

文章编号: 1674 - 5566(2015)02 - 0196 - 07

## 微囊藻毒素 MC-LR 对凡纳滨对虾细胞免疫相关基因表达水平的影响

傅一鸣<sup>1</sup>, 李智<sup>1</sup>, 柳峰松<sup>2</sup>, 刘利平<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 农业部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 河北大学 生命科学学院, 河北保定 071002)

**摘要:** 对凡纳滨对虾进行血窦注射微囊藻毒素 MC-LR 染毒, 取染毒前后肝胰腺及血细胞, 采用 Illumina Hiseq 2500 测序平台进行基因表达谱分析, 并对差异基因的基因本体 (gene ontology, GO) 注释和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路进行显著性富集分析。结果发现, 酚氧化酶原、胰蛋白酶及 C 型凝集素等基因有显著的差异性表达。在 GO 富集性分析中发现细胞粘附显著性差异表达, 细胞杀伤及细胞粘附分子结合物差异表达。KEGG 富集性分析发现血细胞中吞噬体显著性差异表达, 细胞凋亡、内吞作用和细胞粘附分子等通路呈表达差异。结果表明, 凡纳滨对虾在被 MC-LR 染毒后, 细胞免疫是抵御毒素的重要部分, 其中细胞粘附和吞噬作用在抵御 MC-LR 对虾体的毒害过程中发挥了重要作用。

**研究亮点:** 通过研究微囊藻毒素对凡纳滨对虾毒性的影响, 了解微囊藻毒素对凡纳滨对虾等甲壳类动物的危害。采用表达谱测序分析的方法探究凡纳滨对虾对抗微囊藻毒素威胁的免疫反应相关因子及作用机理, 并从免疫学的角度解释凡纳滨对虾抵抗毒素的途径。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 微囊藻毒素; 转录组; 细胞免疫

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

近些年来, 湖泊和池塘等淡水水域富营养化严重, 蓝藻水华频繁发生, 对生活于其中的水生生物造成了危害。有资料表明, 在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖池塘中, 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 等蓝藻形成优势种与虾病暴发呈正相关, 对虾发病池呈现硅藻到蓝藻优势的演替; 而在生产中, 养殖中后期的虾池, 也经常暴发蓝藻水华, 导致虾类原因不明的死亡<sup>[1-2]</sup>。暴露于铜绿微囊藻中的克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)、凡纳滨对虾和罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 幼虾存活率显著降低, 外观颜色及超微结构有明显变化<sup>[3-5]</sup>。目前普遍认为, 铜绿微囊藻能产生多种微囊藻毒素 (microcystin, MC), 其中最为常见的, 含量最高毒性也最大的是 MC-LR 型毒素。这种毒素对多种水生动物和哺乳动物能产生毒害甚至致死作用<sup>[6-8]</sup>。然而, 铜绿微

囊藻是如何导致虾类死亡? 对虾类的免疫系统又会产生怎样的危害? 目前相关机理研究甚少。

同其他无脊椎动物一样, 一般认为甲壳动物缺乏特异性免疫系统, 而完全依赖非特异免疫系统来抵御病原体的侵染。对虾的免疫系统被分为细胞免疫和体液免疫。细胞免疫主要包括血细胞的吞噬作用、结节形成、包裹作用和凝集反应等; 体液免疫反应主要依靠血淋巴中的一些酶类 (如溶菌酶、酚氧化酶、超氧化物歧化酶等)、免疫因子 (如抗菌肽、凝集素、溶血素等) 以及调节因子如酚氧化酶原激活系统等<sup>[9]</sup>。

本文通过对凡纳滨对虾进行血窦注射微囊藻毒素 MC-LR 染毒, 获取其肝胰腺及血细胞, 采用 Illumina Hiseq 2500 测序获得了凡纳滨对虾在注射微囊藻毒素前后血细胞及肝胰腺的转录组信息, 从微囊藻毒素对虾类肝胰腺和血细胞的细

收稿日期: 2014-04-27 修回日期: 2014-11-03

基金项目: 国家自然科学基金(31101914); 美国国际发展署 AquaFish CRSP 项目(3001325371)

作者简介: 傅一鸣(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物毒理学。E-mail: 642157908@qq.com

通信作者: 刘利平, E-mail: lp-liu@shou.edu.cn

胞免疫毒性作用着手,探讨微囊藻毒素对虾类的毒性机理,以期为实现对虾健康养殖和疾病控制提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

凡纳滨对虾购自上海市临港新城古棕路水产品批发市场。选择健康的、平均体重为 15 g 左右的对虾作为实验用虾。实验前在实验室内水循环养殖系统内暂养,使其适应室内养殖环境。

微囊藻毒素 MC-LR 购自宝柏(香港)贸易有限公司宝柏·中国,用 PBS 溶解。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 注射微囊藻毒素剂量的确定

取平均体重为 15 g 的凡纳滨对虾分成 4 组,每组 20 尾,按虾的体重分别注射剂量为 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (每千克虾注射 MC-LR 量) PBS 溶解的 MC-LR,对照组注射 PBS (NaCl 8 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.9 g, KCl 0.2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g;蒸馏水定容至 1 000 mL),注射量为 0.01 mL/g<sup>[10]</sup>。注射后观察存活率变化,及时剔除死亡个体(以附肢不动判定为死亡标准),记录 6 h、12 h、24 h、48 h 的对虾成活尾数。实验重复 3 次。实验过程中,水温控制在(26  $\pm$  1)  $^{\circ}\text{C}$ ,盐度为 10。注射部位为第二腹节下血窦处。MC-LR 用 PBS 溶解,加 1‰ 的酚红做指示剂。以 24 h 死亡率为一半的 MC-LR 浓度作为最终注射浓度,最后确定 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  为 MC-LR 对凡纳滨对虾的注射剂量。

#### 1.2.2 微囊藻毒素注射

根据预实验的半致死剂量 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  注射对虾,实验条件同上,分为实验组(即注射 MC-LR 组)和对照组,各设 3 个重复。每个重复 30 尾

虾,在 24 h 时从每个重复中各取 6 尾虾,最终实验组和对照组各得 18 尾,取肝胰腺和血淋巴,血淋巴经 800 r/min 离心收集血细胞,液氮保存备用。

#### 1.2.3 RNA 提取和检验

总 RNA 抽提所用 TRIzol 为 RNAiso Plus (TaKaRa)。由于血细胞不易研磨,在加入 TRIzol 后,使用漩涡振荡器 MS1 (IKA) 2 500 r/min 震荡 3~5 min,至管中无明显沉淀物为止。其余操作过程按产品说明进行。抽提得到的总 RNA 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行质量检验,剔除条带模糊的 RNA 样品。采用 Illumina Truseq RNA sample prep Kit 方法构建文库。

#### 1.2.4 表达谱测序及分析

采用 Illumina Hiseq 测序平台(上海美吉生物医药科技有限公司)完成凡纳滨对虾的表达谱测序,构建 Illumina PE 文库(200 bp)进行 2  $\times$  100 bp 测序(EST),和 50 bp 单端测序(表达谱),对获得的测序数据进行质量控制,然后利用生物信息学手段对数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因表达差异分析

将获得的基因差异表达结果按照是否有显著性差异进行筛选,在有显著性差异的数据中再去掉没有给出明确基因名称注释的序列。对结果进行分析后发现,注射 MC-LR 后血细胞中显著上调的基因有血小板反应蛋白(thrombospondin)和细胞周期素 B(cyclin B) 2 种基因,肝胰腺样本中的酚氧化酶原(prophenoloxidase)、胰蛋白酶(trypsin)及 C 型凝集素(C-type lectin)等 10 种基因发生了显著上调(表 1,表 2)。

表 1 注射 MC-LR 后凡纳滨对虾血细胞中显著上调的基因

Tab. 1 The significantly up-regulated genes in hemocyte of microcystin injected shrimps

基因名称 gene name	差异显著性检验值 significance level	P 值 P-value	上调或下调 up or down	差异显著性 significant difference	基因注释 gene annotation
comp14048_c0	9.73E-09	3.94E-05	上调	显著	thrombospondin, partial [Penaeus monodon]
comp14170_c0	6.02E-09	3.25E-05	上调	显著	cyclin B [Litopenaeus vannamei]

表 2 注射 MC-LR 后凡纳滨对虾肝胰腺中显著上调的基因

Tab. 2 The significantly up-regulated genes in hepatopancreas of microcystin injected shrimp

基因名称 gene name	差异显著性检验值 significance level	P 值 P-value	上调或下调 up or down	差异显著性 significant difference	基因注释 gene annotation
comp12917_c0	4.82E-07	0.000975	上调	显著	hemocyanin [ <i>Litopenaeus vannamei</i> ]
comp13363_c0	1.20E-07	0.000404	上调	显著	beta-1,3-glucan-binding protein [ <i>Fenneropenaeus chinensis</i> ]
comp14051_c0	1.16E-05	0.008116	上调	显著	GH5 family protein GH5A [ <i>Limnoria quadripunctata</i> ]
comp14659_c0	9.20E-07	0.001384	上调	显著	cellulase GHF9 [ <i>Cherax quadricarinatus</i> ]
comp14713_c0	7.34E-05	0.025159	上调	显著	cytochrome P450 CYP379A1 [ <i>Carcinus maenas</i> ]
comp14826_c0	9.77E-06	0.007804	上调	显著	hematopoietic prostaglandin D synthase [ <i>Penaeus monodon</i> ]
comp15007_c0	1.10E-05	0.008116	上调	显著	prophenoloxidase b [ <i>Marsupenaeus japonicus</i> ]
comp3132_c0	2.98E-07	0.00086	上调	显著	trypsin [ <i>Acetes chinensis</i> ]
comp6230_c0	6.33E-06	0.005568	上调	显著	collagenolytic serine protease [ <i>Fenneropenaeus chinensis</i> ]
comp9703_c0	2.54E-06	0.002567	上调	显著	C-type lectin [ <i>Penaeus monodon</i> ]

## 2.2 显著性富集分析

### 2.2.1 Gene Ontology (GO) 显著性富集分析

对两组样本中的差异基因进行 Gene Ontology (GO) 功能显著性富集分析,并初步筛选出与细胞免疫相关的 GO 功能注释(表 3)。在血细胞样本组中 GO 显著性差异表达共有 39 个,包括细胞粘附 (cell adhesion)、细胞杀伤 (cell killing) 及细胞粘附分子结合物 (cell adhesion molecule binding) 的表达等,证实了在凡纳滨对虾对抗 MC-LR 感染的免疫过程中细胞吞噬起到了

重要作用。在肝胰腺样本组中 GO 显著性差异表达的共有 40 个,但并没有发现细胞免疫相关的 GO 显著差异性表达。然而有不少氧化还原酶及蛋白质代谢相关的 GO 显著性差异表达,说明在注射微囊藻毒素后凡纳滨对虾新陈代谢变得旺盛,而肝胰腺又是微囊藻毒素的靶器官和对虾解毒的主要器官,可能正是这样才能产生大量免疫调节相关的酶类来提高自身的免疫防御,并且通过代谢将有毒物质排出体外。

表 3 注射 MC-LR 后凡纳滨对虾血细胞中细胞免疫相关差异基因的 GO 分类

Tab. 3 Gene ontology of cellular immunity related differentially expressed genes in hemocyte of microcystin injected shrimp

GO 序列号 serial number	功能描述 function description	GO 信息在目标基因中的比例 GO ratio in the target genes	未经校正的 P 值 P <sub>uncorrected</sub>	Bonferroni 校正后的 P 值 P value after Bonferroni correction	一级分类注释 annotation
GO:0007155	细胞粘附	7/212	7.69E-07	0.000722	生物学过程
GO:0001906	细胞杀伤	2/212	0.000704	0.661	生物学过程
GO:0050839	细胞粘附分子结合物	2/212	0.000981	0.921	分子功能

注:ratio in target genes 为该 GO 信息在目标基因(差异基因)中占有的比例,分子为富集到 GO 的差异基因数目,分母为本组差异基因的总数目;  $P < 0.05$  为显著富集项。

Note: Ratio in target genes indicates the ratio of GO enriched genes in the target genes (differentially expressed genes). The numerator in the fraction means GO enriched genes, and the denominator is the total number of differentially expressed genes.  $P < 0.05$  indicates statistically significance.

### 2.2.2 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 显著性富集分析

汇总了两组样本中基因表达差异的 KEGG 通路,并初步筛选出与细胞免疫相关的 KEGG 通路(表 4,表 5)。在血细胞和肝胰腺样本组中差异表达的 KEGG 通路分别有 130 和 174 个。在染毒组血细胞和肝胰腺中都存在吞噬体

(phagosome)、细胞凋亡(apoptosis)、内吞作用(endocytosis)和细胞粘附分子(cell adhesion molecules, CAMs)等与细胞免疫相关的通路,进一步证实了在凡纳滨对虾对抗 MC-LR 感染的免疫过程中细胞吞噬和细胞凋亡过程起到了重要作用。

表 4 注射 MC-LR 后凡纳滨对虾血细胞中细胞免疫相关显著性差异基因的 KEGG 通路  
Tab.4 KEGG pathway of cellular immunity related differentially expressed genes in hemocyte of microcystin injected shrimp

KEGG 通路名称 KEGG pathway name	KEGG 通路 ID KEGG pathway ID	通路差异基因数量 number of differentially expressed genes in the pathway	物种在该通路上 总基因数量 total number of genes in the pathway	未校正 的 P 值 uncorrected P-value	校正后 的 P 值 corrected P-value
吞噬体 phagosome	ko04145	7	105	0.001815	0.230017
自然杀伤细胞调节细胞毒性 natural killer cell mediated cytotoxicity	ko04650	1	41	0.497 01	0.795 613
细胞粘附分子 cell adhesion molecule	ko04514	1	55	0.602 403	0.795 613
细胞凋亡 cell apoptosis	ko04210	1	62	0.646 537	0.816 487
内吞作用 endocytosis	ko04144	3	202	0.655 219	0.816 487
细胞周期 cell cyclin	ko04110	1	118	0.862 41	0.906 998
溶酶体 lysosome	ko04142	1	176	0.948 433	0.958 417

表 5 凡纳滨对虾注射微囊藻毒素肝胰腺样本 KEGG 通路差异表达结果中与细胞免疫相关部分  
Tab.5 Cellular immunity related KEGG pathways with significant difference in expression in hepatopancreas of microcystin injected shrimp

KEGG 通路名称 KEGG pathway name	KEGG 通路 ID KEGG pathway ID	通路差异基因数量 number of differentially expressed genes in the pathway	物种在该通路上 总基因数量 total number of genes in the pathway	未校正 的 P 值 uncorrected P-value	校正后 的 P 值 corrected P-value
细胞凋亡 cell apoptosis	ko04210	2	62	0.625 71	0.911 749
内吞作用 endocytosis	ko04144	3	202	0.969 478	0.991 133
吞噬体 phagosome	ko04145	1	105	0.973 512	0.991 133
细胞周期 cell cyclin	ko04110	1	118	0.983 137	0.991 133

## 3 讨论

对虾的体液免疫应答包括酶原(酚氧化)激活,凝血素合成和抗菌肽释放等,而细胞免疫反应则包括细胞凋亡,包埋,吞噬和结节形成等过程<sup>[11]</sup>。本实验发现微囊藻毒素侵染后,对虾酚氧化酶原激活系统和 C 型凝集素基因表达明显上调。酚氧化酶原激活系统中的各种因子以非活性状态存在于血细胞的颗粒中,极微量的微生物多糖就能激活该系统。它们可通过多种方式参与宿主防御反应,包括提供调理素(opsonin),促进血细胞吞噬作用,形成结节或包囊以及介导凝集和凝固,产生杀菌物质,参与黑化反应,促使角

质的硬化和伤口愈合等<sup>[12]</sup>。凝集素在对外来入侵异物进行的识别、防御、凝集、吞噬、包囊及其随后的创伤修复等一系列反应中协同其他各种免疫因子共同发挥作用,其主要作用可能是使血淋巴中的异物分子发生凝集,从而使这些病原体丧失进一步侵染机体和在组织中扩散的能力,以达到免疫防御的目的<sup>[13]</sup>。血淋巴中凝集素还具有重要的调理作用,可以将结合的异物分子传递给血细胞,由血细胞来完成最终的吞噬和杀灭作用,从而大大增强血细胞的吞噬作用<sup>[14]</sup>。而 C 型凝集素是较早被发现的一类凝集素,现有研究证明 C 型凝集素与对虾的血细胞吞噬活性的增强有极大的关系。在对虾对抗 MC-LR 的过程中,

体液免疫和细胞免疫作用密切配合,酚氧化酶原激活系统和 C 型凝集素的显著性表达恰恰证明了细胞免疫吞噬作用和结节作用发挥着重要作用。

相比于体液免疫,目前在细胞免疫方面的工作相对还是有限的<sup>[15]</sup>。研究无脊椎动物细胞免疫机制有助于了解细胞信号的粘附和迁移。细胞反应主要涉及到吞噬作用,凋亡作用,成瘤作用,病原体的包埋作用。有研究表明在对虾对抗病毒感染的免疫反应过程中,吞噬作用和凋亡作用起到了比体液免疫更为重要的作用<sup>[16-17]</sup>。

吞噬作用是一个依赖肌动蛋白的过程,是免疫系统的重要组成部分。免疫细胞首先识别外源微粒并与受体结合,在细胞膜上皮层细胞骨架重组后,颗粒被吞噬和内化,形成了吞噬体。动物的吞噬反应目的就是防御病原微生物入侵<sup>[18]</sup>。已经鉴定了一些涉及对虾吞噬作用调节的分子,包括 Rab GTPases, Ran 蛋白, ADP 核糖基化因子 (ADP ribosylation factor) 等。在本转录组中也筛选出了一些相关基因,虽然并无显著的差异性表达,但这可能跟这些基因的表达时间有关。而在血细胞 GO 富集性分析中发现细胞粘附 (cell adhesion) 显著性差异表达,以及在血细胞 KEGG 富集性分析中发现吞噬体 (Phagosome)、内吞作用 (Endocytosis) 和细胞粘附分子 (cell adhesion molecules, CAMs) 等通路差异表达,这些基因或通路都与细胞吞噬作用有着密切联系,说明吞噬作用在凡纳滨对虾对抗微囊藻毒素的免疫应答过程中起到了重要作用。

细胞凋亡是一种基因编程的细胞自杀过程,消除不必要的或病变的细胞,在胚胎发育,稳态,昆虫变态和免疫过程中扮演着重要的角色<sup>[19-20]</sup>。半胱天冬蛋白酶 (caspases) 在细胞凋亡的各个阶段都起着重要的作用,是作为控制细胞凋亡启动和执行的主要蛋白<sup>[21]</sup>。已知 Caspase-8 是介导细胞凋亡通路所必需的受体,而 caspase-3 已被确认是 caspase 中起关键作用的基因<sup>[22]</sup>。有研究表明,微囊藻毒素能够诱导动物多种细胞发生细胞凋亡现象。刘秀霞等<sup>[23]</sup>研究了微囊藻毒素 (MC-LR) 对罗非鱼肝细胞的毒性作用,SCGE 和流式细胞仪都能观察到明显的细胞凋亡现象,且与注射毒素时间和剂量存在一定关系。BØE 等<sup>[24]</sup>发现微囊藻毒素能够引起老鼠肝

细胞的凋亡现象。张建英等<sup>[25]</sup>对鲫鱼的血淋巴进行 1 nM 的 MC-LR 处理,在 2 h 检测到明显的淋巴细胞的凋亡。WANG 等<sup>[26]</sup>研究了日本囊对虾 (*M. japonicus*) 中一个新的细胞凋亡蛋白酶基因 (Pj Caspase), 当对虾被病毒感染时 Pj Caspase 的 mRNA 表达显著上调。在本实验中 KEGG 显著性分析中有自然杀伤细胞调节细胞毒性 (natural killer cell mediated cytotoxicity), 细胞凋亡 (apoptosis), 细胞周期 (cell cycle) 等与细胞凋亡密切相关的通路显著性差异表达。说明细胞凋亡在凡纳滨对虾对抗微囊藻毒素过程中发挥了关键作用。

本文围绕注射 MC-LR 后凡纳滨对虾体内与细胞免疫相关基因的表达谱进行分析,结果表明染毒过程中,对虾细胞免疫特别是细胞吞噬及细胞粘附起到了重要作用。这为以后更加深入地研究无脊椎动物对抗毒素的先天性免疫分子机制提供了帮助。

#### 参考文献:

- [1] 张瑜斌, 龚玉艳, 陈长平, 等. 高位虾池养殖过程浮游植物群落的演替[J]. 生态学杂志, 2009, 28(12): 2532-2540.  
ZHANG Y B, GONG Y Y, CHEN C P, et al. Succession of phytoplankton community in High ponds Shrimp farming process [J]. Journal of Ecology, 2009, 28(12): 2532-2540.
- [2] 查广才, 周昌清, 牛晓光. 铜绿微囊藻对凡纳滨对虾低盐度养殖的危害研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007(46): 64-67.  
CHA G C, ZHOU C Q, NIU X G. Study of *Microcystis aeruginosa* the harm of vannamei in low salinity culture [J]. Journal of Sun Yat-sen University: Natural Sciences, 2007(46): 64-67.
- [3] LIU L P, LI K, YUE Y L, et al. The dangers of microcystins in aquatic systems, and progress of research into their detection and elimination[J]. World Aquaculture, 2011, 42(2): 53-54, 57, 59.
- [4] LIU L P, CHEN T Y, LI K, et al. Effects of *Microcystis aeruginosa* on the life history of the water flea *Daphnia magna* [J]. Chinese Journal of Limnology and Oceanology, 2011, 29(4): 892-897.
- [5] 乐亚玲, 刘利平, 李慷, 等. 铜绿微囊藻对克氏原螯虾幼虾存活及成虾几种酶类的影响[J]. 水产学报, 2011, 35(8): 1158-1165.  
YUE Y L, LIU L P, LI K, et al. The influence of *Procambarus clarkii* juvenile shrimp survival and several enzymes into shrimp by *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal

- of Fisheries of China, 2011, 35(8):1158-1165.
- [6] BABICA P, BLÁHA L, MARŠÁLEK B. Exploring the natural role of microcystins—a review of effects on photoautotrophic organisms[J]. *Journal of Phycology*, 2006,42(1):9-20.
- [7] ZIMBA P V, KHOO L, GAUNT P S, et al. Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis toxins*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2001,24:41-47.
- [8] XIE L, XIE P, OZAWA K, et al. Dynamics of microcystins-LR and-RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment [J]. *Environmental Pollution*, 2004,127(3):431-439.
- [9] 宋光年. 中国明对虾凋亡基因 caspase 的克隆、表达及功能的初步分析[D]. 北京:中国科学院,2010.  
SONG G N. Preliminary analysis of Chinese shrimp caspase apoptotic gene cloning, expression and function [D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences,2010.
- [10] 姜有声, 战文斌, 程顺峰, 等. 对虾白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP19 的单克隆抗体制备及其定位[J]. *中国水产科学*, 2009,16(1):69-74.  
JIANG Y S, ZHAN W B, CHENG S F, et al. White spot syndrome virus envelope protein VP19 monoclonal antibody and its location [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009,16(1):69-74.
- [11] LITTLE T J, HULTMARK D, READ A F. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology [J]. *Nature Immunology*, 2005,6(7):651-654.
- [12] SÖDERHÄLL K, CERENIUS L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1998,10(1):23-28.
- [13] ARASON G J. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1996,6(4):277-289.
- [14] KONDO M, MATSUYAMA H, YANO T. The opsonic effect of lectin of phagocytosis by hemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*[J]. *Fish Pathology*, 1992,27(4):217-222.
- [15] WILLIAMS M J. Drosophila hemopoiesis and cellular immunity [J]. *Journal of Immunology*, 2007,178(8):4711-4716.
- [16] FAUVARQUE M O, WILLIAMS M J. Drosophila cellular immunity: a story of migration and adhesion[J]. *Journal of Cell Science*, 2011,124(9):1373-1382.
- [17] WANG W, ZHANG X B. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008,25(5):522-527.
- [18] MAY R C, MACHESKY L M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton[J]. *Journal of Cell Science*, 2001(114):1061-1077.
- [19] OPFERMAN J T, KORSMEYER S J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system [J]. *Nature Immunology*, 2003,4(5):410-415.
- [20] STELLER H, ABRAMS J M, GREETHER M E, et al. Programmed cell death in drosophila [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 1994, 345(1313):247-250.
- [21] KUROKAWA M, KORNBLUTH S. Caspases and kinases in a death grip[J]. *Cell*, 2009,138(5):838-854.
- [22] JIN Z, EL-DEIRY W S. Overview of cell death signaling pathways[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2005,4(2):139-163.
- [23] 刘秀霞, 梁旭方, 丁雪芬, 等. 微囊藻毒素对尼罗罗非鱼原代肝细胞致毒机理的探讨[J]. *动物学杂志*, 2008,43(5):25-30.  
LIU X X, LIANG X F, DING X F, et al. Discussion of Toxicity Mechanism of Nile tilapia primary hepatocytes by Microcystin [J]. *Journal of Zoology*, 2008,43(5):25-30.
- [24] BØE R, GJERTSEN B T, VINTERMYR O K et al. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1991, 195(1):237-246.
- [25] 张建英, 张杭君, 陈英旭. 微囊藻毒素导致鲫鱼淋巴细胞凋亡的研究[J]. *环境科学学报*, 2005,25(8):1101-1104.  
ZHANG J Y, ZHANG H J, CHEN Y X. Study of Microcystin lead to Carp lymphocyte apoptosis [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005,25(8):1101-1104.
- [26] WANG L, ZHI B, WU W L, et al. Requirement for shrimp caspase inapoptosis against virus infection [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(6):706-715.

## The toxicity impact of microcystin on expression of cellular immune-related genes in *Litopenaeus vannamei*

FU Yiming<sup>1</sup>, LI Zhi<sup>1</sup>, LIU Fengsong<sup>2</sup>, LIU Liping<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China)

**Abstract:** In this article, *Litopenaeus vannamei* were challenged by microcystin-LR through injection. Shrimp hepatopancreas and blood samples were taken to analyze the transcriptome data using Illumina Hiseq 2500. The expression profiles were analyzed by differential expression analysis and enrichment analysis. The results showed that prophenoloxidase, trypsin, C-type lectin and other genes were significantly differentially expressed. In GO enrichment analysis, we found that cell adhesion, cell killing and cell adhesion molecule binding were differentially expressed. In blood KEEG enrichment analysis, we found phagosome, apoptosis, endocytosis and cell adhesion molecules (CAMs) and other pathways were significantly differentially expressed. Those results suggested that when *L. vannamei* was challenged by MC-LR, they would take a positive immune response to resist the infection, and cellular immune response was one of the crucial part. Phagocytosis and cell adhesion play important roles against the toxicity of MC-LR in the immune response.

**Key words:** *L. vannamei*; microcystin; transcriptome; cellular immune response