

文章编号: 1674-5566(2025)06-1281-11

DOI: 10.12024/jsou.20250304805

## 鳃弧菌侵染对菲律宾蛤仔存活、鳃组织及免疫基因表达的影响

贾建鑫<sup>1,2</sup>, 王瑞瑶<sup>1,2</sup>, 李兵辉<sup>1,2</sup>, 聂鸿涛<sup>1,2</sup>

(1. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023; 2. 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 为了探究鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)及其对蛤仔鳃组织和免疫基因的影响。本研究开展了5种不同浓度鳃弧菌对蛤仔为期7 d的胁迫研究,并分析了鳃组织病理变化、溶菌酶(LZM)活性、载菌量及免疫基因表达情况。结果表明,注射鳃弧菌胁迫蛤仔168 h的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)组为 $5 \times 10^7$  CFU/mL组,存活率为52.3%,半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为 $6.08 \times 10^6$  CFU/(mL·g),而 $5 \times 10^8$  CFU/mL组的存活率最低(33.6%), $5 \times 10^6$  CFU/mL组的存活率最高(67.0%)。载菌量分析显示,半致死浓度(LC<sub>50</sub>)组鳃组织中鳃弧菌数量在24 h达到峰值(7.53 CFU/mg),随后逐渐降低,120 h降至4.26 CFU/mg。LZM活性测定显示,鳃组织中LZM活性在12 h达到峰值(123.03 U/mg prot),随后逐渐降低,120 h降至77.92 U/mg prot。病理分析发现,感染鳃弧菌24 h后蛤仔鳃组织出现排列紊乱,鳃丝间连接被破坏,收缩严重,间隙增大等病理特征。此外,荧光定量PCR(qPCR)分析发现鳃弧菌胁迫显著诱导了热休克蛋白(Hsp70)、细胞色素(Cyp1a1)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Pim3)、溶酶体(Lysozyme)、含硫酯蛋白(Cd109)、肿瘤坏死因子受体6(Traf6)等免疫基因的表达( $P < 0.05$ ),揭示了这些基因在菲律宾蛤仔抗鳃弧菌胁迫的免疫防御过程中发挥了重要作用。本研究初步探究了鳃弧菌对菲律宾蛤仔的影响,为菲律宾蛤仔抗鳃弧菌的先天免疫机制提供了新思路。

**关键词:** 菲律宾蛤仔; 鳃弧菌; 鳃组织; 半致死浓度

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)是我国传统四大养殖贝类之一,具有生长快、养殖周期短、高产量等特点,现已成为我国最重要的滩涂养殖贝类<sup>[1]</sup>。2023年我国蛤类产量444.9万t,占中国贝类总产量的20%以上,约占全球蛤仔产量的90%<sup>[2]</sup>。然而,随着水产养殖业的快速发展和全球环境污染的加剧,蛤仔面临着多种病原体的威胁,其中弧菌类是贝类养殖业的主要危害之一<sup>[3]</sup>。

弧菌是一类广泛存在于自然界中的致病菌,能够在多种生物之间传播并引发感染,常导致大规模死亡,成为了限制水产养殖业健康持续发展的重要因素<sup>[4]</sup>。目前,对贝类养殖业造成主要危害的弧菌包括:哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、溶藻

弧菌(*V. alginolyticus*)、灿烂弧菌(*V. splendidus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)和鳃弧菌(*V. anguillarum*)等<sup>[5]</sup>。鳃弧菌是一种海生嗜盐性、嗜温性弧菌,常在海洋生物中引发多种疾病,能够感染鱼类、贝类、珊瑚和甲壳类等水生动物,其中海洋贝类尤为易感<sup>[6]</sup>。据报道,在一些高密度的养殖水体中,鳃弧菌对养殖贝类具有显著影响,甚至导致死亡<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8-9]</sup>表明,贝类鳃作为重要的生理器官,具有调节呼吸、渗透压、排泄含氮废物以及增强血细胞吞噬能力等多种功能,当贝类感染弧菌时,鳃组织的生理功能和结构会发生显著变化,这些变化可能是其应对弧菌侵染的重要标志之一。例如,当长牡蛎(*Crassostrea gigas*)经鳃弧菌( $2 \times 10^8$  CFU/mL)注射后,其鳃组织发生不

收稿日期: 2025-03-18 修回日期: 2025-05-16

基金项目: 辽宁省兴辽英才青年拔尖人才项目(XLYC2403165); 辽宁省教育厅基本科研项目(LJ212410158027); 大连市杰出青年项目(2024RJ014)

作者简介: 贾建鑫(1999—),男,硕士研究生,研究方向为贝类遗传育种。E-mail: 1656021404@qq.com

通信作者: 聂鸿涛, E-mail: htnie@dlou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

同程度损伤,免疫相关基因也发生了显著变化,这可能揭示了鳃组织在其免疫防御中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。

近年来,随着鳃弧菌引起的疾病频发,对贝类养殖业的可持续发展构成了巨大威胁。半致死浓度( $LC_{50}$ )作为评估污染物或病原体对生物体毒性效应的重要指标,常被用来衡量弧菌对水产动物的毒害强弱,广泛应用于贝类毒理学和免疫学研究<sup>[11-12]</sup>。随着水产养殖业的快速发展及环境污染的加剧,弧菌对贝类半致死浓度的研究逐渐成为热点。研究表明,贝类对弧菌的敏感性因种类、发育阶段及环境条件而异。例如,泥蚶(*Tegillarca granosa*)在注射哈维氏弧菌胁迫下的研究表明:  $4.64 \times 10^6$  CFU/mL 为半致死浓度( $LC_{50}$ ),且泥蚶存活率与病原体浓度呈显著负相关,为确定其抗病阈值提供了重要依据<sup>[13]</sup>。葛端阳等<sup>[12]</sup>报道了注射鳃弧菌胁迫 96 h 青蛤(*Cyclina sinensis*)的半致死浓度( $LC_{50}$ )为  $OD_{600} = 1.57$ ,发现鳃弧菌对青蛤有明显的毒害作用。本文探究了注射半致死浓度( $LC_{50}$ )鳃弧菌胁迫下对菲律宾蛤仔存活率、LZM 活性及载菌量的影响,并通过分析鳃组织的病理变化及免疫相关基因的表达趋势,初步探究了鳃组织在应对鳃弧菌感染时的分子响应机制,为阐明菲律宾蛤仔抗鳃弧菌先天免疫机制提供了参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验中的菲律宾蛤仔采自辽宁省大连市凌水湾野生种群,在  $(21.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}(8.1 \pm 0.1)$  的海水中暂养 14 d,其间喂食小球藻。选取实验蛤仔平均壳长  $(32.08 \pm 1.35)$  mm、平均壳高  $(21.19 \pm 0.91)$  mm、平均壳宽  $(13.26 \pm 0.56)$  mm 以及平均总质量  $(8.22 \pm 0.85)$  g。本研究所用鳃弧菌菌株来自大连海洋大学水产动物医院,编号为 2 MHG001。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 鳃弧菌半致死浓度的探究

将鳃弧菌接种于 LB 液体培养基中,在  $36^\circ\text{C}$  下振荡培养 12 h,获得菌液。使用紫外分光光度计测定菌液在吸光度 560 nm 波长下的吸收值,根据标准曲线计算应用菌液浓度<sup>[14]</sup>。将菌液在 8 000 r/min 条件下离心 5 min,收集病原菌沉淀,用 PBS 重悬并稀释至不同浓度,用于半致死浓度

( $LC_{50}$ )的测定。实验分别设置  $(5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^6$  CFU/mL) 5 个鳃弧菌浓度梯度<sup>[15]</sup>和 1 个 PBS 对照组,共 6 组(每组 3 个生物学重复,  $n = 100$ ,每只蛤仔注射 100  $\mu\text{L}$  相应浓度的菌液,对照组注射 100  $\mu\text{L}$  PBS),实验流程如图 1 所示。每 24 h 记录 1 次蛤仔存活情况,存活率=存活蛤仔的数量/每组中蛤仔的总数<sup>[16]</sup>。各组存活率数据经过 SPSS 27.0.1 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 回归方程分析确定半致死浓度( $LC_{50}$ )。

#### 1.2.2 样品采集和保存

本实验以半致死浓度( $LC_{50}$ )组和 PBS 对照组为对象,探究鳃弧菌对蛤仔鳃组织的结构变化及免疫指标的影响。分别取注射后(0 h,对照组)和注射后 6、12、24、72 和 120 h 的鳃组织,将每个鳃组织等分成 3 份:1 份用于测定载菌量,1 份用于检测溶菌酶(LZM)活性,1 份保存在  $-80^\circ\text{C}$  用于 RNA 提取。此外,另取鳃弧菌胁迫 24 h 的鳃进行组织切片观察。每组 3 个重复。

#### 1.2.3 载菌量测定

载菌量的测定参照 YU 等<sup>[17]</sup>的方法,取 0.1 g 组织加入 1 mL 生理盐水匀浆,制备组织匀浆液。将 8.9 g TCBS 用 20 mL 超纯水煮沸,制成(TCBS)琼脂培养基。取 50  $\mu\text{L}$  匀浆液均匀涂布于 TCBS 琼脂培养基表面,于  $36^\circ\text{C}$ 、180 r/min 的摇床中培养 12 h,根据培养基上形成的黄色菌落(鳃弧菌)计算载菌量。计算公式:载菌量(CFU/mg) = 计算弧菌数(CFU)  $\times$  稀释倍数/质量(mg)<sup>[17]</sup>。

#### 1.2.4 溶菌酶(LZM)活性检测

取 0.1 g 鳃组织,加入 1 mL 0.9% 氯化钠溶液进行匀浆,匀浆液在室温下以 5 500 r/min 离心 5 min,获得上清液。将标准品、标准应用溶液和应用细菌溶液在  $37^\circ\text{C}$  下预热 7 min,然后快速混合。使用分光光度计测定菌液在吸光度 530 nm 波长下分别记录 15 s( $T_0$ )和 135 s( $T_2$ )的吸收值。使用 LZM 测定试剂盒(Nanjing Jiancheng Co., 中国南京)检测 LZM 活性。

#### 1.2.5 鳃组织病理分析

将准备好的鳃组织于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,使用 75% 乙醇洗涤和脱水,随后用石蜡包埋。将处理后的样本切成 5  $\mu\text{m}$  石蜡切片,并用苏木精和伊红(H.E)染色。用光学显微镜观察并记录鳃组织的形态和结构变化。

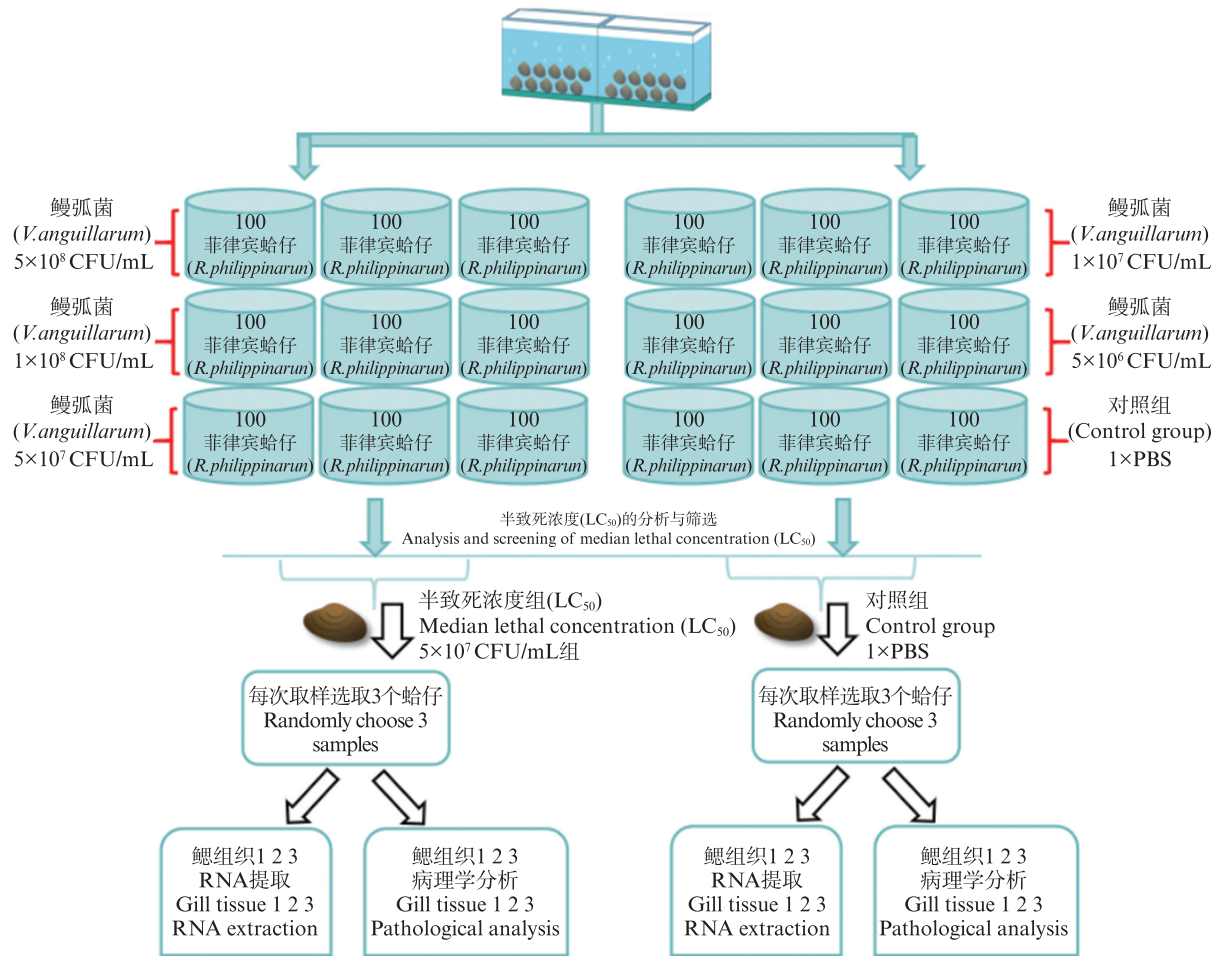


图1 鳎弧菌胁迫组和对照组取样的实验设计和流程图

Fig. 1 Experimental design and flow chart for sampling in the *V. anguillarum* challenge group and the control group

### 1.2.6 免疫基因表达分析

使用 TRIzol 试剂提取鳃组织中总 RNA。通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳来评价 RNA 完整性, 并且使用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计来测定 RNA 浓度。使用反转录试剂盒 (TaKaRa, Tokyo, Japan) 获取 cDNA 并测定浓度。使用 Primer Premier 5.0 软件设计目的基因引物 (表 1),  $\beta$ -actin 作为内参基因。荧光定量 PCR (qPCR) 的体系为 20  $\mu$ L: 染液 SYBR II (TaKaRa, Tokyo, Japan) 10  $\mu$ L、上下游引物各 1  $\mu$ L、ROX II (TaKaRa, Tokyo, Japan) 0.4  $\mu$ L, cDNA 0.8  $\mu$ L 和 ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L。qRT-PCR 程序如下: 在 Roche LightCycler 480 Real-time PCR 系统中, 在 94  $^{\circ}$ C 下进行 cDNA 变性 5 min, 然后进行 42 个循环的 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 25 s 和 72  $^{\circ}$ C 30 s。每个样品进行 3 次生物学重复, 并使用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  方法进行进一步计算。

### 1.2.7 数据分析

运用 SPSS 27.0.1 统计软件对所得 6 组存活

率数据进行 Probit 回归方程分析, 探究半致死浓度 (LC<sub>50</sub>) 的置信区间<sup>[5]</sup>。通过单因素方差分析 (ANOVA) 和单因素 *t* 检验, 评估半致死浓度 (LC<sub>50</sub>) 条件下鳎弧菌胁迫对蛤仔基因表达水平的影响<sup>[18]</sup>。本研究中使用 SPSS 对所有数据进行分析, 所有结果均以平均值  $\pm$  标准误 (Mean  $\pm$  SE) 表示, 统计检验在 \**P* < 0.05 处具有显著性, \*\**P* < 0.01 具有极显著性。

## 2 结果

### 2.1 存活率分析

结果表明, 鳎弧菌胁迫组与对照组的存活率存在显著差异 (*P* < 0.05; 图 2)。不同浓度胁迫组 (从高到低) 及对照组的存活率分别为 33.7%、43.0%、52.3%、59.7%、67.0%、98.3%。在实验组中, 除 5x10<sup>6</sup> CFU/mL 组在胁迫 48 h 后出现死亡个体 (存活率为 97.0%) 外, 其余实验组均在胁迫 24 h 后出现死亡。5x10<sup>7</sup> CFU/mL 组在 24 和 48 h



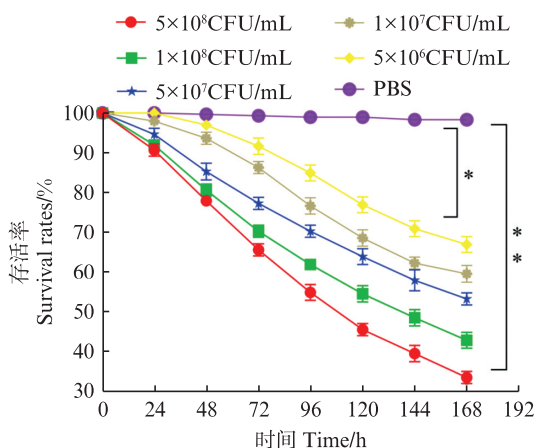
的存活率分别显著下降至 94.6% 和 85.3%, 168 h 后存活率为 52.3% ( $P < 0.01$ ; 图 2), 经过 SPSS 回归分析得出回归方程:  $Y = 3.24 - 0.42X$  ( $R^2 = 0.927$ ,  $P < 0.01$ ), 为注射鳃弧菌胁迫蛤仔 168 h 的半致死浓

度 ( $LC_{50}$ ) 组, 半致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 为  $6.08 \times 10^6$  CFU/(mL·g)<sup>[15,19]</sup> [本研究以平均总质量计算, 置信系数  $a = 0.05$  时的置信区间:  $5.57 \times 10^6$  CFU/(mL·g)  $\leq LC_{50} \leq 8.06 \times 10^6$  CFU/(mL·g)]。

表 1 蛤仔免疫相关基因 qPCR 引物

Tab. 1 Immune-related genes qPCR primer of *R. philippinarum*

基因名 Gene name	基因编号 Gene ID	正向引物序列(5' to 3') Forward primer sequence (5' to 3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
<i>Hsp70</i>	evm.TU.xfSc0000012.36	GGCGATTCAAGCGAAGCAAT	CGGCGTCATTACCATCTCTATC
<i>Cyp1a1</i>	evm.TU.xfSc0003229.1	GCTGCTGGAGTGTGACAAG	GCATGACAGGTACAGGCATTCC
<i>Pim3</i>	evm.TU.xfSc0000026.20	ATCATGGCAGGTCAGCAACAGT	TGGCAACAGATTCTTGCTACT
<i>Lysozyme</i>	evm.TU.xfSc0000010.4	AAGCACAGCGAGCCTCACTCTT	GCGTCAGGTAGCGTCCGTTAGA
<i>Cd109</i>	evm.TU.xfSc0001935.1	AGCACGCCAGATCACCATTCT	CCTCCAGCCATCGCCATCAT
<i>Traf6</i>	evm.TU.xfSc0001568.8	GGCACGGGTTTCACAGCACAT	ACCAGCAGCAGTGAACCGACAT
<i>Limp</i>	evm.TU.xfSc0000084.15	CGTGTTCGAAGTTCCGGTAGC	AAAGCGTCTCCATTGGCACT
<i>Atpase</i>	evm.TU.xfSc0001291.7	TCCAGCACCATGGACAATCA	TTTGTGTGATTTGTCATCTCGTCA
<i>Clq</i>	evm.TU.xfSc0000043.1	AGTTGCTGACGACCTTGGTT	TGCTGCATTCCGGTGTGATA
$\beta$ -actin	AY889707.1	CTCCCTTGAGAAGAGCTACGA	GATACCAGCAGATTCCATACCC



\*代表差异显著  $P < 0.05$ , \*\*代表差异极显著  $P < 0.01$ 。

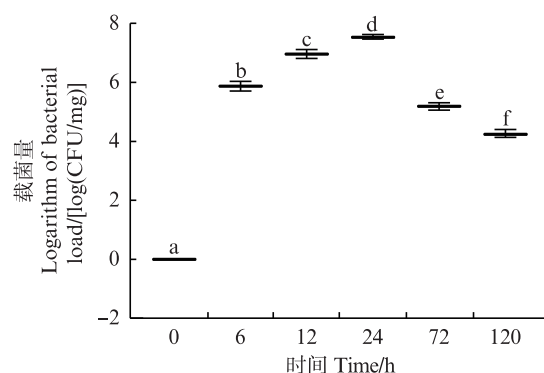
\* represents significant difference  $P < 0.05$ , \*\* represents very significant difference  $P < 0.01$ .

图 2 菲律宾蛤仔感染不同浓度鳃弧菌的存活率

Fig. 2 Survival rate of *R. philippinarum* infected with different concentrations of *V. anguillarum*

## 2.2 载菌量和溶菌酶活性分析

采用平板计数法测定鳃弧菌胁迫后蛤仔鳃组织中的载菌量。结果显示, 6 h 后载菌量显著增加至 5.86 CFU/mg, 并于 24 h 达到峰值 7.53 CFU/mg。随后载菌量显著下降, 120 h 后降至 4.26 CFU/mg, 但仍为峰值 (24 h) 载菌量的 0.56 倍 ( $P < 0.05$ ), 对照组 (0 h) 鳃组织中未检测到菌落 (图 3)。



不同小写字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 3 菲律宾蛤仔鳃组织中的载菌量

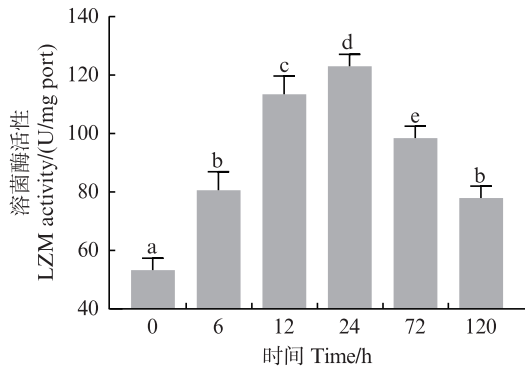
Fig. 3 Bacterial load of *R. philippinarum* in the gills

在弧菌胁迫下, 蛤仔鳃组织中的溶菌酶 (LZM) 活性呈现先升高后降低的趋势 (图 4)。LZM 活性在对照组 (0 h) 中为 53.31 U/mg port, 6 h 后显著上调 (80.65 U/mg port), 并在 24 h 达到峰值 (123.03 U/mg port, 为对照组的 2.30 倍), 随后逐渐下降, 120 h 后降至 77.92 U/mg port, 但仍比对照组显著上调 0.46 倍 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 鳃组织病理分析

通过 H.E 染色观察鳃弧菌感染 24 h 后蛤仔鳃组织的病理变化 (图版)。结果显示, 对照组鳃组织结构清晰完整, 鳃丝排列规则, 无明显变性或坏死 (图版-1, 3); 而半致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 组鳃组织

结构排列紊乱,鳃丝严重收缩、松散,结缔组织广泛坏死,并伴有大量细胞浸润(图版-2,4)。



不同小写字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图4 菲律宾蛤仔鳃组织中LYM活性变化

Fig. 4 Changes of LYM activity in the gills of *R. philippinarum*

#### 2.4 鳎弧菌处理后蛤仔鳃组织免疫相关基因表达

利用qPCR技术分析鳎弧菌胁迫后蛤仔鳃组织中9个免疫相关基因在不同免疫阶段的表达变化。结果表明,*Hsp70*基因在24 h表达量达到峰值,比对照组(0 h)显著上调了4.69倍,随后表达量开始下降,120 h降低到了对照组的1.80倍( $P < 0.05$ ;图5a)。*Cyp1a1*基因在12 h表达量达到峰值,比对照组显著上调了5.92倍,随后开始下降,120 h仍比对照组高0.72倍( $P < 0.05$ ;图5b)。如图5c所示,*Pim3*在6 h表达量最低(对照组的0.52倍),随后开始升高,在12 h开始高于对照组( $P < 0.05$ ),120 h后是对照组的4.40倍( $P < 0.05$ )。*Lysozyme*基因的表达量在120 h内显著上调,在72 h达到峰值,随后开始降低,120 h仍是对照组的4.88倍( $P < 0.05$ ;图5d)。*Cd109*在6 h的表达量最低(对照组的0.46倍; $P < 0.05$ ),随后开始升高,在12 h与对照组无显著差异,24 h后显著高于对照组,在120 h达到峰值,为对照组的2.95倍( $P < 0.05$ ;图5e)。如图5f所示,*Traf6*基因的表达量整体呈先升高后降低的趋势,在24 h达到峰值,比对照组显著上调了2.95倍( $P < 0.05$ )。溶酶体整合膜蛋白基因(*Limp*)表达量在6 h达到峰值,比对照组显著上调了5.37倍,随后开始降低,120 h与对照组无显著差异( $P > 0.05$ ;图5g)。三磷酸腺苷酶(*Atpase*)在胁迫后120 h内显著上调,表达量在12 h达到峰值,是对照组的2.77倍( $P < 0.05$ ;图5h)。补体蛋白基因(*C1q*)的表达量整体

呈先升高后降低的趋势,在胁迫后的120 h内均显著上调,并在72 h达到峰值( $P < 0.05$ ),比对照组显著上调了4.78倍(图5i),120 h仍比对照组高2.49倍。

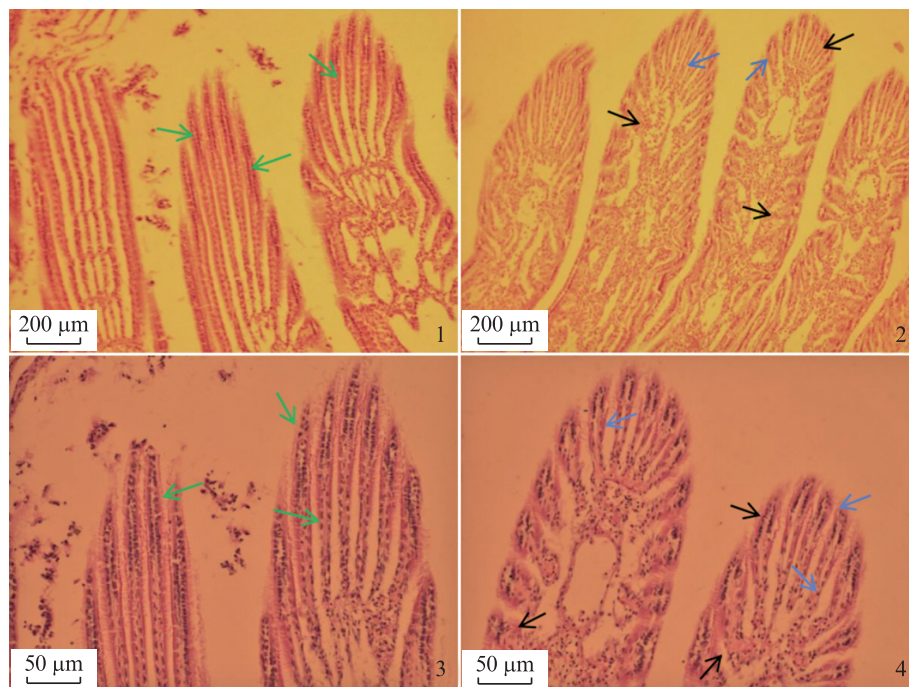
### 3 讨论

本研究中,除 $5 \times 10^6$  CFU/mL组以外的4种鳎弧菌胁迫组,菲律宾蛤仔在24 h内均出现死亡个体,这一现象可能与蛤仔自身免疫调节系统的调节能力有关。研究<sup>[13]</sup>表明,当病原菌侵染浓度处于宿主免疫调节范围内时,蛤仔可通过固有免疫系统有效抑制鳎弧菌的致病作用。随着鳎弧菌浓度的升高,蛤仔自身免疫调节能力达到阈值时,其免疫防御能力无法有效应对病原侵袭,可能导致高浓度鳎弧菌胁迫对蛤仔的损伤加剧,表现为鳎弧菌浓度和蛤仔存活率呈显著负相关<sup>[12]</sup>( $P < 0.05$ )。分析注射胁迫168 h蛤仔存活率结果表明, $5 \times 10^7$  CFU/mL组蛤仔存活率为52.3%,经Probit回归分析方程分析确定了注射鳎弧菌168 h对蛤仔的半致死浓度( $LC_{50}$ )为 $6.08 \times 10^6$  CFU/(mL·g)。作为评估鳎弧菌环境致病风险的重要指标,半致死浓度( $LC_{50}$ )的确定不仅证实了鳎弧菌对蛤仔具有显著的毒害作用,为后续实验提供了剂量参考,也为蛤仔养殖过程中的病害风险预警和防控策略提供了重要的参考价值。

作为双壳贝类抵御病原体入侵的主要防线,先天免疫系统在蛤仔的免疫防御中起着至关重要的作用,其中鳃组织在先天免疫功能中扮演着多重角色<sup>[20]</sup>。研究<sup>[21]</sup>表明,弧菌感染可导致贝类鳃组织结构损伤和生理功能改变,如副溶血性弧菌感染可引发缢蛏(*Sinonovacula constricta*)鳃丝结构损伤和功能紊乱。本研究发现相比于对照组,半致死浓度( $LC_{50}$ )组鳃丝出现显著病理变化,这表明鳎弧菌的侵染会导致鳃组织结构变化并造成一定程度的损伤<sup>[22]</sup>。载菌量结果表明,鳃组织中鳎弧菌数量呈先显著增加后迅速降低的趋势,这一变化趋势揭示了蛤仔体内鳎弧菌被迅速清除的过程,表明蛤仔抗菌免疫反应被激活<sup>[17]</sup>。此外,这一变化趋势与王瑞等<sup>[23]</sup>在文蛤(*Meretrix petechialis*)感染副溶血弧菌研究中发现的“先急剧上升,再快速下降”的弧菌载量变化趋势相似,暗示着贝类对副溶血弧菌感染的免疫应答可能具有相似的免疫学特征<sup>[24]</sup>。

LZM作为参与软体动物先天免疫的关键水解酶,能够直接破坏弧菌的细胞壁,从而抑制弧菌的增殖和扩散,是评估贝类先天免疫的重要指标<sup>[25]</sup>。*Limp*可与溶酶体中的水解酶结合,并将水解酶包裹在溶酶体内保护水解酶免受酸性环境的损害,从而在溶酶体介导的病原体清除过程中起重要作用<sup>[26]</sup>。WANG等<sup>[27]</sup>发现*Limp*与*Atpase*相互作用并参与溶酶体的形成,在维持细胞稳定和促进溶酶体免疫功能方面发挥关键作用。本实验中,蛤仔在鳃弧菌侵染后,*Lysozyme*、*Limp*、*Atpase*基因显著上调,表明溶菌酶在蛤仔抗鳃弧菌的免疫反应中起到了重要作用<sup>[27-28]</sup>。同时,本实验发现鳃弧菌侵染后蛤仔鳃组织中LZM活性显著增加,表明LZM在蛤仔抗弧菌的免疫反应中

起着关键作用<sup>[29]</sup>。此外,LZM活性与蛤仔体内载菌量表现出正相关关系,这种现象可能与蛤仔的先天免疫防御机制密切相关<sup>[30]</sup>。我们推测,当病原菌(如鳃弧菌)侵染时,蛤仔通过激活免疫系统增强LZM活性,从而抑制其增殖;随着载菌量的增加,免疫系统进一步上调LZM的表达和活性,以应对更高的病原负荷;而当载菌量下降时,病原胁迫减轻,LZM活性相应降低,反映了免疫反应的动态调节过程<sup>[31]</sup>。研究结果揭示了LZM在蛤仔抗弧菌的免疫中发挥了重要的防御作用,其活性变化可能是机体应对病原感染的直接响应<sup>[24]</sup>。为进一步研究贝类动物的免疫防御机制、病原-宿主相互作用以及免疫调节的分子机制提供了重要的理论基础。



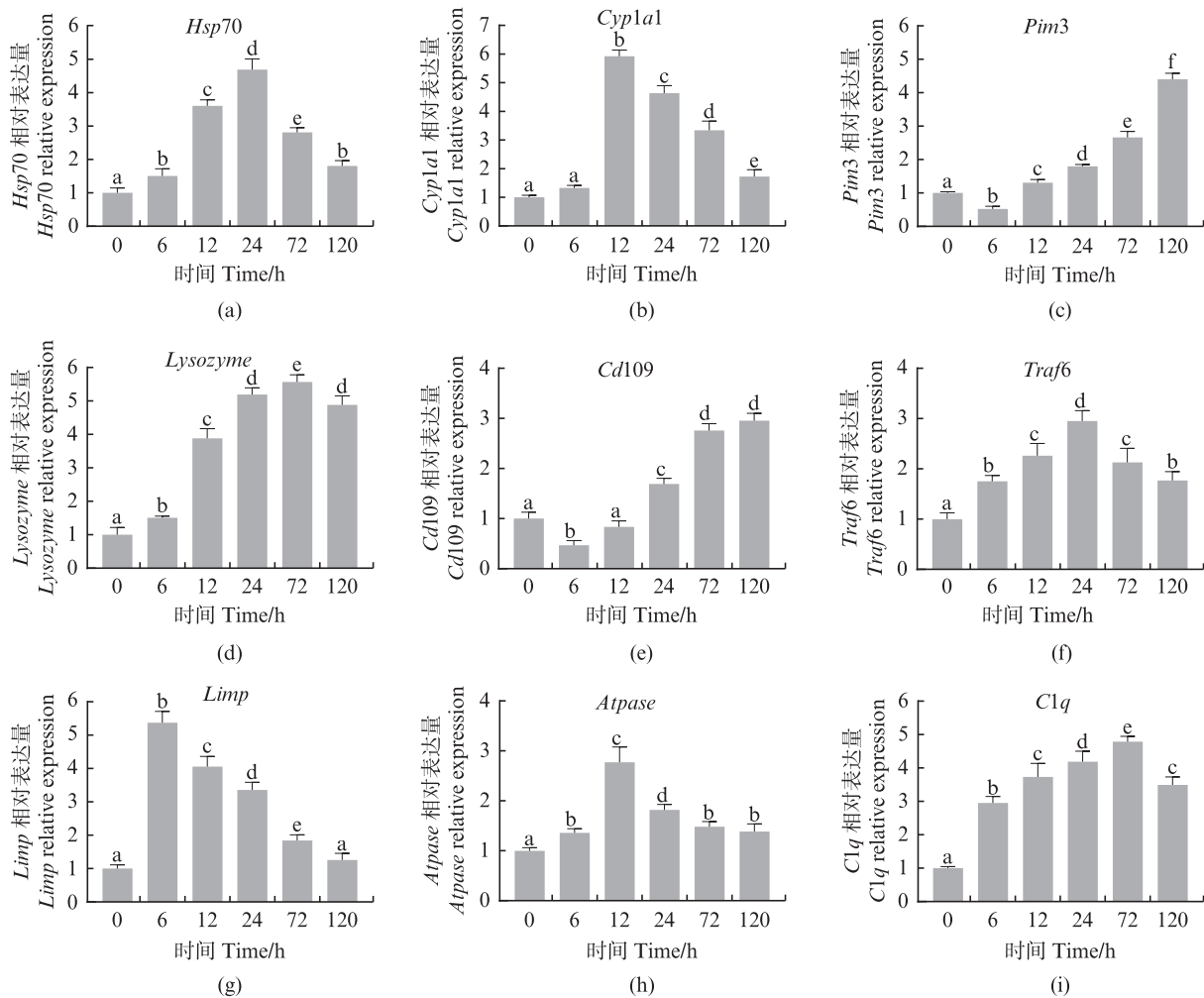
1, 3 为对照组, 2, 4 为半致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 组; 1, 2 放大倍数 100 倍; 3, 4 放大倍数 400 倍; 绿色箭头. 鳃结构正常; 蓝色箭头. 受损和严重收缩的鳃丝; 黑色箭头. 细胞坏死。

1, 3 represents the control group, and 2, 4 shows the semi-lethal concentration ( $LC_{50}$ ) group; The magnification of (1, 2) is 100 ×, and the magnification of (3, 4) is 400 ×; Green arrow. Normal gill structure; Blue arrow. Damaged and severely shrunk gill filaments; Black arrows. Cell necrosis.

图版 病理观察菲律宾蛤仔鳃组织

Plate Pathological observation gills of *R. philippinarum*





不同小写字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图5 鳃弧菌感染后蛤仔鳃组织中免疫相关基因在不同免疫阶段的表达水平

Fig. 5 Expression levels of immune-related genes in gill tissues at different immune stages following *V. anguillarum* stress

近年来的研究<sup>[32]</sup>表明, *Hsp70* 和 *Pim3* 等基因在贝类抗弧菌的先天免疫反应中起着关键调控作用。Hsp 家族是生物体内广泛存在的一类蛋白, YUE 等<sup>[33]</sup>研究表明, *Hsp70* 基因在文蛤的足、肝胰腺、外套膜和鳃中均有表达, 且在感染副溶血弧菌 24 h 后, *Hsp70* 在鳃组织中表达量显著上调, 这一发现与本研究结果类似。同时, 我们先前的研究也表明蛤仔在遭到鳃弧菌感染后可通过调节 *Hsp70* 基因激活内吞通路参与免疫应答<sup>[34]</sup>。在本实验中, 蛤仔感染鳃弧菌后, *Hsp70* 基因在 168 h 内显著上调, 表明 *Hsp70* 基因在蛤仔抗鳃弧菌的免疫防御机制中发挥重要作用。此外, *Pim3* 作为 Pim 家族的一员, 在调控细胞炎症反应和抑制病原体增殖中发挥关键作用<sup>[35]</sup>。研究<sup>[36]</sup>

表明, *Pim3* 能有效增强血细胞存活率, 增强宿主对副溶血性弧菌和链球菌的免疫防御能力。对长牡蛎的 Pim 家族分析表明, *Pim3* 可通过激活 NF- $\kappa$ B 通路, 在抗菌和抗炎免疫应答中发挥重要作用<sup>[37]</sup>。本研究中, *Pim3* 表达水平在前 6 h 显著下调, 可能是鳃弧菌的侵染抑制了蛤仔早期 (0~6 h) *Pim3* 的表达, 但随着蛤仔免疫系统的调节, *Pim3* 表达水平逐渐上调, 表明其参与了蛤仔对鳃弧菌的清除过程<sup>[38]</sup>。进一步通过 qPCR 分析发现, 感染 12 h 后 *Pim3* 的表达水平显著升高, 揭示了 *Pim3* 在蛤仔抗弧菌免疫应答中的重要功能<sup>[39]</sup>。

*Cyp1a1* 作为 Sive 酶蛋白超家族成员, 在软体动物的应激反应和代谢过程中发挥重要功能<sup>[40]</sup>。

研究<sup>[41]</sup>表明, *Cyp1a1*能有效调节贝类的外源性物质代谢、解毒和免疫过程,从而有效减轻贝类的炎症反应。*Traf6*是一种多功能信号分子,可介导TNF受体(TNFR)家族的信号传导,还在Toll样受体(TLR)超家族的下游信号传导中发挥关键作用<sup>[42]</sup>。近年来许多研究<sup>[43-44]</sup>表明, *Traf6*在软体动物的先天免疫中发挥重要作用。*C1q*是补体蛋白中的重要模式识别分子,在无脊椎动物的免疫反应中起重要作用<sup>[45]</sup>。本研究中,在鳃弧菌感染后, *Cyp1a1*、*Traf6*、*C1q*的表达水平显著上调,进一步证实了 *Cyp1a1*、*Traf6*、*C1q*在菲律宾蛤仔抗鳃弧菌的免疫反应中具有重要意义。此外, *Cd109*是TEPs的一个亚群,作为一种广泛分布于免疫细胞上的糖蛋白,在免疫识别和应答中起着至关重要的作用<sup>[46]</sup>。研究<sup>[47]</sup>表明, *Cd109*与马氏珠母贝血细胞对溶藻弧菌的吞噬能力密切相关。本研究中, *Cd109*在鳃弧菌感染过程中呈现先下调后上调的表达趋势,表明其参与了蛤仔抗鳃弧菌的免疫反应。

#### 4 总结

本研究通过浓度梯度实验明确了注射鳃弧菌 168 h 对菲律宾蛤仔的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为 6.08×10<sup>6</sup> CFU/(mL·g)。采用LZM活性测定、载菌量分析和鳃组织病理观察等方法,探究了半致死浓度(LC<sub>50</sub>)条件下蛤仔鳃组织载菌量和LZM活性在不同免疫阶段的变化趋势,揭示了在感染鳃弧菌 24 h 后鳃组织出现了明显的损伤,表明了鳃组织在免疫防御中的关键作用。此外, qPCR 结果表明了在注射半致死浓度(LC<sub>50</sub>)鳃弧菌胁迫下菲律宾蛤仔鳃组织中 9 种免疫基因在不同免疫阶段的变化趋势,从分子水平表明了这些基因在抗弧菌免疫反应中发挥着关键调控作用。本研究为探索菲律宾蛤仔抗鳃弧菌的免疫响应机制提供了参考价值。

作者声明本文无利益冲突。

#### 参考文献:

- [1] ZHANG Y M, NIE H T, YAN X W. Metabolomic analysis provides new insights into the heat-hardening response of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) to high temperature stress [J]. Science of the Total Environment, 2023, 857: 159430.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会编. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024.
- [3] MARTINEZ C, RODRIGUEZ S, VENCES A, et al. Role of the vibriolysin VemA secreted by the emergent pathogen *Vibrio europaeus* in the colonization of Manila clam mucus[J]. Microorganisms, 2022, 10(12): 2475.
- [4] ARUNKUMAR M, LEWIS OSCAR F, THAJUDDIN N, et al. In vitro and in vivo biofilm forming *Vibrio* spp: a significant threat in aquaculture [J]. Process Biochemistry, 2020, 94: 213-223.
- [5] MENG J, ZHANG L L, HUANG B Y, et al. Comparative analysis of oyster (*Crassostrea gigas*) immune responses under challenge by different *Vibrio* strains and conditions[J]. Molluscan Research, 2015, 35(1): 1-11.
- [6] ZHEN Y X, SHAO W K, CHAO Q H, et al. First characterization of bacterial pathogen, *Vibrio alginolyticus*, for *Porites andrewsi* white syndrome in the South China Sea[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75425.
- [7] SU X D, SUTARLIE L, LOH X J. Sensors, biosensors, and analytical technologies for aquaculture water quality [J]. Research, 2020, 2020: 8272705.
- [8] LI Y Q, SONG X R, WANG W L, et al. The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against secondary challenge with *Vibrio splendidus* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 71: 59-69.
- [9] WEIHRAUCH D, ALLEN G J P. Ammonia excretion in aquatic invertebrates: new insights and questions [J]. Journal of Experimental Biology, 2018, 221(2): jeb169219.
- [10] LU Z, QIU L M, WANG M Q, et al. Comparative study of three C1q domain containing proteins from pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2018, 78: 42-51.
- [11] AJUZIEOGU C A, ODOKUMA L O. Comparison of the sensitivity of *Crassostrea gigas* and *Vibrio fischeri* (Microtox) for toxicity assessment of produced water[J]. Journal of Advances in Biology & Biotechnology, 2018, 17(3): 1-10.
- [12] 葛端阳, 赵婷, 潘宝平. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)对青蛤(*Cyclina sinensis*)的毒性及半致死浓度研究[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(6): 1192-1195.
- GE D Y, ZHAO T, PAN B P. Toxicity test and half lethal concentration of *Vibrio anguillarum* to the clam *Cyclina*



- sinensis* [J]. *Oceanologia ET Limnologia Sinica*, 2012, 43(6): 1192-1195.
- [13] 杨千元, 李敏, 胡高宇, 等. 哈维氏弧菌对泥蚶的毒性及半致死浓度研究[J]. *海洋科学*, 2023, 47(7): 130-137.
- YANG Q Y, LI M, HU G Y, et al. Toxicity test and median lethal concentration of *Vibrio harveyi* for the blood clam *Tegillarca granosa* [J]. *Marine Sciences*, 2023, 47(7): 130-137.
- [14] 杨千元, 滕爽爽, 蔡逸龙, 等. 哈维氏弧菌浸泡感染下泥蚶(*Tegillarca granosa*)不同组织弧菌载量的变化规律分析[J]. *海洋与湖沼*, 2021, 52(6): 1506-1513.
- YANG Q Y, TENG S S, CAI Y L, et al. Load variation of *vibrio harveyi* in the blood clam *Tegillarca granosa* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, 52(6): 1506-1513.
- [15] RODRÍGUEZ-ANGELES M G, GIONO-CEREZO S, MORENO-ESCOBAR A, et al. Polymerase chain reaction (PCR) for the identification of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in oysters [J]. *Revista Latinoamericana De Microbiologia*, 1994, 36(4): 295-306.
- [16] YIN Z H, NIE H T, JIANG K Y, et al. Molecular mechanisms underlying *Vibrio* tolerance in *Ruditapes philippinarum* revealed by comparative transcriptome profiling [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 879337.
- [17] YU J J, TENG S S, YUE X, et al. The Toll pathway and Duox-ROS system are required for the clam antibacterial immune response in the hepatopancreas [J]. *Aquaculture*, 2023, 574: 739637.
- [18] YAN F Y, LI H, CHEN X, et al. Screening of Suitable Reference Genes for Immune Gene Expression Analysis Stimulated by *Vibrio anguillarum* and Copper Ions in Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Genes*, 2023, 14(5): 1099.
- [19] BILAN J C. Prevalence and control of *Salmonella* spp. and sanitary indicator microorganisms in wild caught and farm raised catfish (*Ictalurus punctatus*) [D]. Baton Rouge: Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2019.
- [20] 于婕. 菲律宾蛤仔 *ATG16L1* 介导细胞自噬响应副溶血弧菌感染后免疫反应的作用研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2024.
- YU J. Study on the role of *ATG16L1* in mediating autophagy immunity response of *Vibrio parahaemolyticus* challenge in *Ruditapes philippinarum* [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2024.
- [21] ZHAO X L, DUAN X M, WANG Z H, et al. Comparative transcriptome analysis of *Sinonovacula constricta* in gills and hepatopancreas in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 523-535.
- [22] 祝艳霞, 母昌考, 王春琳. 温度、盐度变化及鳃弧菌刺激对菲律宾蛤仔 I 型溶菌酶基因表达的影响[J]. *水产学报*, 2016, 40(12): 1813-1822.
- ZHU Y X, MU C K, WANG C L. Expression analysis of two I-type lysozyme genes from *Ruditapes philippinarum* under temperature and salinity stress and *Vibrio anguillarum* challenge [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(12): 1813-1822.
- [23] 王瑞, 于佳佳, 王鸿霞, 等. 副溶血弧菌攻毒过程中文蛤肝胰腺弧菌载量变化的分析[J]. *海洋科学*, 2019, 43(4): 29-35.
- WANG R, YU J J, WANG H X, et al. *Vibrio* load variation in the hepatopancreas of clam (*Meretrix petechialis*) under *Vibrio parahaemolyticus* challenge [J]. *Marine Sciences*, 2019, 43(4): 29-35.
- [24] ZANNELLA C, MOSCA F, MARIANI F, et al. Microbial diseases of bivalve mollusks: infections, immunology and antimicrobial defense [J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(6): 182.
- [25] KUWANO Y, YONEDA K, KAWAGUCHI Y, et al. The tertiary structure of an i-type lysozyme isolated from the common orient clam (*Meretrix lusoria*) [J]. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2013, 69(11): 1202-1206.
- [26] 郭瀚泽. TFE3-LIMP2 轴的分子调控及其对胆固醇造成溶酶体压力缓解作用研究[D]. 大连: 大连大学, 2022.
- GUO H Z. Study on the molecular regulation of the TFE3-LIMP2 axis and its alleviation of cholesterol-induced lysosomal stress [D]. Dalian: Dalian University, 2022.
- [27] WANG Y H, LI D D, ZHANG H, et al. Transcriptome analysis of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) under *Vibrio parahaemolyticus* challenge in a low-salinity environment provides molecular insights into immune response [J]. *Aquaculture*, 2024, 584: 740681.
- [28] TAN F H, CAO M, GE X F, et al. Identification and initial functional characterization of lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 99: 103412.
- [29] ZHENG Y, ZHA S J, ZHANG W F, et al. Integrated RNA-seq and RNAi Analysis of the Roles of the *Hsp70* and *SP* Genes in Red-Shell *Meretrix meretrix* Tolerance to the Pathogen *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Marine Biotechnology*, 2022, 24(5): 942-955.
- [30] YANG Q Y, XIAO G Q, CHEN R, et al. Immune responses of hemocytes in the blood clam *Tegillarca granosa* in response to in vivo *Vibrio harveyi* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 132: 108447.

- [31] YANG Q L, GUO K F, ZHOU X C, et al. Histopathology, antioxidant responses, transcriptome and gene expression analysis in triangle sail mussel *Hyriopsis cumingii* after bacterial infection [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 124: 104175.
- [32] 姚璐. 缢蛏 *Hsp* 和 *caspase* 基因家族分析及干露胁迫下的表达模式和生理响应研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.
- YAO L. Analysis of *Hsp* and *caspase* gene family and their expression patterns and physiological responses to dry exposure stress in *Sinonovacula constricta* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023 (in chinese).
- [33] YUE X, LIU B Z, SUN L, et al. Cloning and characterization of a *hsp70* gene from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* which is involved in the immune response against bacterial infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(3): 791-799.
- [34] JIA J X, NIE H T. Integrated microRNA study and pathological analysis provides new insights into the immune response of *Ruditapes philippinarum* under *Vibrio anguillarum* challenge [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2025, 162: 105270.
- [35] DE VRIES M, HEIJINK I H, GRAS R, et al. *Pim1* kinase protects airway epithelial cells from cigarette smoke-induced damage and airway inflammation [J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2014, 307(3): L240-L251.
- [36] PEREIRO P, ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ M, VALENZUELA-MUÑOZ V, et al. RNA-Seq analysis reveals that spring viraemia of carp virus induces a broad spectrum of PIM kinases in zebrafish kidney that promote viral entry [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 99: 86-98.
- [37] JINESH G G, MOKKAPATI S, ZHU K Y, et al. *Pim* kinase isoforms: devils defending cancer cells from therapeutic and immune attacks [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(11): 1203-1213.
- [38] AWEYA J J, WANG W, ZHANG Y L, et al. Identification and molecular characterization of the *Pim1* serine/threonine kinase homolog in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 491-500.
- [39] BOAMAH G A, HUANG Z K, SHEN Y, W et al. Transcriptome analysis reveals fluid shear stress (FSS) and atherosclerosis pathway as a candidate molecular mechanism of short-term low salinity stress tolerance in abalone [J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 392.
- [40] WERCK-REICHHART D, FEREREISEN R. *Cytochromes P450: a success story* [J]. *Genome biology*, 2000, 1(6): reviews3003.
- [41] 李萌. 翡翠贻贝 *CYP1A1*、*CYP3A4* 及其在 DSP 毒素代谢中的作用 [D]. 广州: 暨南大学, 2018.
- LI M. Study on the roles of *CYP1A1*, *CYP3A4* in DSP toxin metabolism in *Perna viridis* [D]. Guangzhou: Jinan University, 2018.
- [42] WU H, ARRON J R. *TRAF6*, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology [J]. *Bioessays*, 2003, 25(11): 1096-1105.
- [43] WEI J G, ZANG S Q, XU M, et al. *TRAF6* is a critical factor in fish immune response to virus infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 6-12.
- [44] ZHOU S M, LI M, YANG N, et al. First description and expression analysis of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (*TRAF6*) from the swimming crab, *Portunus trituberculatus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 205-210.
- [45] WANG L L, WANG L L, KONG P F, et al. A novel *C1qDC* protein acting as pattern recognition receptor in scallop *Argopecten irradians* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(2): 427-435.
- [46] SHOKAL U, ELEFTHERIANOS I. Evolution and function of thioester-containing proteins and the complement system in the innate immune response [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 759.
- [47] WANG J, LI G Y, BAI L F, et al. Characterization of a thioester-containing protein from the pearl oyster *Pinctada fucata* and its role in phagocytosis [J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 21: 100833.

## Effects of *Vibrio anguillarum* infection on the survival, gill tissue and immune-related gene expression of *Ruditapes philippinarum*

JIA Jianxin<sup>1,2</sup>, WANG Ruiyao<sup>1,2</sup>, LI Binghui<sup>1,2</sup>, NIE Hongtao<sup>1,2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning, China; 2. Engineering Research Center of Shellfish Culture and Breeding in Liaoning Province, Dalian 116023, Liaoning, China)

**Abstract:** To explore the semi-lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of *Vibrio anguillarum* infection in *Ruditapes philippinarum* and its effects on gill tissues and immune related genes. In this study, *R. philippinarum* was challenged with five different concentrations of *V. anguillarum* for 168 h. Meanwhile, the LZM activity, bacterial load, pathological analysis and the expression of immune-related genes in the gills were conducted. The results showed that the challenge group injected with *V. anguillarum* at  $5 \times 10^7$  CFU/mL for 168 h corresponded to the semi-lethal concentration ( $LC_{50}$ ) group, and the semi-lethal concentration ( $LC_{50}$ ) was  $6.08 \times 10^6$  CFU/(mL·g), with a survival rate of 52.3%. The survival rate was the lowest at 33.6% in the  $5 \times 10^8$  CFU/mL group and the highest survival rate of 67.0% was observed in the  $5 \times 10^6$  CFU/mL group. The results indicated that the bacterial load peaked at 24 h (7.53 CFU/mg), and then gradually decreased, reaching 4.26 CFU/mg at 120 h in semi-lethal concentration ( $LC_{50}$ ) groups. The LZM activity significantly increased in the gills and peaked at 12 h (123.03 U/mg prot/mL), and then gradually decreased, reaching 77.92 U/mg prot/mL at 120 h. The pathological analysis revealed that the gills filaments showed disordered arrangement, severe shrinkage, and increased gaps at 24 h. Additionally, quantitative real-time PCR (qPCR) analysis revealed that *V. anguillarum* infection significantly upregulated the expression of several immune related genes, including *heat shock protein (Hsp70)*, *Cytochrome p450 (Cyp1a1)*, *serine/threonine protein kinase pim3 (Pim3)*, *Lysozyme*, *Leukocyte differentiation antigen (Cd109)* and *tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (Traf6)* ( $P < 0.05$ ), revealing their important roles in the immune defense response of *R. philippinarum* against *V. anguillarum*. This study preliminarily explored the effects of *V. anguillarum* on *R. philippinarum*, providing new insights for the innate immune mechanism of the *R. philippinarum* against *V. anguillarum*.

**Key words:** *Ruditapes philippinarum*; *Vibrio anguillarum*; gill; half-lethal concentration ( $LC_{50}$ )