

塔玛亚历山大藻对中国明对虾免疫相关基因表达和抗病力的影响

梁忠秀^{1,2}, 李健^{2*}, 刘萍², 李吉涛², 赵法箴²

(1.上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200306; 2.中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:以一株能产生麻痹性贝毒(Paralytic Shellfish Poison, PSP)的赤潮甲藻塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*, ATHK 株)为研究对象,研究了其对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)免疫相关基因(TLR 和 Relish 基因)表达和抗病力的影响。结果表明:200 cells·mL⁻¹ 塔玛亚历山大藻胁迫 72~144 h, 中国明对虾的肝胰腺、鳃和血淋巴的 TLR 和 Relish 基因表达或被显著抑制 ($P < 0.05$),或恢复至海水对照组水平 ($P > 0.05$);而 1000 cells·mL⁻¹ 藻中对虾鳃组织和血淋巴的上述基因表达在 48~144 h 被显著抑制 ($P < 0.05$),肝胰腺的表达在 72~144 h 被显著抑制 ($P < 0.05$)。塔玛亚历山大藻胁迫下投喂感染 WSSV 的病虾后,加藻的感染组和未加藻的感染组的中国明对虾虽然都在第 3 d 时检测到阳性结果,7 d 内累积死亡率为 100%,但同一时间点加藻组的累积死亡率高于未加藻组。塔玛亚历山大藻胁迫 6 d 后的中国明对虾,经鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)人工急性感染后,两个加藻组在同一取样时间点的累积死亡率高于未加藻的海水对照组,且随着藻浓度升高而有升高的趋势。研究表明塔玛亚历山大藻可影响中国明对虾 TLR 和 Relish 基因表达,从而影响机体的抗病力。

关键词:中国明对虾;塔玛亚历山大藻;TLR;Relish;抗病力

中图分类号:X503.225 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)11-2271-07 doi:10.11654/jaes.2013.11.024

Influences of Toxic Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on Relative Expression of Immune Related Genes and Disease Resistance in *Fenneropenaeus chinensis*

LIANG Zhong-xiu^{1,2}, LI Jian^{2*}, LIU Ping², LI Ji-tao², ZHAO Fa-zhen²

(1.College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200306, China; 2.Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (ATHK), a producer of paralytic shellfish poison, is often found in *Fenneropenaeus chinensis* ponds. Here we studied the influence of *A. tamarense* on relative expressions of immune related genes (TLR gene and Relish gene) and disease resistance in the Chinese shrimp *F. chinensis*. Individuals of *F. chinensis* were exposed to 200 cells·mL⁻¹ and 1000 cells·mL⁻¹ *A. tamarense*, and their TLR gene and Relish gene expressions were then determined at 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 h and 144 h. Under exposure to 200 cells·mL⁻¹ *A. tamarense*, the relative expressions of TLR gene and Relish gene were not consistently inhibited in the hepatopancreas, gill and hemolymph of the shrimp between 72 h and 144 h. However, such expressions were significantly inhibited under exposure to 1000 cells·mL⁻¹ *A. tamarense* in the gill and hemolymph within 48~144 h and in the hepatopancreas between 72 h and 144 h. After the individuals of *F. chinensis* pre-exposed to *A. tamarense* (200 cells·mL⁻¹ and 1000 cells·mL⁻¹) were artificially infected with WSSV, a positive infection by the WSSV was detected after 3 days. The cumulative mortality of *F. chinensis* was 100% after 7 days for exposure to both *A. tamarense* and seawater control, but was higher in the *A. tamarense* group than in the seawater control group at the same sampling time. In addition, when shrimps were exposed to *A. tamarense* for 6 days, followed by infection with *Vibrio anguillarum*, their cumulative mortality at the same sampling time was still higher in the *A. tamarense* group than that in the seawater control. Therefore, it is suggested that *A. tamarense* affect the relative expressions of TLR and Relish genes and disease resistance in *F. chinensis*.

Keywords: *Fenneropenaeus chinensis*; *Alexandrium tamarense*; TLR; Relish; disease resistance

收稿日期:2013-05-28

基金项目:国家虾产业技术体系专项(CARS-47);国家高技术研究发展计划:主要养殖甲壳类良种培育(2012AA10A409);公益性行业(农业)科研专项(201103034);山东省自主创新专项:重要海水养殖生物种质创新及疾病阻断制剂开发(2013CX80202)

作者简介:梁忠秀(1977—),女,山东平度人,博士研究生,主要从事对虾健康养殖方向的研究。E-mail:liangzhongxiu123@163.com

*通信作者:李健 E-mail:lijian@ysfri.ac.cn

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国北方池塘主要水产养殖品种之一^[1],但频繁发生的疾病尤其白斑病(WSD)及弧菌病,制约了其养殖业持续、健康发展。黄翔鹄等^[2]认为疾病的发生与虾体抗病力和其环境因素有密切的关系,其中环境因素不仅影响病原体的数量,也影响虾体抗病能力。微藻是虾池微生态环境的一个重要成分,虾池中不同发育时期的对虾均直接或间接的以微藻为饵料^[3]。但能产生毒素的有害赤潮藻常在对虾养殖池出现^[4-5],影响对虾生理、代谢等机能,增加了对虾对存在于养殖环境中的病原微生物的易感性^[6],需对其危害进行评价分析。其中赤潮甲藻塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)是一种典型的麻痹性贝毒(Paralytic Shellfish Poison, PSP)产毒藻^[7],能通过多种方式导致海洋生物死亡或发生其他生理变化^[8-9]。目前已发现塔玛亚历山大藻对鱼类抗病力相关因子有不同程度影响^[10],但其对对虾免疫功能的影响尚缺乏相应的数据。Toll受体(Toll-like receptors, TLRs)是一类跨膜蛋白,是先天性免疫模式识别的主要受体^[11],国内外已将TLR基因的表达水平作为衡量虾类免疫机能的一项重要分子水平指标^[12]。Relish是Rel/NF- κ B家族蛋白成员之一,是位于细胞浆中重要的核转录因子,作为免疫信号通路的中枢,负责将信号从细胞质转入细胞核,调节通路下游抗菌肽等免疫因子基因的表达^[13]。TLR^[14-15]和Relish^[16]在介导对虾先天性免疫,抵抗外来病原微生物入侵方面起重要作用。

本实验通过研究中国明对虾在不同浓度的塔玛亚历山大藻胁迫后TLR基因和Relish基因的表达变化情况以及对机体抗WSSV和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)能力的影响,探讨塔玛亚历山大藻对虾类的危害机制,以期更好地了解有害赤潮藻对对虾养殖业造成的影响,为对虾的健康养殖提供理论依据和试验方法参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 中国明对虾

中国明对虾购自山东青岛宝荣水产科技发展有限公司,体长(6.8 ± 0.3)cm,体质量(3.6 ± 0.2)g。经对虾流行病病原检测试剂盒(由黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学研究室提供)检测,确定无WSSV感染。对虾暂养于实验室200 L的PVC桶中,每日投喂3次人工配合饵料,每日换水30%,盐度30.0,水温22~25℃,连续充气,1周后开始实验,正式实验前24 h停止投饵。

1.1.2 塔玛亚历山大藻

塔玛亚历山大藻(ATHK株)(由中国科学院海洋研究所提供)采用f/2配方培养液,置于光照培养箱中培养,培养温度(20 ± 1)℃,光照3000 lx,光暗比为14 h:10 h。塔玛亚历山大藻长至对数期,计数后用于实验。塔玛亚历山大藻细胞中PSP毒素成分有磺酰氨基酰基类毒素(C1、C2、B2)、膝沟藻毒素(GTX1、GTX2、GTX3、GTX4),其中GTX毒素的含量最高^[17]。

1.1.3 病原

实验用感染WSSV的病虾由黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学研究室提供,病虾肌肉组织切碎后充分混匀,用于中国明对虾投喂感染;实验用鳃弧菌为黄海水产研究所杨爱国实验室所赠,用无菌生理盐水稀释为 10^7 CFU·mL⁻¹的菌悬液,4℃保存,用于中国明对虾的人工急性感染。

1.2 实验分组

实验设海水对照组1、加藻对照组2(塔玛亚历山大藻藻密度为200 cells·mL⁻¹)、加藻对照组3(塔玛亚历山大藻藻密度为1000 cells·mL⁻¹)、感染组1、感染加藻组2(塔玛亚历山大藻藻密度为200 cells·mL⁻¹)、感染加藻组3(塔玛亚历山大藻藻密度为1000 cells·mL⁻¹)共6个组,其中海水对照组1设6个平行(其中3个平行用于后面鳃弧菌急性感染实验中的阴性对照),其余的每组设3个平行。每个平行随机放30尾对虾,实验在100 L的塑料整理箱中进行,海水经500目的筛绢过滤。

1.3 中国明对虾感染WSSV

采用投喂方式对中国明对虾进行人工感染。感染组投喂病虾肌肉组织,对照组投喂健康对虾肌肉组织,实验过程中及时吸出残饵和死亡对虾。每天统计死亡对虾的数量,并用对虾流行病病原检测试剂盒确定对虾的死因。每个平行每隔1 d随机取样1尾,用检测试剂盒检测对虾WSSV感染情况。

1.4 中国明对虾TLR和Relish基因表达

1.4.1 样品采集与处理

塔玛亚历山大藻暴露后第3、6、12、24、48、72、96、144 h分别从海水对照组1、加藻对照组2和加藻对照组3中随机选取6尾对虾,用1 mL一次性无菌注射器吸取0.5 mL抗凝剂,从中国明对虾的围心腔抽取0.5 mL血液,混合均匀后注入到1.5 mL无RNA酶的离心管中,4℃800×g离心15 min,得到的血细胞中加入1.0 mL TRIzol,漩涡振荡,置-80℃保存用于总RNA提取。迅速分离肝胰腺和鳃组织加液氮研磨

成粉末,取 50 mg 样品迅速转至 1.5 mL 离心管(内含 1.0 mL TRIzol 液),漩涡振荡,混匀后置-80 ℃保存用于总 RNA 提取。

1.4.2 TLR 和 Relish 基因的表达检测

总 RNA 提取和 cDNA 合成:总 RNA 的提取方法参考 Trizol 使用说明书,提取的总 RNA 用快速核酸/蛋白分析仪进行纯度和浓度测定,用 MOPS 琼脂糖电泳检测总 RNA 的完整性。在合成 cDNA 之前,用 DNase I,RNase-free 去除总 RNA 中残留的基因组 DNA。cDNA 合成方法参考 Reverse transcriptase M-MLV 使用说明书。

荧光定量 PCR: 根据 GenBank 中的中国明对虾 TLR (EF407561)、Relish (EU815055) 和 β -actin (DQ205426.1)基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计特异引物 TLR F/R、Relish F/R 和 actin F/R (表 1), β -actin 为内参基因。荧光定量 PCR 扩增体系及反应程序参考 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 说明书。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法进行相对定量分析。

表 1 实验中所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')
TLR-F	GCTTTCATCAGCTATTCTCACAAGGA
TLR-R	CCTGTGAGTGAGCCGCTTGAA
Relish-F	CCTGTGAAGACATTAGGAGGAGTA
Relish-R	CCAGTTGTGGCATTCTTTAGG
actin-F	AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGAC
actin-R	TTCTCCATGTCGTCCTCCAGT

注:F 代表正向引物,R 代表反向引物。

Note:F and R stand for forward primers and reverse ones, respectively.

1.5 中国明对虾感染鳃弧菌

塔玛亚历山大藻暴露 6 d 后,从海水对照组 1、加藻对照组 2 和加藻对照组 3 的各 3 个平行中分别取 10 尾对虾,每尾对虾分别注射鳃弧菌 20 μ L。从海水对照组 1 的其余 3 个平行中取 10 尾对虾注射等量的无菌生理盐水作为阴性对照。在人工注射弧菌后第 6、12、24、48、72、96 h 统计死亡对虾的数量。

1.6 统计分析

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm SD$)表示,采用 SPSS 16.0 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 塔玛亚历山大藻对中国明对虾感染 WSSV 的影响

塔玛亚历山大藻胁迫下投喂感染 WSSV 的病虾

后,各对照组对虾在实验过程中没有检测到病毒(表 2),感染组和感染加藻组虽然都在第 3 d 检测到阳性结果,第 4 d 和第 5 d 对虾大量死亡(图 1),7 d 内累积死亡率达 100%,但在同一时间点的累积死亡率感染加藻组高于感染组 1,且感染加藻组 3 高于感染加藻组 2。感染加藻组 3 的累积死亡率 6 d 内即达 100%。各组死亡的对虾经试剂盒检测显示 WSSV 阳性,对虾的死亡是由于感染了 WSSV 所致。

2.2 塔玛亚历山大藻对中国明对虾肝胰腺、鳃组织和血淋巴 TLR 和 Relish 基因表达的影响

不同浓度塔玛亚历山大藻胁迫下,中国明对虾的肝胰腺、鳃组织和血淋巴的 TLR 和 Relish 基因虽然呈现不同的表达模式,但在取样的中后时间点有相似的表达变化(图 2);200 cells $\cdot$ mL⁻¹ 塔玛亚历山大藻(加藻对照组 2)胁迫 72~144 h,中国明对虾的肝胰腺、鳃和血淋巴的 TLR 和 Relish 基因表达或被显著抑制 ($P<0.05$),或恢复至海水对照组的水平($P>0.05$)。而 1000 cells $\cdot$ mL⁻¹ 藻(加藻对照组 3)中对虾鳃组织和血淋巴

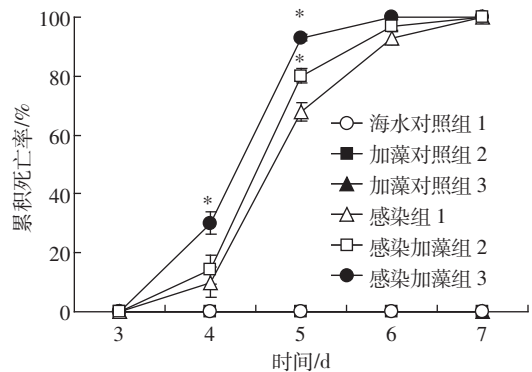
表 2 取样对虾 WSSV 病毒检测结果

Table 2 The WSSV detection results of shrimps in the experiment

实验时间/d	检测结果					
	海水对照组 1	加藻对照组 2	加藻对照组 3	感染组 1	感染加藻组 2	感染加藻组 3
1	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	+	+	+
5	-	-	-	+	+	+

注:“+”代表阳性,“-”代表阴性。

Note:“+” stand for positive result,“-” stand for negative result.

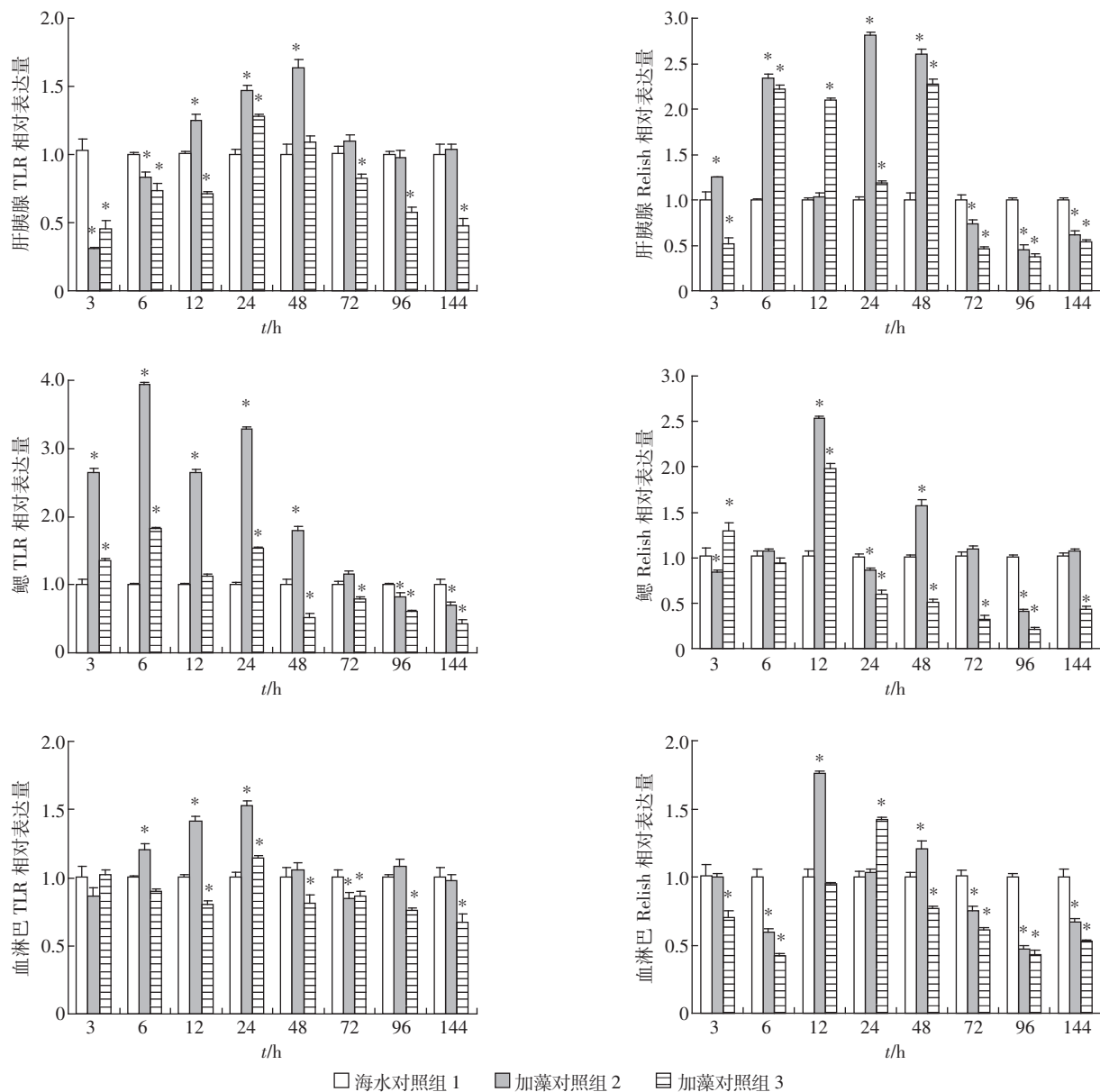


* 表示与感染组 1 相比差异显著($P<0.05$)

*means significant differences from that of infection group 1 at 0.05 level

图 1 塔玛亚历山大藻胁迫下中国明对虾经人工感染 WSSV 后的累积死亡率

Figure 1 Cumulative mortality of *F. chinensis* exposed to *A. tamarensis* and artificially infected with WSSV



* 表示与海水对照组 1 相比差异显著 ($P < 0.05$), 图 3 同

*means significant differences from tose of seawater control group 1 at 0.05 level. The same as Figure 3

图 2 塔玛亚历山大藻暴露下中国明对虾肝胰腺、鳃组织和血淋巴 TLR 和 Relish 基因相对表达量

Figure 2 Relative expressions of two immune genes in hepatopa-ncreas, gill and hemolymph of *F. chinensis* exposed to *A. tamarensis*

的上述基因表达在 48~144 h 被显著抑制 ($P < 0.05$), 肝胰腺的表达在 72~144 h 被显著抑制 ($P < 0.05$)。

肝胰腺的 TLR 基因在上述两个浓度的塔玛亚历山大藻胁迫下, 基本呈现钟形的表达变化曲线。暴露在 $200 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 藻液中, TLR 基因表达在 6 h 内被显著抑制 ($P < 0.05$), 12~48 h 显著上调 ($P < 0.05$), 72~144 h 恢复至海水对照组 1 的水平。而暴露在 $1000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 藻液中, 除 24 h 和 48 h 外, 该基因表达在其余时间点的表达均显著低于海水对照组 1 的水平

($P < 0.05$)。肝胰腺的 Relish 基因表达在上述两个浓度的塔玛亚历山大藻胁迫下, 都在 72~144 h 被显著抑制 ($P < 0.05$)。暴露在浓度为 $200 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 藻液中肝胰腺的 Relish 基因表达在 6 h 内显著上调 ($P < 0.05$), 经 12 h 恢复至海水对照组 1 的水平, 24~48 h 再次显著上调 ($P < 0.05$)。暴露在 $1000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 藻液中, 肝胰腺的 Relish 基因表达在 3 h 时被短暂抑制 ($P < 0.05$), 6~48 h 显著上调 ($P < 0.05$)。

鳃的 TLR 基因表达在 $200 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 塔玛亚历山

大藻胁迫下,在 3~48 h 显著上调($P<0.05$),72 h 恢复至海水对照组 1 的水平,96~144 h 被显著抑制($P<0.05$);暴露在 $1000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 藻液中,该基因表达在 3~6 h 显著上调($P<0.05$),12 h 恢复至海水对照组 1 的水平,24 h 再次上调($P<0.05$),48~144 h 后被显著抑制($P<0.05$)。鳃的 Relish 基因表达在 $200 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 塔玛亚历山大藻胁迫下,呈现波浪式变化,在 12 h 和 48 h 显著上调($P<0.05$),分别在 3、24、96 h 显著下调($P<0.05$),其他时间点,与海水对照组 1 的水平相近。暴露在 $1000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 藻液中,其表达在 3 h 时显著上调($P<0.05$),6 h 恢复至海水对照组 1 的水平,12 h 再次显著上调($P<0.05$),24~144 h 后被显著抑制($P<0.05$)。

血淋巴的 TLR 基因表达在 $200 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 塔玛亚历山大藻胁迫下,除 6、12、24 h 显著上调($P<0.05$)外,其他时间点与海水对照组 1 的水平相近。而 $1000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 塔玛亚历山大藻胁迫下,其表达除 3、6、24 h 外,均被显著抑制($P<0.05$)。血淋巴的 Relish 基因表达在 $200 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 塔玛亚历山大藻胁迫下,呈现波浪式变化,和鳃在该浓度胁迫下 Relish 基因表达相似,但血淋巴的该基因在 72~144 h 后被显著抑制($P<0.05$)。1000 $\text{cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 塔玛亚历山大藻胁迫下,除 12 h 和 24 h 外,其余时间点 Relish 基因的表达均被显著抑制($P<0.05$)。

2.3 塔玛亚历山大藻对中国明对虾感染鳃弧菌的影响

塔玛亚历山大藻胁迫 6 d 后,经鳃弧菌人工急性感染,注射生理盐水的阴性对照组实验期间累积死亡率为 0(图 3),其余各实验组均在 12 h 内大量死亡,其累积死亡率超过整个实验期间累积死亡率的 50%,48 h 后不再死亡,累积死亡率保持恒定,但两个加藻组在同一时间点的累积死亡率高于海水对照组,且随

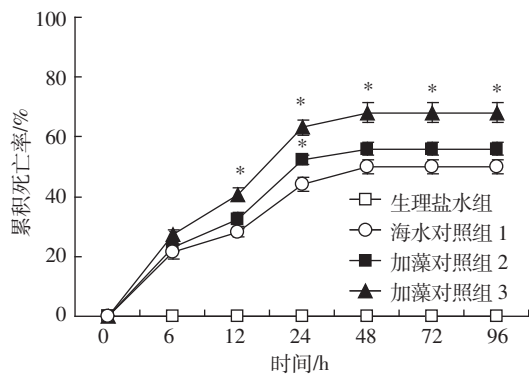


图 3 塔玛亚历山大藻暴露对中国明对虾经注射感染鳃弧菌后的累积死亡率

Figure 3 Cumulative mortality of *F. chinensis* exposed to *A. tamarense* followed by injection of *V. anguillarum*

着藻浓度升高而有升高的趋势。加藻对照组 3 在第 12 h 的累积死亡率为 40%, 显著高于海水对照组的 28%($P<0.05$)。

3 讨论

塔玛亚历山大藻是一种典型的 PSP 产毒藻,对鱼^[18]、贝类^[19]具有致毒效应,对虾类也有急性致死作用,谭志军等^[7]研究发现塔玛亚历山大藻(ATHK)对黑褐新糠虾(*Neomysis awatschensis*)96 h 半致死浓度(96 h LC_{50})为 $7000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$,王雪虹等^[20]研究发现塔玛亚历山大藻(ATDHO1)对南美白对虾(*Penaeus vannamei*)蚤状幼体的 96 h LC_{50} 为 $7500 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本实验所用的塔玛亚历山大藻 $1000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 是在该藻对中国明对虾急性毒性试验的基础上设定的,为 96 h LC_{50} 的 1/10,试验中没有出现对虾的死亡。

微藻与虾病的关系,国内外已有研究报道^[21-22],对虾多种病毒病的暴发与对虾养殖环境中的微藻密切相关^[23-24]。本研究中采用投喂方式对中国明对虾进行 WSSV 人工感染,各感染组虽都在第 3 d 检测到阳性结果,第 4 d 发病出现死亡,但在同一时间点的累积死亡率感染加藻组高于未加藻感染组,且随着藻浓度的升高而升高,表明塔玛亚历山大藻胁迫降低了对虾抗 WSSV 感染的能力。

TLR 和 Relish 基因在无脊椎动物抗病力方面的作用已在研究中得到证实。Wang 等^[25]研究发现凡纳滨对虾在 WSSV 感染后,TLR 基因表达上调。Toll 通路可能通过血细胞内聚合酶链式反应引发其抗病毒免疫机制^[26]。阎慧等^[27]研究发现注射未灭活 WSSV 病毒能引起中国明对虾 Relish 基因的明显上调表达,对虾可通过上调 Relish 基因的表达,抵御外界病毒的侵袭。

本研究中 $200 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 塔玛亚历山大藻胁迫 72~144 h,中国明对虾的肝胰腺、鳃组织和血淋巴的 TLR 和 Relish 基因表达或被显著抑制,或恢复至海水对照组的水平,而 $1000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 藻中对虾鳃组织和血淋巴的上述基因表达在 48~144 h 被显著抑制,肝胰腺的表达在 72~144 h 被显著抑制。TLR 和 Relish 基因表达被抑制可能降低了中国明对虾抗病毒的免疫防御能力,从而导致同一时间点感染加藻组的累积死亡率高于未加藻的感染组。

在无脊椎动物先天性免疫系统中发挥重要作用的抗菌肽主要通过 Toll 信号通路和 Imd 信号通路诱导产生^[28],而多数抗菌肽基因的表达则是通过 Imd-Relish 途径激活的^[29]。Lindsey S Garver 等^[30]用疟原虫

感染疟蚊研究 Imd 信号通路的相关因子,通过使 Relish 过表达后发现抗菌肽大量表达使得疟蚊的抗菌力增强。果蝇的 Relish 也在调节抗菌肽基因的表达方面起着关键性的作用^[31]。细菌注射可诱导疟蚊 Relish 转录表达上调^[32]。弧菌刺激下中国明对虾淋巴器官的 Relish 基因表达明显上调^[6]。因此,Relish 基因表达被抑制,可导致机体抗菌能力下降。Han-Ching 等^[15]研究表明凡纳滨对虾 TLR 基因 RNAi 被敲除后,凡纳滨对虾的死亡率显著增加,其对哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)的清除率显著降低,表明 TLR 基因参与抗弧菌的免疫反应。中国明对虾注射鳗弧菌后,TLR 基因表达显著上调^[14],凡纳滨对虾在受到溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)攻击后,其 TLR 基因表达也呈现上调^[25]。因此,对虾 TLR 的表达水平一定程度上反映了对虾对入侵病原识别的灵敏性,而对病原识别的灵敏性是评价机体免疫机能的核心内容之一,国内外已经将 TLR 基因的表达水平作为衡量虾类免疫机能的一项重要分子水平指标^[12]。本研究中塔玛亚历山大藻胁迫下,在采样的中后时间点对虾肝胰腺、鳃组织和血淋巴的 TLR 和 Relish 基因表达被抑制,表明塔玛亚历山大藻暴露会影响中国明对虾细胞免疫反应中异物入侵信号的传递,降低对虾对入侵病原识别的灵敏性,导致对虾抵御病原微生物的能力下降。不同浓度塔玛亚历山大藻暴露 6 d 的中国明对虾,经鳗弧菌人工急性感染后,两个加藻组在同一取样时间点的累积死亡率高于未加藻的海水对照组,且随着藻浓度升高而有升高的趋势,表明塔玛亚历山大藻长时间暴露降低了中国明对虾抗弧菌能力,其抗菌能力与检测的 TLR 和 Relish 基因表达量变化基本相吻合。

4 结论

塔玛亚历山大藻对中国明对虾 TLR 和 Relish 基因表达及免疫抗病机能具有显著影响。塔玛亚历山大藻可通过抑制信号转导通路基因表达,降低对虾的抗病力。

参考文献:

- [1] Wang Y, Li J, Liu P, et al. The responsive expression of a caspase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* against pH stress[J]. *Aquaculture Research*, 2011, 42(8):1214-1230.
- [2] 黄翔鹤, 李长玲, 刘楚吾, 等. 两种微藻改善虾池环境增强对虾抗病力的研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(4):342-347.
HUANG Xiang-hu, LI Chang-ling, LIU Chu-wu, et al. Studies on two microalgae improving environment of shrimp pond and strengthening anti-disease ability of *Penaeus vannamei*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(4):342-347.
- [3] Alonso-Rodríguez R, Pérez-Osuna F. Phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: A review with special reference to the situation in the Gulf of California[J]. *Aquaculture*, 2003, 219(1):317-336.
- [4] 林元烧. 有毒赤海藻-塔玛亚历山大藻在厦门地区虾塘引起赤潮[J]. 台湾海峡, 1996, 15(1):16-18.
LIN Yuan-shao. Red tide caused by a marine toxic dinoflagellate, *Alexandrium tamarensis* (Lebour) Baleon, in shrimp ponds in Xiamen[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1996, 15(1):16-18.
- [5] 李卓佳, 张汉华, 郭志勋, 等. 虾池浮游微藻的种类组成、数量和多样性变动[J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 25(3):29-34.
LI Zhuo-jia, ZHANG Han-hua, GUO Zhi-xun, et al. Species composition, quantity variation and bio-diversities of phytoplankton in shrimp culture ponds[J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2005, 25(3):29-34.
- [6] Pérez-Osuna F, Gracia A, Flores-Verdugo F, et al. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 36(7):806-815.
- [7] 谭志军, 颜天, 周名江, 等. 塔玛亚历山大藻对黑褐新糠虾存活、生长和种群繁殖的影响[J]. 生态学报, 2002, 22(10):1635-1639.
TAN Zhi-jun, YAN Tian, ZHOU Ming-jiang, et al. The effects of *Alexandrium tamarensis* on survival, growth and reproduction of *Neomysis awatschensis*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(10):1635-1639.
- [8] Cembella A D, Quilliam M A, Lewis N I, et al. The toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* as the probable cause of mortality of caged salmon in Nova Scotia[J]. *Harmful Algae*, 2002, 1(3):313-325.
- [9] 周立红, 陈学豪. 塔玛亚历山大藻对罗非鱼肝及鳃组织 ATP 酶活性的影响[J]. 海洋科学, 2003, 27(12):75-78.
ZHOU Li-hong, CHEN Xue-hao. Effect of *Alexandrium tamarensis* on ATPase activity in the liver and gill of *Tilapia mossambica*[J]. *Marine Sciences*, 2003, 27(12):75-78.
- [10] 谭志军. 塔玛亚历山大藻(ATHK)对鲈鱼的危害机制研究[D]. 青岛:中国科学院海洋研究所, 2006.
TAN Zhi-jun. Toxic effects and its mechanism of dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* on perch *Lateolabrax japonicus*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2006.
- [11] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2001, 1(2):135-145.
- [12] 黄旭雄, 罗词兴, 郭腾飞, 等. 对虾 Toll 受体及其在虾类营养免疫评价中的应用[J]. 水产学报, 2012, 36(6):359-371.
HUANG Xu-xiong, LUO Ci-xing, GUO Teng-fei, et al. Toll receptor in prawn and its application in nutrition-immunity assessing on prawn[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(6):359-371.
- [13] Pal S, Wu J L, Wu L P. Microarray analyses reveal distinct roles for Rel proteins in the *Drosophila* immune response[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32(1):50-60.
- [14] Yang C J, Zhang J Q, Li F H, et al. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5):564-574.
- [15] Han-Ching W K, Tseng C W, Lin H Y, et al. RNAi knock-down of the

- Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 34(1):49–58.
- [16] 阎 慧, 李富花, 王 兵, 等. 中国明对虾 Rel/NF- κ B 家族基因在弧菌刺激下的表达[J]. *海洋与湖沼*, 2008, 39(6):628–633.
- YAN Hui, LI Fu-hua, WANG Bing, et al. Expression of Rel/NF- κ B family FcRel gene in vibrio-challenged chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2008, 39(6):628–633.
- [17] Tan Z J, Yan T, Yu R C, et al. Transfer of paralytic shellfish toxins via marine food chains: A simulated experiment[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2007, 20(3):235–241.
- [18] 颜 天, 谭志军, 于仁成, 等. 塔玛亚历山大藻对鲈鱼幼鱼毒性效应研究[J]. *环境科学学报*, 2002, 22(6):749–753.
- YAN Tian, TAN Zhi-jun, YU Ren-cheng, et al. The effect of dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on juvenile perch *Lateolabrax japonicus* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2002, 22(6):749–753.
- [19] Yan T, Zhou M J, Fu M, et al. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on early development of the scallop *Argopecten irradians concentricus*[J]. *Aquaculture*, 2003, 217(1):167–178.
- [20] 王雪虹, 马 嵩. 塔玛亚历山大藻对南美白对虾幼体毒性效应研究[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 23(3):58–63.
- WANG Xue-hong, MA Song. Research on toxicity effects of *Alexandrium tamarense* ATDH01 on nauplii of *Penaeus vannamei*[J]. *Journal of Fujian Teachers University(Natural Science)*, 2007, 23(3):58–63.
- [21] 李卓佳, 郭志勋, 张汉华, 等. 斑节对虾养殖池塘藻-菌关系初探[J]. *中国水产科学*, 2003, 10(3):262–264.
- LI Zhuo-jia, GUO Zhi-xun, ZHANG Han-hua, et al. Preliminary research on relationship between algae and bacteria in culture ponds of black giant tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(3):262–264.
- [22] Browdy C L, Holloway J D, King C O, et al. IHHN virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*; Effects of stocking density and water exchange rates[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 1993, 13: 87–94.
- [23] 蔡生力, 黄 捷, 王崇明, 等. 1993—1994 年对虾暴发病的流行病学研究[J]. *水产学报*, 1995, 19(2):112–119.
- CAI Sheng-li, HUANG Jie, WANG Chong-ming, et al. Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993—1994 [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1995, 19(2):112–119.
- [24] 孙 刚, 国际翔, 王振堂, 等. 对虾杆状病毒暴发式大流行的生态机理初步研究[J]. *生态学报*, 1999, 19(2):283–286.
- SUN Gang, GUO Ji-xiang, WANG Zhen-tang, et al. The ecological mechanism of the outbreaking of shrimp virus epidemic along Chinese seashore[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1999, 19(2):283–286.
- [25] Wang P H, Liang J P, Gu Z H, et al. 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*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 36(2):359–371.
- [26] Qiu P, Pan P C, Govind S. A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis[J]. *Development*, 1998, 125(10):1909–1920.
- [27] 阎 慧. 中国明对虾核转录因子 NF- κ B 家族基因的克隆与表达分析[D]. 青岛:中国科学院海洋研究所, 2008.
- YAN Hui. Cloning and expression of nuclear transcription factors Rel/NF- κ B family genes in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2008.
- [28] 李中海, 端木德强, 王敬泽. NF- κ B 活化的信号通路及其生理意义[J]. *生物学杂志*, 2002, 19(4):4–6.
- LI Zhong-hai, DUANMU De-qiang, WANG Jing-ze. The signalling pathway and physiological functions of activation of NF- κ B[J]. *Journal of Biology*, 2002, 19(4):4–6.
- [29] Uvell H, Engstrom Y. A multilayered defense against infection: Combinatorial control of insect immune genes[J]. *Trends in Genetics*, 2007, 23(7):342–349.
- [30] Lindsey S Garver, Ana C Bahia, Suchismita Das, et al. Anopheles Imd pathway factors and effectors in infection intensity dependent anti-plasmodium action[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(6):e1002737.
- [31] Hedengren M, Asling B, Dushay M S, et al. Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila* [J]. *Molecular Cell*, 1999, 4(5):827–837.
- [32] Shin S W, Kokoza V, Ahmed A, et al. Characterization of three alternatively spliced isoforms of the Rel/NF- κ B transcription factor Relish from the mosquito *Aedes aegypti*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(15):9978–9983.