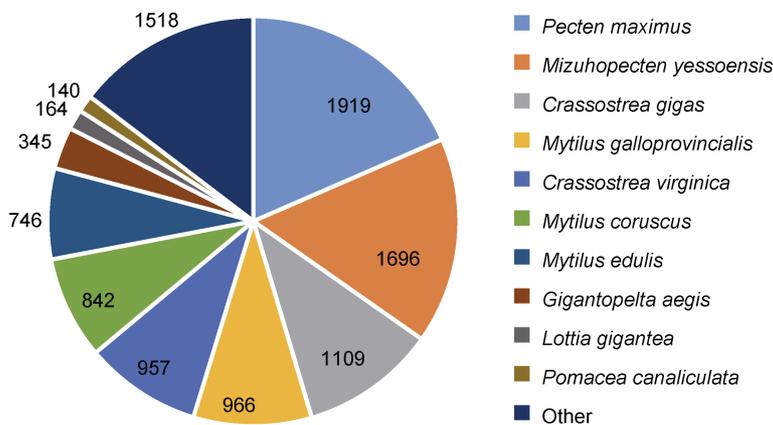


图 2 Unigenes 同源性分析

Fig.2 The homology analysis of Unigenes

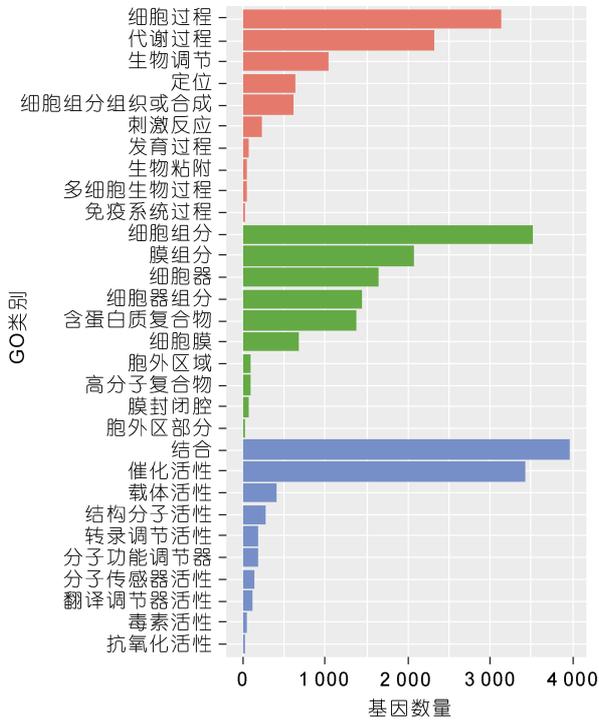


图3 基因 GO 功能注释

Fig.3 The GO functional classification of Unigenes in hemocyte

注：红色为生物学过程类别，绿色为细胞成分类别，蓝色为分子功能类别

根据 KEGG 数据库比对结果，可将 7 358 个 Unigenes 分为 5 个分支 33 个二级通路，包含 Unigenes 最多的二级通路是信号转导(942 个 Unigenes)，其次是运输和分解代谢(640 个 Unigenes)。

2.3 差异表达基因分析

基因表达丰度按照 TPM 来计算，获得表达丰度后，采用 DEGseq 软件进行差异表达分析，差异表达基因筛选标准为 $P\text{-adjust} < 0.001$ 且 $|\log_2(\text{FoldChange})| > 1$ 。溶藻弧菌和泥蚶血细胞孵育 3 h，1 790 个基因表达发生显著改变，包括 1 319 个上调基因和 471 个下调基因；孵育 6 h (与 0 h 相比)，3 183 个基因表达发生显著改变，包括 2 629 个上调基因和 554 个下调基因 (图 4)。

与 0 h 相比，1 113 个基因在 3 h 和 6 h 时均上调，其中 254 个基因 3 h 表达量显著高于 0 h 且 6 h 表达量显著高于 3 h，表达量持续上调；205 个基因在 3 h 时上调 6 h 无显著变化，1 516 个基因在 3 h 无显著变化但在 6 h 时上调。与 0 h 相比，267 个基因在 3 h 和 6 h 时均下调，其中 8 个基因表达量持续下调，204 个基因在 3 h 时下调 6 h 无变化，286 个基因在 3 h 时无变化 6 h 时发生下调；另有 1 个基因 3 h 时上调而 6 h 时下，部分差异表达基因列于表 1。

2.4 差异表达基因富集分析

根据 KEGG 数据库注释信息，进一步分析了差异表达基因通路富集，通路显著富集的标准为矫正后的 P 值 ($P\text{-adjust}) < 0.05$ ， $P\text{-adjust}$ 越小，富集越显著。结果显示，3 h 时 1 790 个差异表达基因共富集到 226 条通路上，其中 25 条 KEGG 通路显著富集，富集程度最高的三条通路为吞噬体、细胞凋亡和局部黏附 (图 5)。富集到吞噬体通路的 25 个差异表达基因中 13

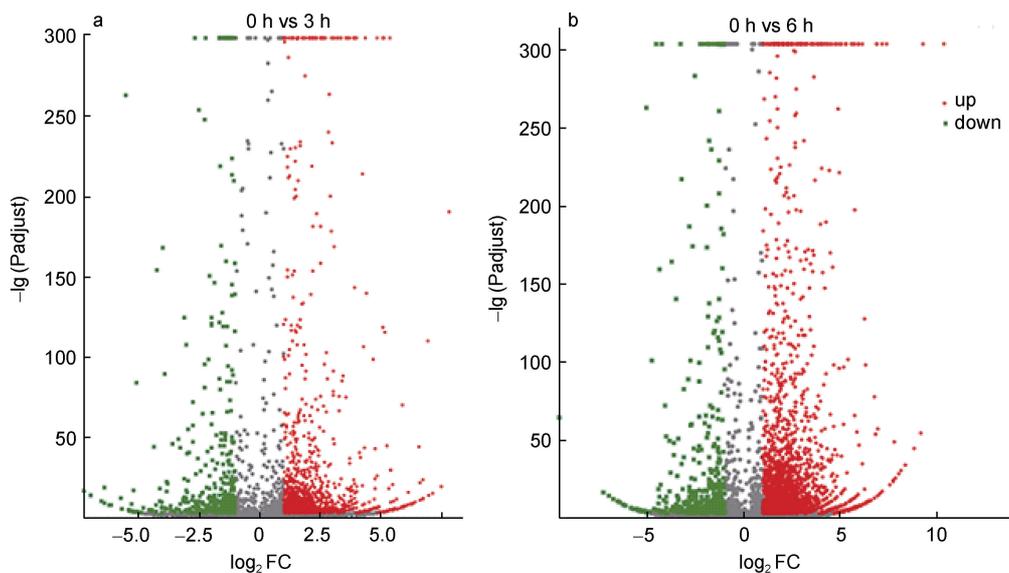


图4 溶藻弧菌刺激后泥蚶血细胞中差异表达基因火山图

Fig.4 Volcano plot of DEGs identified from 3 h and 6 h in hemocyte after *V. alginolyticus* challenge

注：a. 刺激 3 h 和 0 h 相比差异表达基因火山图；b. 刺激 6 h 和 0 h 相比差异表达基因火山图

表 1 部分差异表达基因统计
Tab.1 Statistics of some differentially expressed genes

基因 ID	NR 描述	log ₂ FC (3 h/0 h)	log ₂ FC (6 h/0 h)	log ₂ FC (6 h/3 h)
TRINITY_DN389_c0_g1	Vitrin-like	5.14	7.44	2.99
TRINITY_DN2700_c0_g1	Immediate early response gene 5-like protein	1.75	2.84	1.01
TRINITY_DN37_c0_g1	Myophilin	3.08	4.36	1.28
TRINITY_DN473_c0_g1	Ras-related protein Rab-7a	2.07	3.59	1.52
TRINITY_DN834_c0_g1	Matrix metalloproteinase	2.62	4.44	1.82
TRINITY_DN395_c0_g3	Heat shock protein 70 B2-like	1.13	1.31	-0.02
TRINITY_DN8111_c0_g3	Cell growth-regulating nucleolar protein-like	1.16	1.23	0.08
TRINITY_DN22632_c0_g1	Elongation factor 1 alpha	-1.04	-1.66	0.63
TRINITY_DN6184_c0_g1	Apoptosis-inducing factor 1	-2.05	-3.42	-1.37
TRINITY_DN805_c0_g1	AIF1	-2.51	-4.52	-2.02

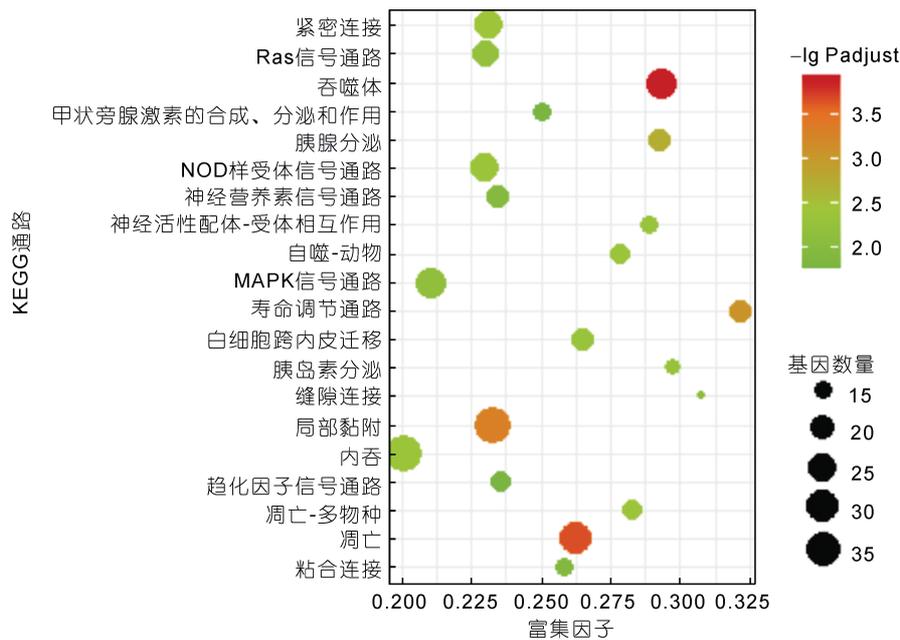


图 5 溶藻弧菌刺激 3h 时差异基因 KEGG 富集图(仅示前 20 条富集通路)

Fig.5 KEGG enrichment for the DEGs at 3h after *V. alginolyticus* challenge (top 20 pathways)

个基因上调 12 个基因下调, 在吞噬过程中发挥重要作用的丝状肌动蛋白、Ras 相关蛋白 Rab-5B、Syntaxin7/13/18 在 3 h 样本中表达丰度升高 5 倍以上, 囊泡转运蛋白 SEC22 和钙网蛋白等基因上调, 微管蛋白 α 和 β 下调。富集到细胞凋亡通路的 31 个基因中 25 个上调 6 个下调, 细胞凋亡通路关键基因肿瘤坏死因子超家族成员 10、组织蛋白酶 Z、Fas 相关死亡结构域蛋白、凋亡调控蛋白 Bcl-2、半胱氨酸蛋白酶 7 等均上调, 凋亡诱导因子 1 等下调。局部黏附通路中有 32 个基因上调 5 个基因下调, 基质蛋白 2、Vitrin 蛋白、Ras 基因家族成员 Q、局部黏附激酶 1 等基因均上调, β -连环蛋白等下调。胞吞通路中有 33

个基因上调 4 个基因下调, 低密度脂蛋白受体结合蛋白、囊泡蛋白分类相关蛋白 37、带电多泡体蛋白 1/2/4、热休克蛋白 70 等基因均上调。

3 183 个在 6 h 时差异表达基因共富集到 245 条 KEGG 通路, 差异显著的富集通路有 34 条, 富集程度最高的三条通路为蛋白酶体、细胞凋亡和内质网蛋白加工(图 6)。富集到蛋白酶体通路上调基因有 25 个, 无下调基因, 蛋白酶活化剂 700 (PA700) 的多个亚基均上调, 20S 蛋白酶体 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 6$ 和 $\beta 7$ 亚基均上调。富集到细胞凋亡通路的基因有 52 个, 上调基因 45 个, 下调基因 7 个, Caspase 蛋白 2 在 6 h 时上调, 肿瘤坏死因子超家族成

员 10 和组织蛋白酶 Z 表达丰度显著高于 3 h, 凋亡诱导因子 1 下调但与 3 h 时相比无显著差异。29 个上调基因和 8 个下调基因富集到吞噬体通路, 囊泡相关膜蛋白 3、溶酶体相关膜蛋白 1/2、组织蛋白酶 L1 等在 6 h 时上调, 微管蛋白 α 和 β 表达丰度与 3 h 时无差异。51 个上调基因和 5 个下调基因富集到内

质网蛋白加工通路, 其中内质网相关降解途径中的多个蛋白如 Derlin-1 等上调。52 个上调基因和 4 个下调基因富集到胞吞通路, 部分上调基因与 3 h 时无差别, 但表皮生长因子受体、吞蛋白 A3、囊泡蛋白分类相关蛋白 22/25/28/36/、带电多泡体蛋白 5 等在 6 h 时发生上调。

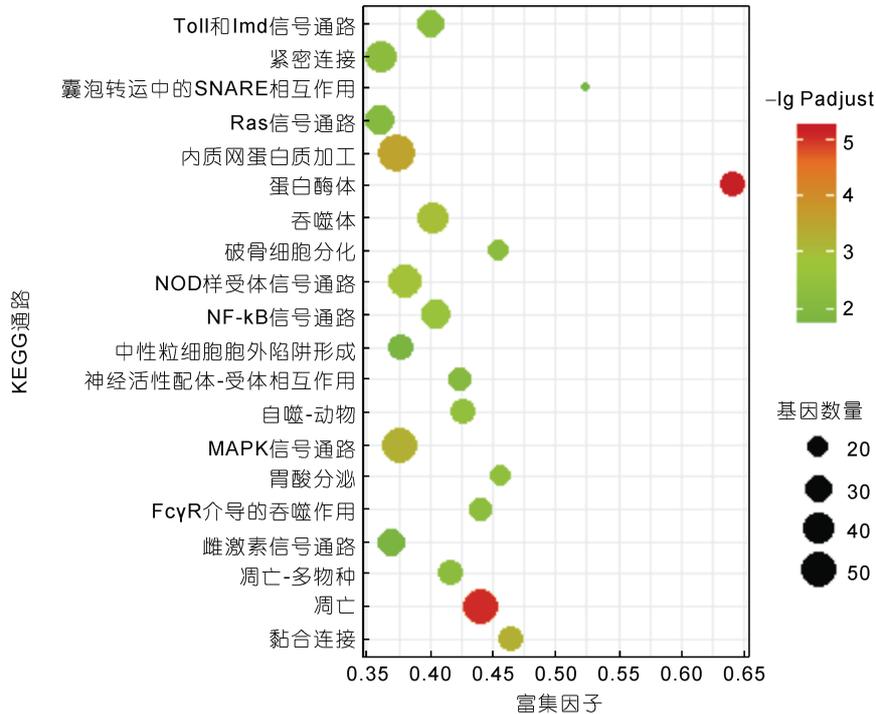


图 6 溶藻弧菌刺激 6h 时差异基因 KEGG 富集图(仅示前 20 条富集通路)

Fig.6 KEGG enrichment for the DEGs at 6h after *V. alginolyticus* challenge (top 20 pathways)

另外, 溶酶体水解酶 α -N-乙酰半乳糖胺酶、 α -半乳糖苷酶和抗酒石酸酸性磷酸酶 5 表达丰度在 3 h 时和 6 h 时持续上调, 6 h 时 β -半乳糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶、 α -L-岩藻糖苷酶、N-乙酰氨基半乳糖-6-硫酸酯酶、N-巯基葡萄糖胺巯基水解酶和酸性神经酰胺酶等上调; Sialin 在 3 h 和 6 h 下调, 但 3 h 和 6 h 时表达丰度变化不显著。MAPK 通路中重要基因丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 持续上调, 6 h 时丝裂原活化蛋白激酶激酶 3/6 均上调。

2.5 血细胞染色观察

泥蚶血细胞主要由红色颗粒细胞、嗜碱性颗粒细胞和无色透明细胞组成, 红色颗粒细胞数量最多且具有吞噬活性, 嗜碱性颗粒细胞较少也能吞噬溶藻弧菌。1 h 时, 两种具有吞噬活性的细胞(后文统一称为吞噬细胞)胞浆中有大量被吞噬的溶藻弧菌, 被吞噬的溶藻弧菌染色后呈小颗粒状, 显微镜下观察呈蓝紫色(图 7a); 3 h 时吞噬细胞中能观察到被吞噬的小

颗粒状溶藻弧菌、中等大小的颗粒以及少量大颗粒(图 7b); 6 h 时吞噬细胞中大颗粒数量较 3 h 时增多(图 7c); 24 h 时, 血涂片中观察到部分细胞破裂后的细胞核, 吞噬细胞中仍能观察到被吞噬的溶藻弧菌、中等大小的颗粒以及大颗粒, 部分细胞中溶藻弧菌数量较少(图 7d, 7e, 7f, 7g)。部分细胞有大量的伪足伸出(图 7h)。

3 讨论

细菌入侵后, 宿主免疫系统会启动一系列防御机制以应对细菌感染。血细胞是泥蚶免疫防御的重要执行者, 血细胞的免疫防御反应包括吞噬、呼吸暴发以及形成结节和包囊等, 在免疫防御过程中, 血细胞内许多基因表达会发生改变以响应细菌入侵。溶藻弧菌是海洋中优势菌和条件致病菌, 溶藻弧菌感染后泥蚶免疫细胞早期响应特征还不是很清楚, 本文采用体外实验, 研究了溶藻弧菌刺激后泥蚶血细胞转

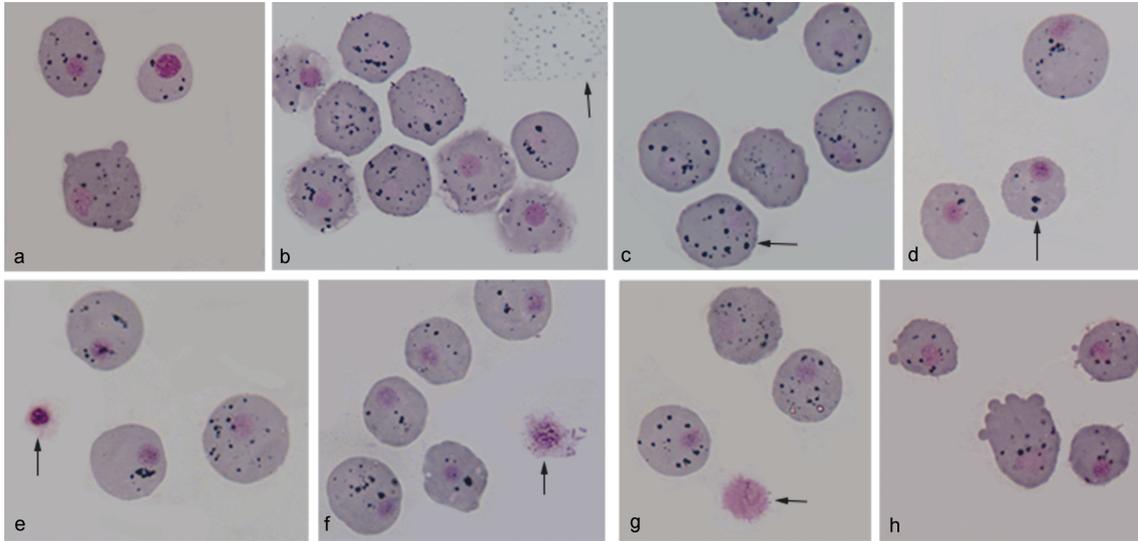


图7 泥蚶血细胞染色结果

Fig.7 The staining results of hemocytes after *V. alginolyticus* challenge

注: a. 溶藻弧菌和血细胞孵育 1 h; b. 溶藻弧菌和血细胞孵育 3 h, 箭头所示为溶藻弧菌; c. 溶藻弧菌和血细胞孵育 3 h, 箭头所示为中等大小颗粒和大颗粒; d. 溶藻弧菌和血细胞孵育 6 h; e, f, g. 溶藻弧菌和血细胞孵育 24 h, 箭头所示为细胞核; h. 具伪足的红色颗粒细胞

录组早期动态变化特点。通过转录组测序, 共获得 24 456 个 Unigenes, 溶藻弧菌刺激 3 h 时鉴定出 1 790 个差异表达基因, 刺激 6 h 时鉴定出 3 183 个差异表达基因, 随着时间延长, 差异表达基因增加, 这种表达模式表明免疫反应是一个不断变化、动态发展的多基因参与过程, 副溶血弧菌感染早期中华长文蛤 (*Meretrix petechialis*) 肝脏中基因表达也呈现出相似规律 (Yu *et al*, 2019)。通过基因功能分析发现, 这些差异基因涉及吞噬体、溶酶体、蛋白酶体、内吞、剪接体、MAPK 信号通路、细胞凋亡等, 表明泥蚶血细胞响应涉及众多基因和多个生物学过程, 溶藻弧菌刺激后厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 血细胞也有类似响应特征 (Dong *et al*, 2017)。

吞噬体是一种囊泡, 在吞噬微生物或微生物蛋白质的过程中, 通过质膜及其相关脂质和蛋白质的内陷形成。泥蚶属低等无脊椎动物, 没有淋巴细胞介导的体液免疫和细胞免疫, 血细胞的吞噬作用是抵抗细菌感染的重要途径 (孙敬锋等, 2006; Casem, 2016; Burgos-Aceves *et al*, 2017)。泥蚶吞噬体相关基因序列多数还不是很清楚, 本研究通过转录组测序获得了多个泥蚶吞噬体通路相关基因, 如丝状肌动蛋白、Ras 相关蛋白 Rab-5B、囊泡转运蛋白 SEC22、钙网蛋白等序列及表达量, 丝状肌动蛋白在伪足和吞噬小泡形成中发挥重要作用, 吞噬小泡形成后立即与内体融合, 吞噬体和内体之间的膜融合需要 Rab5

(Gorvel *et al*, 1991; Rybin *et al*, 1996), 溶藻弧菌刺激 3 h, 丝状肌动蛋白、RAB5 等基因的表达量显著增加, 表明刺激早期, 吞噬发挥重要的免疫作用, 6 h 时这些基因依然高表达, 暗示 6 h 血细胞依然能吞噬溶藻弧菌, 这与形态学观察相一致。

从吞噬细胞质膜上断裂后, 新生的吞噬体最终会与溶酶体融合 (Desjardins *et al*, 1994; Flanagan *et al*, 2012)。本研究通过转录组测序获得多种泥蚶溶酶体酶编码基因, 包括蛋白酶 5 种 [组织蛋白酶 (Cathepsin A/C/L/Z) 4 种, 内肽酶 (Legumain) 1 种], 糖苷酶 12 种 (如 β -半乳糖苷酶, α -葡萄糖苷酶, α -L-岩藻糖苷酶), 硫酸酯酶 2 种, 脂肪酶 2 种, 核酸酶 1 种, 磷酸酶 1 种, 神经酰胺酶 1 种, 天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶 1 种, 棕榈酰蛋白硫酯酶 1 种, 共计 26 种水解酶的编码基因, 这些溶酶体酶的水解作用是杀伤和清除病原微生物重要方式。溶藻弧菌和血细胞孵育 3 h 时, 3 种水解酶表达量增加, 6 h 时 13 种水解酶表达量增加, 表明早期主要是免疫细胞吞噬阶段, 随着吞噬体与溶酶体融合, 溶酶体水解酶开始发挥水解作用, 以杀伤和清除吞噬细胞吞噬的溶藻弧菌, 太平洋牡蛎中也有相似发现, 弧菌感染后血细胞溶酶体酶活力增加 (Wang *et al*, 2017)。研究还发现部分水解酶还能释放到血淋巴中, 水解改变病原表面的分子结构, 有利于免疫细胞识别病原微生物 (Cheng, 1983; Xue *et al*, 2000), 这些水解酶的发现有助于泥蚶以及其他双壳

贝类免疫机制研究。

蛋白酶体是一种多亚单位蛋白水解复合物, 中心是具有催化作用的 20s 蛋白酶体, 两个末端由调控亚复合物组成的 PA700, 蛋白酶体是细胞质和细胞核中非溶酶体蛋白质降解的中心酶, 具有多种蛋白水解酶活性, 参与各种生物过程, 如错误折叠蛋白质和短命调节蛋白质的降解(Coux *et al.*, 1996; DeMartino *et al.*, 1999; Unno *et al.*, 2002)。本研究获得了泥蚶 PA700 多个亚基和 20S 蛋白酶体多个亚基, 3 h 时部分蛋白酶体亚基表达量上调, 6 h 大多蛋白酶体亚基表达量上调, 表明随着时间推移蛋白酶体活性不断增加, 也暗示泛素-蛋白酶体通路在泥蚶免疫反应中发挥重要作用。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路是真核生物中高度保守的信号转导通路, 该信号转导通路能将不同的细胞外刺激与广泛的细胞内反应联系起来, 从而在细胞的生长、分化、应激、炎症反应等多种生理过程中发挥作用, MAPK 通路有 3 种主要的分支路线: ERK、JNK 和 p38 MAPK (Roberts *et al.*, 2000; Roux *et al.*, 2004)。Zhang 等(2019)研究发现弧菌刺激后中华长文蛤(*Meretrix petechialis*) p38 MAPK 持续磷酸化, 表明 MAPK 信号通路在贝类免疫防御中发挥作用。本研究发现溶藻弧菌刺激后, 3 h、6 h 丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 (MKK4)持续上调, MKK4 能激活 c-Jun 氨基末端激酶(JNK), 暗示 JNK 信号通路在泥蚶血细胞免疫反应中发挥生理作用(Roberts *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2021); 6 h 时丝裂原活化蛋白激酶激酶 3 和 6 (MKK3, MKK6)均上调, MKK3 和 MKK6 能激活 p38 MAPK (Roberts *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2021), 结果表明 p38 MAPK 途径在泥蚶血细胞抗溶藻弧菌感染中发挥防御作用; MKK4 早于 MKK3 和 MKK6 上调暗示 c-Jun 氨基末端激酶信号通路早于 p38 MAPK 途径发挥生理作用。

细胞凋亡(Apoptosis)是由基因控制的细胞自主的、有序的死亡, 这是一种可以清除受损细胞或感染病原体细胞的机制, 细胞凋亡在后生动物中普遍存在(Cohen *et al.*, 1992; Bertheloot *et al.*, 2021)。本研究通过转录组测序发现细胞凋亡通路的多个重要基因在 3 h 和 6 h 时均上调, 如半胱氨酸蛋白酶 2 和 7, 包拉米虫感染后扁牡蛎血细胞也发生凋亡(Gervais *et al.*, 2016), 表明凋亡也是一种清除细菌感染的方式。

4 结论

本文通过体外实验, 研究了溶藻弧菌刺激早期

泥蚶血细胞转录谱, 分析了刺激 3 h 和 6 h 血细胞中差异表达基因, 3 h 时 1 790 个基因表达发生改变, 6 h 时鉴定出 3 183 个差异表达基因, 表明免疫反应是一个不断变化、动态发展的多基因参与过程。差异表达基因富集到多条 KEGG 信号通路, 3 h 时富集程度最高的通路有吞噬体、细胞凋亡和局部黏附, 6 h 时富集程度最高的三条通路有蛋白酶体、细胞凋亡和内质网蛋白加工, 表明这些通路在免疫反应中发挥重要作用。通过转录组测序获得了多种溶酶体酶编码基因、蛋白酶体亚基编码基因, 这些免疫相关基因的发现有助于早期免疫反应标志物的发现。本文结果可为研究泥蚶血细胞免疫反应以及抗病机理提供有效资料, 为泥蚶绿色健康养殖提供新的思路。

参 考 文 献

- 朱泽闻, 徐立蒲, 吴信忠, 等, 2011. 泥蚶血细胞的形态结构特征及部分免疫功能[J]. 水产学报, 35(10): 1494-1504.
- 许家辉, 陈世雄, 俞兴发, 等, 2018. 投喂海水小球藻和三角褐指藻对泥蚶成贝镉排出的影响[J]. 海洋与湖沼, 49(3): 624-629.
- 孙敬锋, 吴信忠, 2006. 贝类血细胞及其免疫功能研究进展[J]. 水生生物学报, 30(5): 601-607.
- 李太武, 李成华, 宋林生, 等, 2003. 5 个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生物多样性, 11(2): 118-124.
- BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN B S, 2021. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death [J]. Cellular & Molecular Immunology, 18(5): 1106-1121.
- BUCHFINK B, XIE C, HUSON D H, 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. Nature Methods, 12(1): 59-60.
- BURGOS-ACEVES M A, FAGGIO C, 2017. An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: physiology and molecular aspects [J]. Fish & Shellfish Immunology, 67: 513-517.
- CASEM M L, 2016. Case Studies in Cell Biology [M]. San Diego: Academic Press: 217-240.
- CHEN J, WANG L H, YUAN M, 2021. Update on the roles of rice MAPK cascades [J]. International Journal of Molecular Sciences, 22(4): 1679.
- CHENG T C, 1983. The role of lysosomes in molluscan inflammation [J]. American Zoologist, 23(1): 129-144.
- COHEN J J, DUKE R C, FADOK V A, *et al.*, 1992. Apoptosis and programmed cell death in immunity [J]. Annual Review of Immunology, 10: 267-293.
- COUX O, TANAKA K, GOLDBERG A L, 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes [J]. Annual Review of Biochemistry, 65: 801-847.
- DEMARTINO G N, SLAUGHTER C A, 1999. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms [J]. Journal of Biological Chemistry, 274(32): 22123-22126.
- DESJARDINS M, CELIS J E, VAN MEER G, *et al.*, 1994.

- Molecular characterization of phagosomes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 269(51): 32194-32200.
- DONG W Q, CHEN Y X, LU W X, *et al*, 2017. Transcriptome analysis of *Mytilus coruscus* hemocytes in response to *Vibrio alginolyticus* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 70: 560-557.
- FLANNAGAN R S, JAUMOUILLE V, GRINSTEIN S, 2012. The cell biology of phagocytosis [J]. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7: 61-98.
- GERVAIS O, CHOLLET B, RENAULT T, *et al*, 2016. Flat oyster follows the apoptosis pathway to defend against the protozoan parasite *Bonamia ostreae* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 56: 322-329.
- GORVEL J P, CHAVRIER P, ZERIAL M, *et al*, 1991. Rab5 controls early endosome fusion *in vitro* [J]. *Cell*, 64(5): 915-925.
- HU Z, FENG J, SONG H, *et al*, 2022. Mechanisms of heat and hypoxia defense in hard clam: insights from transcriptome analysis [J]. *Aquaculture*, 549: 737792.
- REN Y P, LIU H X, FU S Y, *et al*, 2021. Transcriptome-wide identification and characterization of toll-like receptors response to *Vibrio anguillarum* infection in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 111: 49-58.
- ROBERTS C J, NELSON B, MARTON M J, *et al*, 2000. Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles [J]. *Science*, 287(5454): 873-880.
- ROUX P P, BLENIS J, 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2): 320-344.
- RYBIN V, ULLRICH O, RUBINO M, *et al*, 1996. GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion [J]. *Nature*, 383(6597): 266-269.
- UNNO M, MIZUSHIMA T, MORIMOTO Y, *et al*, 2002. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution [J]. *Structure*, 10(5): 609-618.
- WANG W L, LI M J, WANG L L, *et al*, 2017. The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 67: 221-228.
- XUE Q G, RENAULT T, 2000. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76(3): 155-163.
- YU J J, WANG H X, YUE X, *et al*, 2019. Dynamic immune and metabolism response of clam *Meretrix petechialis* to *Vibrio* challenge revealed by a time series of transcriptome analysis [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 94: 17-26.
- ZHANG S J, YU J J, WANG H X, *et al*, 2019. p38 MAPK is involved in the immune response to pathogenic *Vibrio* in the clam *Meretrix petechialis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 95: 456-463.
- ZHAO Q, PAN L Q, REN Q, *et al*, 2015. Digital gene expression analysis in hemocytes of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to low salinity stress [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 42(2): 400-407.

THE TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF *IN VITRO* HEMOCYTES OF BLOOD CLAM (*TEGILLARCA GRANOSA*) CHALLENGED WITH *VIBRIO ALGINOLYTICUS*

ZHONG Ai-Hua, WANG Ying-Bin, BI Lan-Fang, XU Hao-Lei
(College of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract Blood clam (*Tegillarca granosa*) is a traditional cultured shellfish in China. The mortality caused by bacterial diseases has become an important issue restricting the development of clam breeding industry. Hemocytes are the executor of immune defense, and they can directly swallow foreign bodies and wrap them up by encapsulation. Hemocytes also play a role in inflammatory reaction and wound repair. In this paper, RNA sequencing was used to study the dynamic changes of transcriptome of *in vitro* hemocytes stimulated by *Vibrio alginolyticus* in 3 h and 6 h. Compared with unstimulated hemocytes, the expression of 1 790 genes were significantly changed at 3 h, including 1 319 up-regulated genes and 471 down-regulated genes. In 6 h, the expression of 3 183 genes changed significantly, including 2 629 up-regulated genes and 554 down regulated genes. KEGG pathway enrichment analysis found that many immune-related signal pathways or biological processes changed significantly after *V. alginolyticus* stimulation, such as phagosome, apoptosis, proteasome, endoplasmic reticulum processing, local adhesion and other pathways. The expression abundance of some immune-related genes did not change significantly in 3 h, but changed significantly in 6 h, and the expression abundance of some immune-related genes changed significantly in 3 h and 6 h. This study provided a new insight into the early immune response of the hemocytes of blood clam and a theoretical basis for the study of disease resistance mechanism of blood clam.

Key words *Tegillarca granosa*; *Vibrio alginolyticus*; hemocytes; transcriptome