

感染溶藻弧菌及白斑综合症病毒后凡纳滨对虾 不同组织的 Toll 样受体基因表达变化研究*

李晶晶¹ 李云¹ 刘红¹ 戴习林¹ 蒋飞² 丁福江²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 上海申漕特种水产开发公司 上海 201516)

摘要 为研究不同类型 Toll 样受体基因在凡纳滨对虾免疫调控机制中的作用, 实验首先通过荧光定量 PCR 方法检测了凡纳滨对虾 3 种 Toll 样受体基因在不同组织中的表达情况。结果表明凡纳滨对虾 3 种 Toll 样受体基因 mRNA 在各组织中均有表达。其中, Toll1 基因在肌肉, 血淋巴, 心脏和鳃均有较高表达, 心脏表达量最高; Toll2 基因在血淋巴, 心脏和鳃均有较高表达, 其中在鳃表达量最高; Toll3 基因在鳃和心脏有较高表达, 其中在鳃表达量最高。实验还对人工感染溶藻弧菌及白斑综合症病毒后凡纳滨对虾 3 种 Toll 样受体基因在不同免疫组织的表达变化差异进行研究。感染白斑综合症病毒后凡纳滨对虾血淋巴及鳃中 3 种 Toll 样受体基因表达量均显著提高, 并在各自达到表达峰值后逐渐下降直至恢复到感染前水平。感染溶藻弧菌后凡纳滨对虾血淋巴中 3 种 Toll 样受体基因表达量均显著提高; 鳃中 Toll1 及 Toll3 表达量分别于感染后 3h 和 12h 有显著提高, 而 Toll2 表达量无显著提高。由此推测 3 种 Toll 样受体基因均可能参与白斑综合症病毒感染所引起的免疫调控; 而在溶藻弧菌感染所引起的免疫调控中, 除了 Toll1, Toll3 参与鳃的免疫调控外, Toll2 基因还参与血淋巴中的先天性免疫调控。长期感染白斑综合症病毒或溶藻弧菌后, 凡纳滨对虾 3 种 Toll 样受体基因在血淋巴与鳃中的表达量均显著升高, 这可能与虾体在长期感染过程中, 需要不断保持较高免疫水平有关。

关键词 凡纳滨对虾; Toll 样受体; 荧光定量 PCR; 溶藻弧菌; 白斑综合症病毒

中图分类号 Q917 doi: 10.11693/hyhz20151000276

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又名南美白对虾, 因其具有出肉率高、抗逆性强、生长快、繁殖期长、耐高密度及低盐度养殖、便于活虾运输等优点(王兴强等, 2004), 已成为我国重要的经济养殖虾类, 与罗氏沼虾和斑节对虾并称为世界三大养殖虾类。自我国凡纳滨对虾人工育苗技术成功突破以来, 已在全国范围内进行了大规模的人工养殖。但是近年来随着养殖规模的不断扩大, 养殖强度的增加以及养殖环境的恶化, 特别是各类病毒及细菌性疾病的频繁暴发, 导致养殖产量骤降, 经济损失十分严重。所以急需通过生物学手段, 研究虾体自身免疫调控, 从而

寻找到有效提高虾体免疫力及抗病力的方法, 运用到凡纳滨对虾的人工养殖中。

与脊椎动物不同, 无脊椎动物不具备获得性免疫系统, 只具有依靠体液和细胞免疫的先天性免疫系统。Toll 样受体是进化中比较保守的一个受体家族, 是参与天然免疫的主要模式识别受体(Pattern recognition receptor, PRR)之一。Toll 样受体能识别细菌、真菌、病毒及寄生虫的多种病原相关分子模式 PAMP(pathogen associated molecular pattern)(包括脂类、脂蛋白、蛋白质、聚糖和核苷酸), 也能识别体内的代谢产物或组织细胞损伤、坏死时释放或分泌的分

* 上海海洋大学科技发展专项基金, A2-0209-15-200056 号; 上海市现代农业产业技术体系建设项目, 沪农科产字(2014)第 5 号; 上海市科委部分地方院校能力建设项目, 13320501900 号; 上海市农业基础性研究项目, 沪农科攻字(2014)第 7-1-11 号。李晶晶, 硕士研究生, E-mail: jjli1219@163.com

通讯作者: 李云, 博士, E-mail: liyun@shou.edu.cn

收稿日期: 2015-10-28, 收修改稿日期: 2016-01-12

子, 激活天然免疫系统来抵抗病原微生物的入侵, 是连接先天性免疫和获得性免疫的桥梁(Kawai *et al.*, 2011; O'Neill *et al.*, 2013)。特定的 Toll 样受体能识别 PAMP, 激活 MyD88(髓样分化因子 88)依赖性和非 MyD88 依赖性细胞信号通路, 触发炎症细胞因子和型干扰素的释放来进行宿主防御, 诱导机体免疫系统对病原微生物进行清除(罗兵等, 2011)。近年来, 关于甲壳动物 Toll 样受体基因的研究也逐渐增多, 其中多种虾类的 Toll 样受体基因相继被克隆, 例如: 斑节对虾(Arts *et al.*, 2007)、凡纳滨对虾(Yang *et al.*, 2007)、日本囊对虾(Mekata *et al.*, 2008)、中国明对虾(Yang *et al.*, 2008)等。而越来越多的报道证明在虾类存在多种不同类型的 Toll 样受体基因, 其中日本囊对虾已报道 2 种 Toll 样受体基因(Mekata *et al.*, 2008), 凡纳滨对虾中已发现 3 种不同类型 Toll 样受体基因(Yang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012)。Wang 等(2012)研究发现, 白斑综合症病毒感染可以引起凡纳滨对虾鳃部 LvToll1、LvToll2 和 LvToll3 基因的表达显著升高; 而感染溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)只能引起鳃中 LvToll1 基因的表达显著升高。与之相反, 多种病原相关分子模式均可以引起日本囊对虾血淋巴 Toll2 基因的表达量的显著提高(Mekata *et al.*, 2008)。所以推测虾类不同类型的 Toll 样受体基因可能具有不同的免疫调控功能。但由于之前对于病原体感染所引起的虾类 Toll 样受体基因表达变化的相关研究主要集中于单一组织(Yang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012), 所以关于不同类型 Toll 样受体在不同组织参与免疫调控机理以及生理功能差异还有待进一步研究。

本文比较和分析了目前所知的几种凡纳滨对虾 Toll 样受体基因在虾体感染不同病原微生物后不同免疫组织中的表达变化差异。同时比较了短期和长期感染情况下, 不同组织中几种 Toll 样受体的表达变化情况, 并初步探讨了不同类型 Toll 样受体基因参与先天免疫调控的机理, 为进一步研究凡纳滨对虾的免疫调控机制和不同类型 Toll 样受体的具体生理功能差异提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

凡纳滨对虾采自上海申漕特种水产开发公司, 体长(12 ± 0.8)cm, 体重(10.8 ± 0.6)g。选取体格健壮, 规格大致相同的实验用虾分养于多个水族缸里。实验开始前, 随机抽取实验用虾进行白斑综合症病毒和

溶藻弧菌感染检测, 以确保实验用虾不存在病原体感染。养殖期间保持自然光照, 水温(26 ± 1)°C, 盐度 30 ± 0.5 , pH 值 8.0 ± 0.2 , 24h 保持人工通气和循环过滤海水。感染实验前实验用虾驯养 1 周, 使其适应实验环境。

1.2 方法

1.2.1 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)菌悬液的制备 参考刘志刚等(2012)制备方法将经液体石蜡保藏法保存的溶藻弧菌菌种接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基上(蛋白胨 0.5g, 牛肉膏 0.3g, 酵母粉 0.1g, NaCl 2g, 去离子水 100mL, pH 调至 7.2 左右)活化后, 再经 TCBS 培养基活化一次, 37°C 培养 24h, 然后挑取长势良好的溶藻弧菌菌落接种到牛肉膏蛋白胨培养基中, 放置于恒温振荡培养箱。在 28°C, 200r/min 条件下富集培养 24h 后, 在 4°C, 4000r/min 条件下离心 10min, 将上清液弃去, 采用无菌生理盐水洗涤沉淀 2 次。利用细菌平板计数法, 按要求稀释成浓度为 2.4×10^6 CFU/mL 的菌悬液, 于 4°C 冰箱中保存备用。

1.2.2 白斑综合症病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)病毒的制备 WSSV 病毒精提液病毒粒子由上海海洋大学食品学院王永杰教授处提供, 原浓度 1×10^8 copy/ μ L, -80°C 保存, 使用之前将病毒液在冰上解冻, 用预冷的无菌生理盐水将浓度稀释为 10^3 copy/ μ L。

1.2.3 感染试验 随机挑选健康规格一致的虾体作为实验用虾, 平均体重为 11.45g。将实验用虾分为两组, 采用为肌肉注射法进行致病微生物感染。其中一组注射 0.2mL 浓度为 2.4×10^6 CFU/mL 的溶藻弧菌; 另一组注射 0.2mL 浓度为 10^3 copies/ μ L 的白斑综合症病毒, 每组分三个平行组, 每个平行组为 30 尾虾。分别于注射后 0、1、3、6、9、12、24h 收集各组组织样品。注射 14d 后, 收集存活个体血淋巴及鳃组织样品。各组织样品于 -80°C 冰箱中保存, 以用于后续实验各目的基因表达量的测定。

1.2.4 总 RNA 的提取 将冻存的组织样品取出, 匀浆后, 按照 TRIzol[®] reagent 试剂盒操作说明提取总 RNA。采用核酸蛋白测定仪测定所提 RNA 样品的 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 值, 以确定 RNA 的浓度, 并用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值判断其纯度。0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

1.2.5 反转录及引物设计 按照 TaKaRa PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒操作说明, 将之前所提取

的总 RNA 反转录获得 cDNA。反转录产物于 -20°C 保存备用。根据本实验之前所克隆的凡纳滨对虾 Toll 样受体基因片段序列(叶旻玉等, 2008)以及目前已报道的几种凡纳滨对虾 Toll 样受体基因(GenBank 序列号: JN180638, JN180637)和 18S 基因的序列(NCBI GenBank 序列号: EU920969)设计特异性引物(表 1)。

表 1 Real-time PCR 检测所用引物序列

Tab.1 Nucleotide sequences of the primers used in Real-time PCR

| 引物 | 序列 |
|-------|-----------------------|
| T1F | GCTAATCTGACCATCCCTA |
| T1R | TCTCGTCCAACCTCGCTCT |
| T2F | CATGCCTGCAGGACTGTTA |
| T2R | GGCCTGAGGGTAAGGTCTTC |
| T3F | TCGTACAACCAGCTGACGAG |
| T3R | ATACTTCAGGTGGGCCACAG |
| 18S F | CCTCGTTCTATTTGTCGGTTT |
| 18S R | GCAGATGCTTTCGAGTAGGT |

使用 ABI PRISM[®] 7900 Sequence Detection System 仪器, 参照 SYBR[®]Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒说明对实验各组样品的 Toll 样受体基因、18S 基因 cDNA 进行定量测定。ABI PRISM[®] 7900 Sequence Detection System 的具体反应程序设计为:

95°C 预变性 20s, 95°C 变性 3s, 60°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 共 40 个循环。最后进行融解曲线分析, 以确定 PCR 产物质量。

1.3 数据统计与分析

Real-time PCR 分析中, 采用 $2^{-\Delta\Delta t}$ 算法对各组样品所测基因进行定量分析。最后采用目的基因与内参基因 18S 的比值来表示目的基因的相对定量结果。所有数据采用平均值 \pm 标准差(means \pm SD)表示。采用 SPSS 18.0 统计软件来分析数据, 用 Duncan's multiple range test 来检验统计差异, 当 $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾不同类型 Toll 样受体基因的组织表达情况

通过 real-time PCR 法检测发现三种 Toll 样受体基因在所测各组织中均有表达。Toll1 基因在肌肉、血淋巴、心脏和鳃均有较高表达, 其中心脏表达量最高; Toll2 基因在血淋巴、心脏和鳃均有较高表达, 其中在鳃表达量最高; Toll3 基因在鳃和心脏有较高表达, 其中在鳃表达量最高(图 1)。

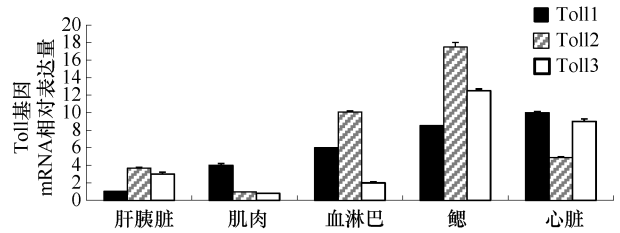


图 1 凡纳滨对虾 3 种 Toll 样受体基因在不同组织表达情况

Fig.1 The expressions of 3 Toll mRNA in different tissues of white shrimp
所有数据均采用平均值 \pm 标准差来表示($n=5$)

2.2 感染溶藻弧菌后凡纳滨对虾不同类型 Toll 样受体基因表达变化情况

感染实验结果表明: 在溶藻弧菌感染后 1h, 实验用虾血淋巴 3 种 Toll 样受体基因 mRNA 水平均显著提高($P < 0.05$), 分别为感染前水平的 4.51 倍、2.34 倍和 3.17 倍(图 2)。感染 6h 后 Toll2 mRNA 水平达到最高值, 为感染前水平的 12.89 倍, 且明显高于 Toll1 和 Toll3 mRNA 水平。感染后 12h 后 Toll1 和 Toll3 mRNA 水平均达到最高值, 分别为感染前水平的 12.62 倍和 6.68 倍, 其中 Toll1 mRNA 水平显著高于其它 2 种受体。感染后 24h 后 3 种 Toll 样受体基因 mRNA 水平均下降, 分别为感染前水平的 3.86 倍、4.31 倍和 2.98 倍, 仍明显高于感染前水平($P < 0.05$), 且 Toll2 mRNA 水平显著高于其它 2 种 Toll 样受体基因。

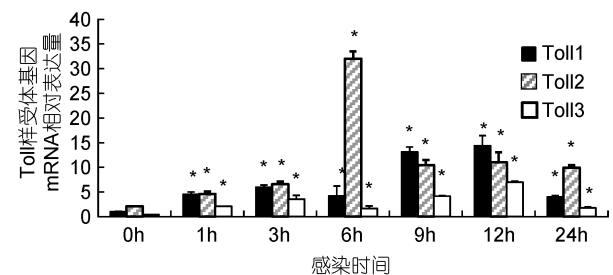


图 2 溶藻弧菌感染后凡纳滨对虾血淋巴 Toll 样受体基因表达变化情况

Fig.2 Changes of three Toll mRNA levels at the haemolymph of white shrimp after injection of *V. alginolyticus* Data are represented as means \pm SEM ($n=35$).
所有数据均采用平均值 \pm 标准差来表示($n=35$). *表示差异显著 ($P < 0.05$)

在溶藻弧菌感染后 1h, 实验用虾鳃中 Toll1 和 Toll2 mRNA 水平均提高, 分别为感染前水平的 1.22 倍和 1.35 倍, 但相对于感染前水平差异不显著($P > 0.05$), 其中 Toll1 mRNA 水平显著高于其它 2 种受体(图 3)。感染 3h 后 Toll1 mRNA 水平达到最高值, 为

感染前水平的 2.78 倍, 明显高于感染前水平 ($P < 0.05$)。感染后 12h 后 Toll3 mRNA 水平达到最高值, 为感染前水平的 5.85 倍, 明显高于感染前水平 ($P < 0.05$)。感染后 24h, Toll1 和 Toll2 mRNA 水平分别为感染前水平的 1.12 倍和 1.45 倍, 且差异不显著 ($P > 0.05$), 而 Toll3 mRNA 水平显著高于感染前水平, 为感染前水平的 4.61 倍, 且显著高于 Toll1 和 Toll2 mRNA 水平 ($P < 0.05$)。在溶藻弧菌感染 24h 内, 凡纳滨对虾鳃的 Toll2 mRNA 水平相对感染前水平均无显著升高 ($P > 0.05$)。

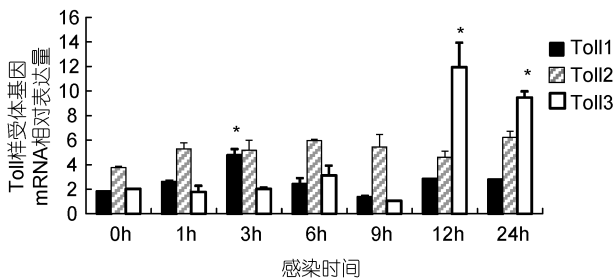


图3 溶藻弧菌感染后凡纳滨对虾鳃 Toll 样受体基因表达变化情况

Fig.3 Changes of three Toll mRNA levels at the gill of white shrimp after injection of *V. alginolyticus*
所有数据均采用平均值±标准差来表示($n=35$), *表示差异显著 ($P < 0.05$)

2.3 感染 WSSV 后凡纳滨对虾不同类型 Toll 样受体基因表达变化情况

感染实验结果表明: 在 WSSV 感染后 1h, 实验用虾血淋巴 3 种 Toll 样受体基因 mRNA 水平相对于感染前均无显著提高。感染 3h 后 3 种 Toll 样受体基因 mRNA 水平均显著提高 ($P < 0.05$), 分别为感染前水平的 9.10 倍、11.43 倍和 8.72 倍, 其中 Toll2 mRNA 水平明显高于其它 2 种 Toll 基因(图 4)。感染 6h 后 3 种 Toll mRNA 水平均达到最高值, 分别为感染前水平的 13.27 倍、34.56 倍和 9.31 倍, 其中 Toll2 mRNA 水平仍明显高于其它 2 种 Toll 基因 mRNA 水平 ($P < 0.05$)。感染后 9h 后 3 种 Toll mRNA 水平均明显下降, 其中 Toll1 mRNA 水平为感染前的 2.62 倍, 仍明显高于感染前水平 ($P < 0.05$), 且明显高于其它 2 种 Toll 基因 mRNA 水平 ($P < 0.05$)。感染后 12h, 3 种 Toll mRNA 水平分别为感染前水平的 2.21 倍、3.75 倍和 4.19 倍, 均显著高于感染前水平 ($P < 0.05$), 其中 Toll2 mRNA 水平显著高于其它 2 种 Toll 基因。感染后 24h, Toll1 mRNA 水平为感染前的 2.48 倍, 显著高于感染前水平 ($P < 0.05$), Toll2 和 Toll3 mRNA 水平分别为感

染前水平的 1.25 倍和 1.39 倍, 与感染前水平差异不显著 ($P > 0.05$)。

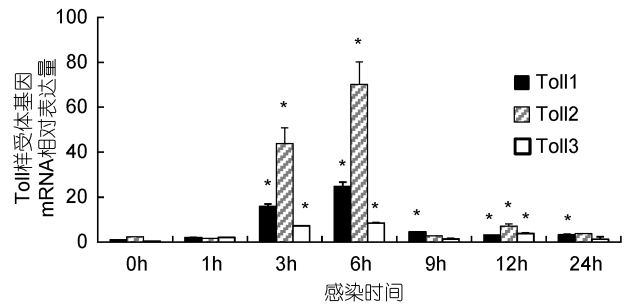


图4 WSSV 感染后凡纳滨对虾血淋巴 Toll 样受体基因表达变化情况

Fig.4 Changes of three Toll mRNA levels at the haemolymph of white shrimp after injection of WSSV
所有数据均采用平均值±标准差来表示($n=35$), *表示差异显著 ($P < 0.05$)

WSSV 感染后 1h, 实验用虾鳃 3 种 Toll 样受体基因 mRNA 水平相对于感染前均无显著提高 ($P > 0.05$), 其中 Toll2 mRNA 水平显著高于其它 2 种基因(图 5)。感染 3h 后 3 种 Toll 样受体基因 mRNA 水平均显著提高 ($P < 0.05$), 分别为感染前水平的 7.12 倍、5.89 倍和 6.18 倍, 其中 Toll2 mRNA 水平最高, Toll1 次之。感染 6h 后 3 种 Toll mRNA 水平均达到最高值, 分别为感染前水平的 11.02 倍、5.91 倍和 7.65 倍, 其中 Toll3 mRNA 水平明显低于其它 2 种基因, 而 Toll1 与 Toll2 mRNA 水平之间差异不显著 ($P > 0.05$)。感染后 9h 后 3 种 Toll mRNA 水平均明显下降, 分别为感染前水平的 2.39 倍、0.86 倍和 1.51 倍, 其中 Toll1 mRNA 水平明显高于感染前水平和其它 2 种基因 ($P < 0.05$)。感染后 12h, Toll1 与 Toll3 基因表达量明显提高 ($P < 0.05$), 分别为感染前水平的 4.36 倍和 3.85 倍, 明显高于感染前水平, 其中 Toll1 mRNA 水平最高, Toll3 次之。感染 24h 后, 3 种 Toll mRNA 水平分别为感染前水平的 1.07 倍、0.73 倍和 1.38 倍, 与感染前水平差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 感染溶藻弧菌或 WSSV 14d 后凡纳滨对虾 3 种 Toll 样受体基因表达情况

感染溶藻弧菌 14d 后, 试验用虾存活率为 25.56%。采用 Real-time PCR 技术对存活个体的血淋巴及鳃部样品进行检测。存活个体血淋巴 3 种 Toll mRNA 水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 分别为感染前水平的 16.88 倍、18.79 倍和 3.07 倍, 其中 Toll2 mRNA 水平明显高于其它 2 种基因 ($P < 0.05$), Toll3 mRNA 水平最低; 鳃部 3 种 Toll mRNA 水平均显著

高于对照组 ($P < 0.05$), 分别为感染前水平的 17.34 倍、6.04 倍和 6.76 倍, 其中 Toll1 mRNA 水平明显高于其它 2 种基因 ($P < 0.05$), 而 Toll3 mRNA 水平最低 (图 6)。

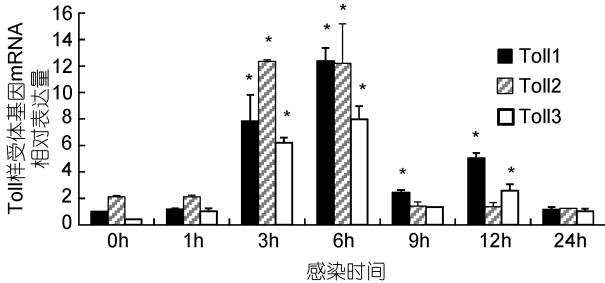


图 5 WSSV 感染后凡纳滨对虾鳃 Toll 样受体基因表达变化情况

Fig.5 Changes of three Toll mRNA levels at the gill of white shrimp after injection of WSSV
所有数据均采用平均值±标准差来表示 ($n=35$)。*表示差异显著 ($P < 0.05$)

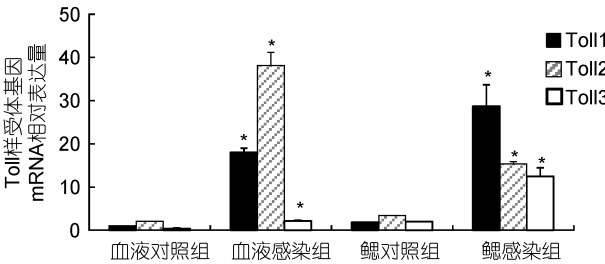


图 6 溶藻弧菌感染 14d 后凡纳滨对虾 Toll 样受体基因表达变化情况

Fig.6 Changes of three Toll mRNA levels of white shrimp 14 days after injection of *V. alginolyticus*
所有数据均采用平均值±标准差来表示 ($n=35$)。*表示差异显著 ($P < 0.05$)

感染 WSSV 14d 后, 试验用虾存活率为 11.67%。存活个体血淋巴 3 种 Toll mRNA 水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 分别为感染前水平的 105.15 倍、36.13 倍和 18.46 倍, 其中 Toll1 mRNA 水平最高, 明显高于其它 2 种基因 ($P < 0.05$), Toll3 mRNA 水平最低; 鳃部 3 种 Toll mRNA 水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 分别为感染前水平的 7.21 倍、17.76 倍和 2.82 倍, 其中 Toll2 mRNA 水平最高, 明显高于其它 2 种基因 ($P < 0.05$), Toll3 mRNA 水平最低 (图 7)。

3 讨论

本研究发现凡纳滨对虾三种 Toll 样受体基因在各组织中均有表达。其中 Toll1 基因在肌肉, 血淋巴, 心脏和鳃均有较高表达, 且心脏表达量最高; Toll2 基

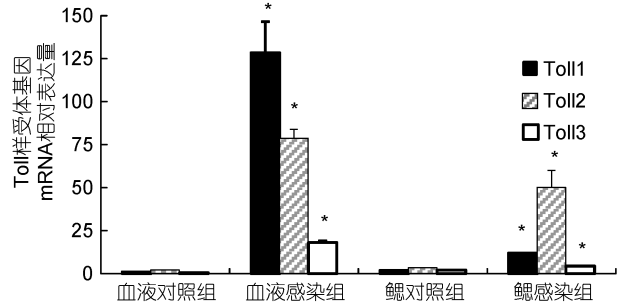


图 7 WSSV 感染 14d 后凡纳滨对虾 Toll 样受体基因表达变化情况

Fig.7 Changes of three Toll mRNA levels of white shrimp 14 days after injection of WSSV
所有数据均采用平均值±标准差来表示 ($n=35$)。*表示差异显著 ($P < 0.05$)

因在血淋巴, 心脏和鳃均有较高表达, 其中在鳃表达量最高; Toll3 基因在鳃和心脏有较高表达, 其中在鳃表达量最高。这与 Yang 等(2008)在中国明对虾, Wang 等(2012)在凡纳滨对虾的研究报道相一致。鳃与血淋巴是甲壳动物受到致病微生物感染的主要组织和器官 (Johansson *et al*, 2000), 也是机体进行先天性免疫的主要部位。因此, Toll 样受体基因在鳃和血淋巴的高表达, 将有利于 Toll 样受体基因识别相关病原体, 介导先天性免疫反应, 从而抵抗病原微生物的感染。

本研究还发现, 人工感染 WSSV 后 6h 内, 凡纳滨对虾鳃部和血淋巴中 3 种不同类型的 Toll 样受体 mRNA 水平均显著提高, 且均达到各自表达量的峰值。随后 3 种 Toll 样受体 mRNA 水平逐渐下降, 在人工感染 WSSV 24h 后, 除血淋巴 Toll1 mRNA 水平仍显著高于对照组水平, 其余两种 Toll 样受体基因 mRNA 水平均回落到感染前水平, 这与 Wang 等(2012)的研究结果相一致。同时有研究报道, poly I:C 和咪喹莫特 (Imiquimod) 可以明显提高日本囊对虾 Toll 样受体基因的表达量, 从而显著提高虾体感染 WSSV 后的存活率 (Kono *et al*, 2015)。由此推测凡纳滨对虾 Toll 样受体基因可能参与 WSSV 感染所引起的免疫调控。甲壳动物在外源病原微生物感染以后, 缺乏一套像脊椎动物一样完善的后天性免疫系统 (获得性免疫系统), 而主要依靠先天性免疫系统抵御病毒和细菌等病原微生物入侵。先天性免疫系统的激活, 主要是通过自身的模式识别受体 (Pattern recognition receptor, PRR) 与病毒和细菌上存在的病原相关分子模式 (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 特异性结合来实现 (Akira *et al*, 2006)。Toll 样受体就是一种重要的先天性免疫模式识别受体 (PRR)。因此当

WSSV 感染虾体后, 凡纳滨对虾 Toll 样受体基因在病毒感染的主要部位鳃和血淋巴中大量表达, 通过识别相关的病原相关分子模式, 激活相关下游信号转导, 从而参与虾体的先天性免疫调控。

与之前的病毒感染实验结果不同, 在人工感染溶藻弧菌 3h 后, 凡纳滨对虾鳃部 Toll1 mRNA 水平显著提高, 但 Toll2 mRNA 水平并无显著性提高, Toll3 mRNA 水平直到感染后 12h 才开始有显著提高, 这与 Yang 等(2008)在中国明对虾以及 Wang 等(2012)在凡纳滨对虾的研究成果相似。同时有研究发现, 通过 RNAi 技术介导 Toll1 基因沉默后会明显提高凡纳滨对虾 *Vibrio harveyi* 感染后的死亡率(Wang *et al.*, 2010)。因此说明 Toll1 在凡纳滨对虾细菌感染所引起的免疫调控中发挥着重要作用。但随后通过对溶藻弧菌感染虾体的血淋巴中 Toll 样受体基因的表达情况研究发现, 3 种 Toll 样受体基因 mRNA 水平在感染后均有显著提高, 其中 Toll2 mRNA 水平在感染后 6h 达到最高值, 且明显高于其它 2 种 Toll 基因, 而 Toll1 和 Toll3 mRNA 水平在感染后 12h 达到最高值, 这与 Wang 等(2012)在凡纳滨对虾中的研究结果有所不同。Wang 等(2012)的研究发现溶藻弧菌感染只能引起凡纳滨对虾鳃部 Toll1 基因的表达显著升高, 而 Toll2 与 Toll3 基因的表达并无显著变化。我们推测造成结果差异的主要原因可能是不同类型的 Toll 样受体基因参与虾体免疫调控的主要部位有所不同。血淋巴细胞是甲壳动物免疫系统中十分重要的组成部分, 其细胞免疫主要是通过血细胞。由于甲壳动物不具有抗体介导的后天获得性免疫, 所以其体液免疫也主要通过血淋巴中的一些相关酶(如溶菌酶、酚氧化酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶和超氧化物歧化酶等)以及免疫相关因子(如抗菌肽、凝集素、溶血素等)来实现(刘靖华等, 2001), 例如: 凡纳滨对虾在感染弧菌后, 其血淋巴中 Toll 样受体基因和溶菌酶基因的表达均会显著上调(Burge *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010), Toll 样受体基因可能通过介导下游信号传导, 从而促进血淋巴中溶菌酶基因的表达, 最终参与体液免疫调控。溶菌酶通过水解构成细菌细胞壁成分的多糖胞壁质中的 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1, 4-糖苷键, 从而使细菌因渗透压不平衡而破裂, 达到防御外源致病细菌的侵害(徐海圣等, 2001)。同时有研究发现, 凡纳滨对虾 Toll2 基因具有明显增强相关抗菌肽基因启动子活性的作用(Wang *et al.*, 2012)。除此之外, β -葡聚糖, 脂多糖以及肽聚糖均可

以显著提高日本囊对虾以及中华绒螯蟹血淋巴中 Toll2 基因的表达量(Mekata *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2013), 而 β -葡聚糖, 脂多糖以及肽聚糖正是先天性免疫系统中各种致病细菌主要的病原相关分子模式(O'Neill, 2004; Akira *et al.*, 2006)。因此在凡纳滨对虾的免疫系统中, Toll2 基因极有可能通过提高在血淋巴中的表达, 从而参与由细菌所引起的免疫调控。所以本研究推测在外源细菌感染以后, 凡纳滨对虾血淋巴以及鳃中 Toll1 与 Toll3 基因表达量明显升高, 从而介导下游信号转导, 参与虾体的先天性免疫。而 Toll2 基因虽然在鳃中表达量没有显著提高, 而是通过提高在血淋巴中的表达量, 从而增加对相关病原相关分子模式的识别, 刺激相关免疫因子或酶的表达, 最终共同参与病原细菌感染所引起的免疫调控。但是关于不同类型 Toll 样受体基因在凡纳滨对虾先天性免疫调控中的具体生理功能和调控机制的差异还有待进一步的研究。

除此之外, 本研究还通过对感染 WSSV 或溶藻弧菌 14d 后的存活个体的 Toll 样受体基因表达情况检测发现, 在感染 WSSV 或溶藻弧菌 14d 后的存活个体的鳃部和血淋巴中 3 种 Toll mRNA 水平均显著高于对照组, 其中感染 WSSV 个体血淋巴中 Toll1 mRNA 水平最高, 鳃部 Toll2 mRNA 水平最高; 感染溶藻弧菌个体中, 血淋巴的 Toll2 mRNA 表达水平最高, 而在鳃部以 Toll1 mRNA 的表达水平为最高, 以上结果与之前凡纳滨对虾感染 WSSV 或溶藻弧菌后短期内 Toll 样受体基因的表达情况有所不同。在致病细菌或病毒感染的早期, 凡纳滨对虾 Toll 样受体基因表达水平在短时间内迅速升高, 从而启动先天性免疫。但在达到一定峰值后, 由于 Toll 信号转导通路中的多种负向调控因子的负反馈作用(Liew *et al.*, 2005), 从而导致 Toll 样受体基因表达水平在短时间内(24h 内)又恢复到感染前水平。但是在长期感染过程中, 可能由于较高浓度的病原微生物的持续刺激, 生物体只有在主要感染部位(鳃与血淋巴)不断保持较高的 Toll 样受体基因表达水平, 从而将免疫水平维持在一个较高的水平, 才可以抵抗病毒或细菌的不断侵害, 这也可能是感染 WSSV 或溶藻弧菌 14d 后, 虾体血淋巴及鳃中各种 Toll 样受体基因表达水平均显著高于对照组的主要原因。

4 结论

本研究首次比较了凡纳滨对虾在短期或长期感

染不同病原微生物情况下,不同免疫组织中几种 Toll 样受体基因的表达变化情况,并分析了不同类型 Toll 样受体基因参与先天免疫调控的机理,推测凡纳滨对虾已知的三种 Toll 样受体可能参与病毒或弧菌所引起的不同组织的免疫调控,为进一步研究凡纳滨对虾的先天免疫调控机理以及不同类型 Toll 样受体的具体生理功能差异提供理论基础。

参 考 文 献

- 王兴强, 马 甦, 董双林, 2004. 凡纳滨对虾生物学及养殖生态学研究进展. 海洋湖沼通报, (4): 94—100
- 叶旻玉, 刘利平, 戴习林等, 2008. 凡纳滨对虾 Toll 样受体基因 cDNA 片段的克隆及序列分析. 上海水产大学学报, 17(3): 263—267
- 刘志刚, 张其中, 张占会等, 2012. 近江牡蛎 *HSC70* 基因对溶藻弧菌感染的反应. 中国水产科学, 19(3): 500—508
- 刘靖华, 赵克森, 2001. TLR 与天然免疫反应. 免疫学杂志, 17(S1): 17—20
- 罗 兵, 李 涛, 徐元宏, 2011. Toll 样受体的信号转导及抗感染免疫研究进展. 免疫学杂志, 27(2): 165—169
- 徐海圣, 徐步进, 2001. 甲壳动物细胞及体液免疫机理的研究进展. 大连水产学院学报, 16(1): 49—56
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O, 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783—801
- Arts J A J, Cornelissen F H J, Cijssouw T *et al*, 2007. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(3): 504—513
- Burge E J, Madigan D J, Burnett L E *et al*, 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(4): 327—339
- Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K *et al*, 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1—3): 45—52
- Kawai T, Akira S, 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5): 637—650
- Kono T, Biswas G, Fall J *et al*, 2015. Adjuvant effects of poly I: C and imiquimod on the immunization of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) with a recombinant protein, VP28 against white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 446: 236—241
- Liew F Y, Xu D M, Brint E K *et al*, 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 5(6): 446—458
- Mekata T, Kono T, Yoshida T *et al*, 2008. Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 24(1): 122—133
- O'Neill L A J, 2004. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends in Immunology*, 25(12): 687—693
- O'Neill L A J, Golenbock D, Bowie A G, 2013. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(6): 453—460
- Wang K C H C, Tseng C W, Lin H Y *et al*, 2010. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (*LvToll*) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(1): 49—58
- Wang P H, Liang J P, Gu Z H *et al*, 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (*LvToll2* and *LvToll3*) and three putative Spätzle-like Toll ligands (*LvSpz1-3*) from *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 36(2): 359—371
- Yang C J, Zhang J Q, Li F H *et al*, 2008. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 24(5): 564—574
- Yang L S, Yin Z X, Liao J X *et al*, 2007. A Toll receptor in shrimp. *Molecular Immunology*, 44(8): 1999—2008
- Yu A Q, Jin X K, Guo X N *et al*, 2013. Two novel Toll genes (*EsToll1* and *EsToll2*) from *Eriocheir sinensis* are differentially induced by lipopolysaccharide, peptidoglycan and zymosan. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(4): 1282—1292

THE EXPRESSION OF TOLL—LIKE RECEPTORS IN DIFFERENT TISSUES OF *LITOPENAEUS VANNAMEI* AFTER CHALLENGES WITH WHITE SPOT SYNDROME VIRUS AND *VIBRIO ALGINOLYTICUS*

LI Jing-Jing¹, LI Yun¹, LIU Hong¹, DAI Xi-Lin¹, JIANG Fei², DING Fu-Jiang²

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shencao Special Aquatic Product Development Company, Shanghai 201516, China)

Abstract In the present research, the expression of three types of Toll-like receptors mRNAs in different tissues of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, were detected with Real-time PCR. The results indicated that Toll1 was expressed in muscle, heart, haemocyte and gill with high level, while the highest expression was in the heart. Toll2 was expressed in heart, haemocyte and gill with high level and the highest expression was in the gill. Meanwhile, the highest expression of Toll3 was detected in gill. All the expressions of three types of Toll enhanced significantly after the White Spot Syndrome Virus (WSSV) challenge. The significant enhancements of three types of Toll mRNAs were observed in haemocyte after the *Vibrio alginolyticus* challenge and the expressions of Toll1 and Toll2 rose remarkably in gill after 3 hours and 12 hours post-*V. alginolyticus* challenge. Therefore, these results suggest that all the 3 types of Toll-like receptors would regulate the immunisation against the White Spot Syndrome Virus. During the *V. alginolyticus* infection, the immunisation in gill would be regulated by Toll1 and Toll3, while Toll2 will participate in the regulation of immunisation in haemocyte. Additionally, the expression of 3 types of Toll-like receptors significantly enhanced after 2 weeks post WSSV or *Vibrio alginolyticus* challenges, which might be involved in the high level of immunisation during the long-term infection.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Toll-like receptor; real-time PCR; *Vibrio alginolyticus*; White Spot Syndrome Virus