

大口黑鲈幼鱼肝脏抗大口黑鲈弹状病毒应答的转录组分析

乔 娣¹, 雷 宁¹, 朱俊杰¹, 张超楠^{2,3}, 王艳超⁴, 周 玲⁴

1. 湖州师范学院 生命科学学院, 浙江 湖州 313000

2. 浙江生态文明研究院, 浙江 湖州 313000

3. 浙江大学 环境科学与工程学院, 浙江 杭州 310058

4. 邢台学院/河北省数字化淡水水产养殖技术重点实验室, 河北 邢台 054001

摘要: 为探究大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 对大口黑鲈弹状病毒 (*Micropterus salmoides* rhabdovirus, MSRV) 的抗病反应和代谢调控网络, 揭示其抗病的免疫分子机制并为后续大口黑鲈的分子生物学研究提供基础数据, 利用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台, 对 MSRV 感染的大口黑鲈易感组、抗病组 and 对照组的肝脏组织进行转录组测序分析, 对所得基因的功能注释发现, 被注释的差异基因主要与细胞过程、细胞、结合和催化活性等功能有关。KEGG 通路富集分析结果显示, 大口黑鲈肝脏组织在 MSRV 感染下高表达的差异基因富集在药物代谢-细胞色素 P450、细胞色素 P450 对外源性药物的代谢作用、蛋白酶体、抗坏血酸和醛酸盐代谢、脂肪酸降解等代谢相关通路; 进一步筛选免疫相关基因进行通路分析发现, 与抗 MSRV 免疫应答相关的通路主要为 NOD 样受体信号传导、C 型凝集素受体信号、细胞溶质 DNA 传感途径、Toll 样受体信号传导和 RIG-I 样受体信号传导等。最后, 通过 qRT-PCR 验证了差异基因的变化趋势与转录组测序分析结果的一致性, 证明了转录组数据的可靠性。获得的差异基因和调控通路可为大口黑鲈抗 MSRV 免疫的分子机制和疾病防控研究提供理论基础。

关键词: 大口黑鲈; 大口黑鲈弹状病毒; 肝脏; 转录组测序; 差异表达基因

中图分类号: S 941

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Transcriptome analysis of liver anti-MSRV responses in juvenile large-mouth bass (*Micropterus salmoides*)

QIAO Di¹, LEI Ning¹, ZHU Junjie¹, ZHANG Chaonan^{2,3}, WANG Yanchao⁴, ZHOU Ling⁴

1. College of Life Science, Huzhou University, Huzhou 313000, China

2. Zhejiang Ecological Civilization Academy, Huzhou 313000, China

3. Department of Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

4. Xingtai University/Hebei Key Laboratory of Digital Freshwater Aquaculture Technology, Xingtai 054001, China

Abstract: In order to investigate the disease resistance and metabolic regulatory network of *Micropterus salmoides* to *M. salmoides* rhabdovirus (MSRV), uncover the immunomolecular mechanism of its disease resistance, and provide genetic data references for subsequent molecular biology investigation of *M. salmoides*, we used the Illumina NovaSeq 6000 sequencing platform to analyze the transcriptome sequencing of liver tissues from susceptible group, disease-resistant group and control group of *M. salmoides* infected with MSRV. Functional annotation of obtained genes reveals that the annotated differentially expressed genes were mainly associated with functions such as cellular process, cell, binding and catalytic activity, etc. The KEGG pathway en-

收稿日期: 2024-03-10; 修回日期: 2024-04-29

基金项目: 浙江省农业新品种选育重大科技专项资金资助 (2021C02069-2-02)

作者简介: 乔 娣 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种与繁殖。E-mail: qiao.8899@foxmail.com

通信作者: 朱俊杰 (1979—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为水产动物遗传育种与繁殖。E-mail: zhjj@zjhu.edu.cn

richment analysis indicates that the differentially expressed genes with high expression levels in *M. salmoides* liver tissue with MSRV infection were enriched in metabolic pathways, including drug metabolism-cytochrome P450, metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, proteasome, ascorbate and aldarate metabolism, fatty acid degradation, as well as other metabolic processes. Further screening of immune-related genes for pathway analysis shows that the main pathways associated with the immune response against MSRV were NOD-like receptor signaling pathway, C-type lectin receptor signaling pathway, cytosolic DNA-sensing pathway, Toll-like receptor signaling pathway, RIG-I-like receptor signaling pathway, etc. Finally, we verified the consistency of the differential gene trends with the results of transcriptome sequencing analysis by qRT-PCR, demonstrating the reliability of the transcriptome data. The differential genes and regulatory pathways identified in this study will provide a theoretical basis for research on the molecular mechanism of *M. salmoides* immunity against MSRV as well as disease prevention and control.

Keywords: *Micropterus salmoides*; *M. salmoides* rhabdovirus; Liver; Transcriptome sequencing; Differentially expressed genes

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 又名加州鲈, 隶属鲈形目、太阳鱼科、黑鲈属, 原产于美国加利福尼亚州, 为广温性淡水鱼类。大口黑鲈具有适应性强、养殖周期短、生长迅速等优点, 于 20 世纪 70 年代引入中国后成功进行了人工繁育研究, 现已推广到多省, 成为我国淡水养殖的主要鱼类品种之一。据统计, 2022 年全国大口黑鲈养殖总产量已突破 80 万吨, 比 2021 年增长 14.30%, 主产区包括广东、浙江和江苏等^[1]。随着产业升级与结构调整, 大口黑鲈养殖规模逐年扩大, 养殖过程中时常受到一些细菌、真菌、病毒和寄生虫的感染, 严重影响了其产业的健康发展^[2], 其中以大口黑鲈弹状病毒 (*Micropterus salmoides* rhabdovirus, MSRV) 感染引起的病害最为严重^[3]。MSRV 属于水泡性病毒属, 该病常发于苗种期, 传播媒介通常是亲本繁殖或养殖水体。MSRV 病传播速度快, 致死率极高 (90%~100%)^[4], 每年都造成巨大的经济损失。

肝脏作为对鱼类消化、代谢和排泄等具有重要作用的器官, 具有处理外来有毒物质和代谢产生的有害废物的功能^[5]。肝脏还能吞噬、隔离、消除入侵和内生的各种病原体, 是鱼类重要的免疫器官, 因在免疫和新陈代谢方面的双重作用, 肝脏成为宿主防御细菌、病毒入侵时调整代谢功能的重要器官^[6-8]。遭受外来病原攻击的鱼类, 肝脏往往会出血, 同时也出现肝细胞边界模糊、坏死等现象, 例如青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)^[9]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[10]、罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)^[11] 等。临床发现, 感染 MSRV 的大口黑鲈, 肝脏会淤积大量血液、肝细胞呈程度不一的空泡变性和弥散性坏死, 且细胞肿大、界限不清, 细

胞索排列紊乱等^[12], 但与此相关的致病机制研究尚未见报道。转录组测序技术 (RNA-seq) 可以获得特定条件下生物体细胞或组织的所有转录本信息, 分析鱼类组织在环境胁迫下的转录组变化及其调控机理, 进而揭示鱼体对不同环境改变的生长发育、物质代谢、免疫调控及相关信号通路的响应^[13]。目前已有研究通过 RNA-seq 技术揭示了复合诱变乳杆菌^[14]、不同浓度纳米硒^[15] 以及氨氮胁迫^[16] 等对大口黑鲈肝脏的影响机制。

为了进一步探索大口黑鲈肝脏在 MSRV 胁迫下的具体作用机制, 本研究比较了对照组和感染了 MSRV 的大口黑鲈肝脏转录组, 旨在鉴定与解读 MSRV 感染诱导的肝脏相关的调控网络和通路, 以期为进一步了解大口黑鲈与其他养殖鱼类的肝脏在抗病免疫方面的作用提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验设计与样本采集

大口黑鲈“浙鲈 1 号”鱼苗 [(5.61±0.33) cm] 购自湖州湖旺水产种业有限公司, 在实验室暂养 7 d 后, 挑选规格一致的健康大口黑鲈进行实验。

大口黑鲈人工感染方法参照文献^[17]: 将大口黑鲈随机分为 2 组, 实验组 300 尾, 浸泡在含有大口黑鲈弹状病毒悬液 (菌密度: 3.05×10^4 拷贝·mL⁻¹) 的水体中; 对照组 100 尾, 浸泡在含有 PBS 溶液的水体中, 30 min 后加水至养殖箱容积 (120 L) 的 2/3。实验期间, 温度为 22~24 °C, pH 为 6.8~8.0, 曝气增氧保持溶解氧质量浓度为 5.7 mg·L⁻¹, 适当投喂, 每周换水 2 次, 每次约换 1/3 水量。

被感染的鱼逐渐出现体色发黑、鳃出血、尾部出血等症状, 攻毒期间对照组无死亡。收集垂死的鱼 (水面漫游、螺旋打转) 作为易感组 (SL), 将攻

毒 7 d 后仍存活的个体作为抗病组 (RL)。在感染过程中, 收集易感个体时及时分离肝脏组织, 并迅速放入液氮中冻存, 后转至 -80°C 冰箱保存; 抗病组 and 对照组 (CL) 的肝脏组织则在感染实验完毕后采集。

1.2 RNA 提取、文库构建和高通量测序

利用 Trizol 法提取大口黑鲈易感组、抗病组和对照组的肝脏组织总 RNA, 用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测质量和完整性。当提取的 RNA 纯度满足 $\text{OD}_{260/280}$ 介于 1.8~2.2、 $\text{OD}_{260/230}$ 介于 1.0~2.5, 质量浓度 $\geq 40 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, 即为合格样品。对合格的总 RNA 样品进行 cDNA 测序文库的构建。使用 Hieff NGS Ultima Dual-mode mRNA Library Prep Kit for Illumina (Yeast Biotechnology) 生成测序文库, 文库构建完成后在 Illumina NovaSeq 6000 平台进行测序 (由北京百迈客生物科技有限公司完成)。

1.3 基因序列组装及序列比对

利用 RNA-seq 得到 Reads 短片段, 定位与片段相关的基因位置, 即将质控后的高质量 Clean Reads 与参考基因组 (*Micropterus salmoides*, GCF_014851395.1) 进行比对。比对和组装分别借助工具 HISAT2^[18] 和 StringTie^[19]。

1.4 筛选差异表达基因和富集分析

以 FPKM (Fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments) 值表示 Unigene 的表达丰度。经 FPKM 标准化处理后得到对数值 $\log_2$ (Fold change, FC), 即为各组样品间不同基因的表达量。用软件 DESeq2^[20] 分析样品组间的差异, 校正后得到 FDR (False discovery rate) 值。筛选差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs) 的标准设为: $\text{FDR} \leq 0.01$ 且差异倍数 $\text{FC} \geq 2$, 从而获得差异表达矩阵。基于差异表达矩阵, 对差异表达基因进行功能及代谢通路分析 (GO 分类和 KEGG 富集分析)。

1.5 qRT-PCR 验证

根据提取的肝脏组织总 RNA, 反转录生成 cDNA, 随机选取 5 个差异表达显著的基因, 根据大口黑鲈基因组数据库中的基因序列设计实时荧光定量引物 (表 1), 以 β -actin 作为内参基因, 借助实时荧光定量 PCR 进行验证, 操作按照 TB Green[®] premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa) 试剂盒说明书进行, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法对目的基因的表达

表1 qRT-PCR 验证基因及引物设计
Table 1 Gene selection and primer design for qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')
<i>LOC119899145</i>	F: GCTGTGGCTGTGCTCAGTCTTC R: GCTGCTCTCTCCCTGGATTTCAG
<i>txnipa</i>	F: ACAGCGTGAGCAGCCAGGAG R: TTGGTCCAGGCGGCAGTCTC
<i>irf1b</i>	F: AGGGAGCCAGTGAGTGAATCTTC R: GTGAGGTCTGAGCCAAAGTTGTG
<i>psmb7</i>	F: GGCATGGTGGTGGCAGACAAG R: AGGTGGAGGAGATGATCTGAGTGG
<i>f13a1b</i>	F: GCCAATCACCAACAGAGGAGACC R: CCCACCAGCACACCTTCATCATC
β -actin	F: AGTGCTGGATTGGGTGTTCA R: CTGGATTCTTTGTGGCAGAGTAA

水平进行分析, 每个样品检测 3 次, 结果与转录组测序结果进行比较。

2 结果

2.1 转录组测序分析与组装结果

本研究构建了大口黑鲈对照组和 MSRV 感染后的易感组、抗病组肝脏组织共 9 个样品的转录组文库, 利用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行测序, 在删除包含接头、poly-N 和低质量的序列后, 共获得 Clean Data 61.41 Gb, 各样品 Clean Data 均达到 5.99 Gb。Q20、Q30 的碱基占比分别在 98.28%、95.03% 以上, Clean Data 中 G 和 C 两种碱基占总碱基的 48% 以上 (表 2)。测序所得数据质量可靠, 可以进行后续分析。

2.2 差异表达分析结果

对对照组、抗病组、易感组的肝脏中具有表达差异的基因进行分析筛选, 结果显示, CL vs RL 组共有 391 个 DEGs, 其中上调和下调的基因分别为 247 和 144 个; CL vs SL 组共有 6 142 个 DEGs, 其中上调和下调的基因分别为 2 917 和 3 225 个; SL vs RL 组共有 6 264 个 DEGs, 其中上调和下调的基因分别为 3 317 和 2 947 个 (图 1)。综合分析发现, 与 CL 组相比, RL 和 SL 组分别有 38 和 1 305 个特有的 DEGs; 与 SL 组相比, RL 组有 1 460 个特有的 DEGs; 3 个基因集共有的 DEGs 为 146 个 (图 2)。

表2 测序数据统计
Table 2 Summary of sequencing data

样品名称 Sample	过滤后数据 Clean reads	过滤后碱基 Clean base	GC 含量 GC Content/%	Q20/%	Q30/%
CL1	23 397 649	6 999 847 928	48.72	98.38	95.29
CL2	24 381 449	7 294 667 658	48.68	98.34	95.21
CL3	26 205 769	7 840 012 100	48.76	98.37	95.31
RL1	23 989 032	7 180 334 774	48.59	98.39	95.28
RL2	20 024 010	5 993 917 232	49.10	98.33	95.15
RL3	22 668 844	6 783 389 398	48.71	98.28	95.03
SL1	20 875 161	6 245 826 768	48.27	98.44	95.42
SL2	23 111 479	6 915 706 788	48.33	98.41	95.34
SL3	20 557 039	6 151 902 784	48.18	98.34	95.13

注: CL. 对照组; RL. 抗病组; SL. 易感组。
Note: CL. Control group; RL. Disease-resistant group; SL. Susceptible group.

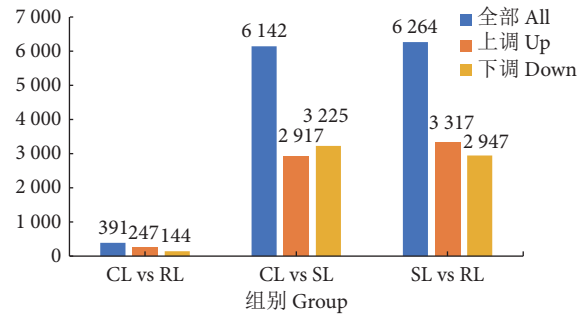


图1 各比较组差异表达基因统计图

注: CL. 对照组; RL. 抗病组; SL. 易感组。

Fig. 1 Statistical chart of DEGs for each group

Note: CL. Control group; RL. Disease-resistant group; SL. Susceptible group.

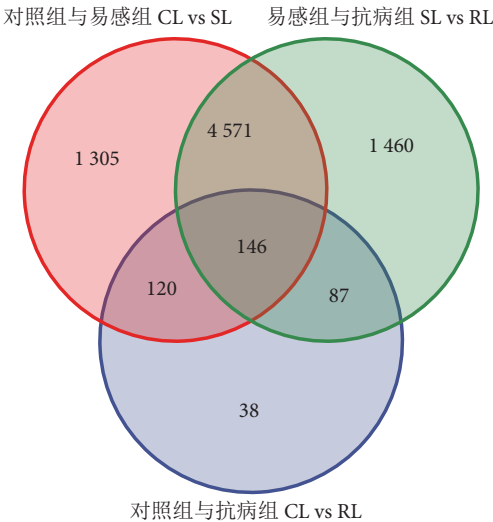


图2 差异表达基因维恩图

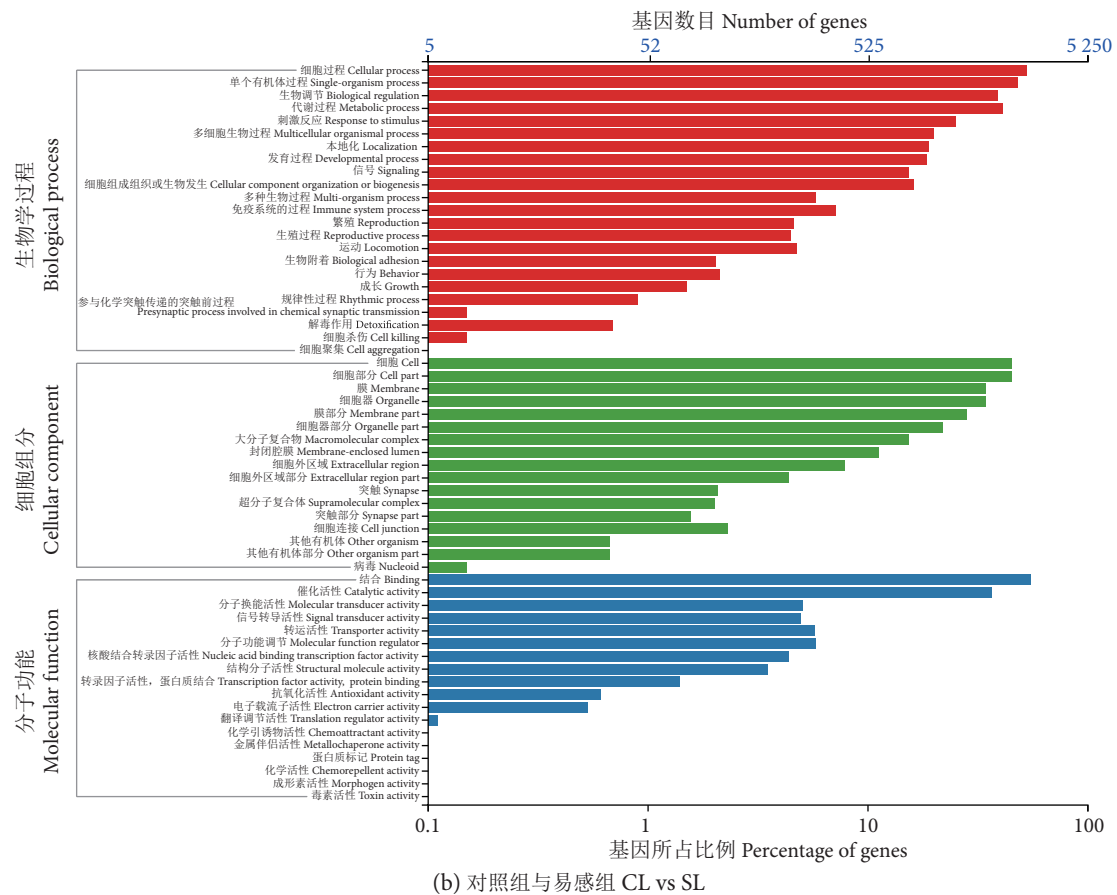
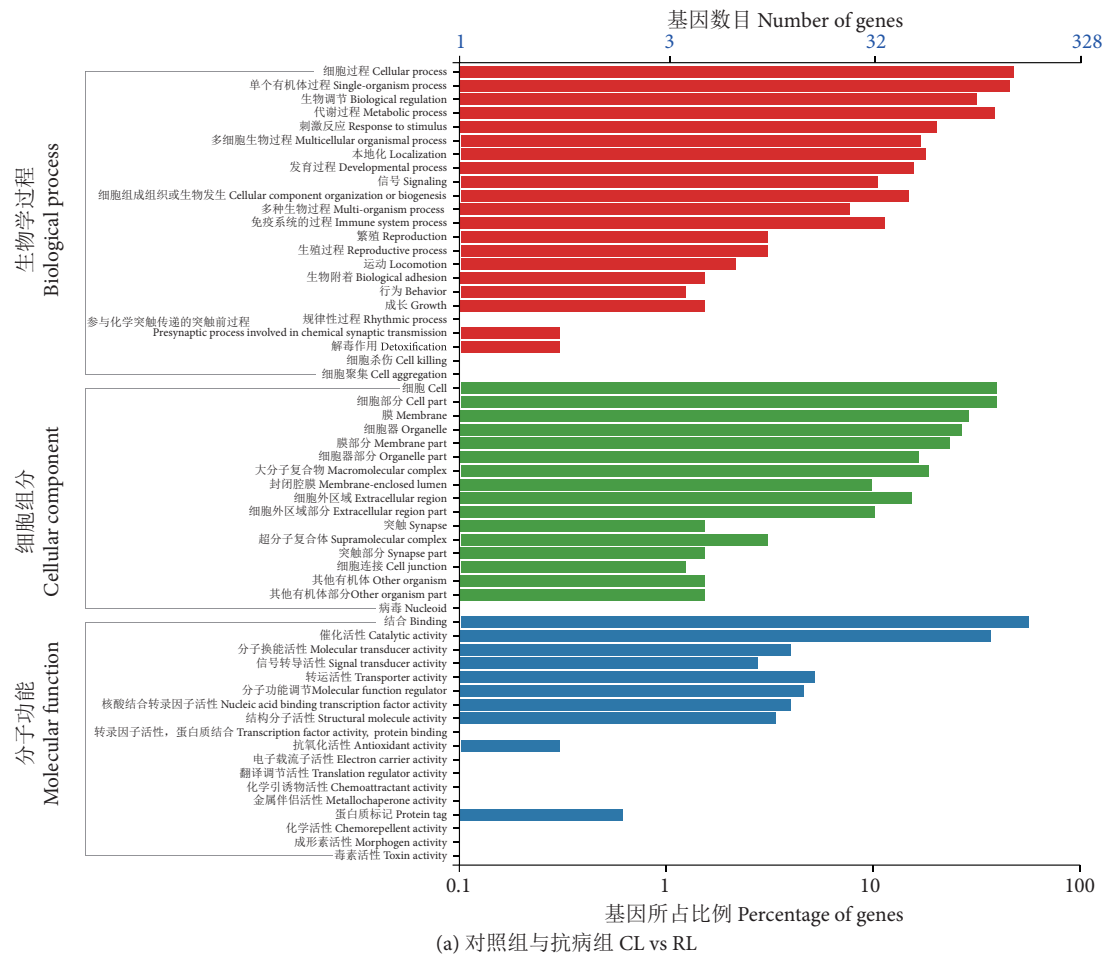
Fig. 2 Venn diagram of DEGs

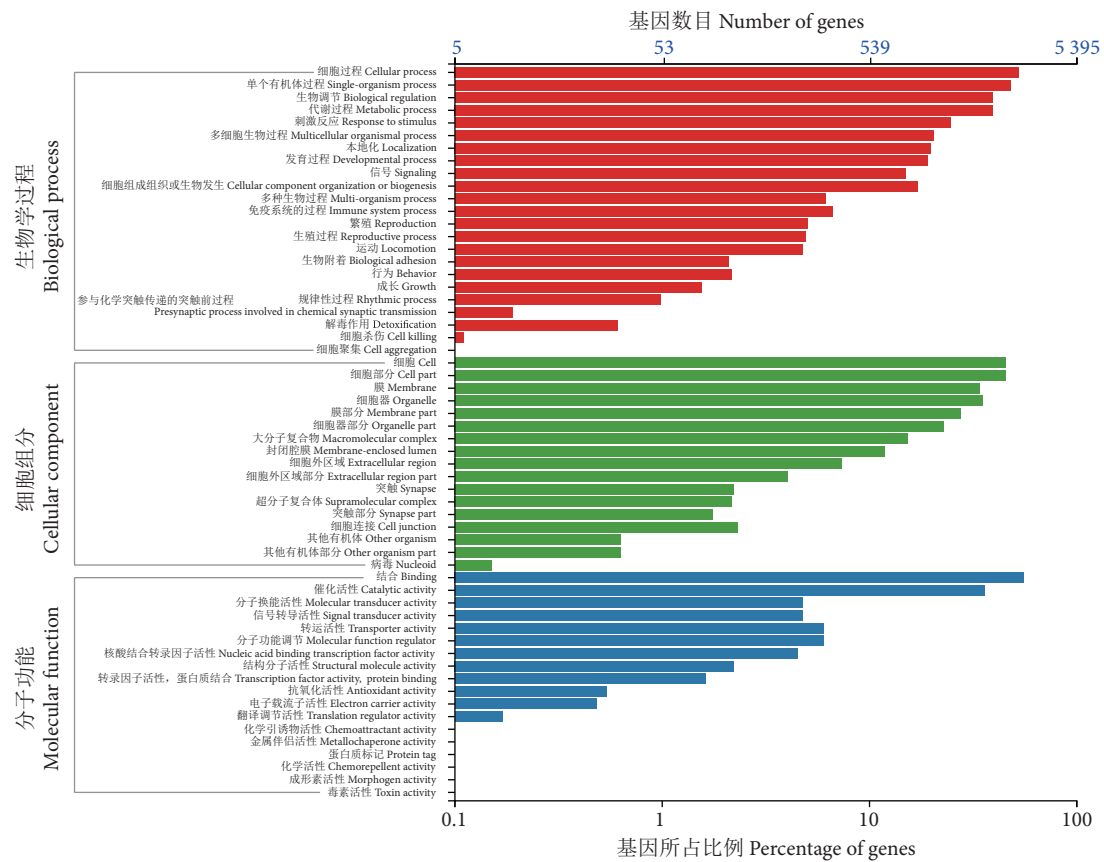
2.3 差异表达基因 GO 功能注释分析

为探究大口黑鲈肝脏组织在抗 MSRV 过程中 DEGs 所涉及的生理调控, 对 DEGs 进行 GO 功能注释分析发现, DEGs 分布于生物学过程 (Biological process)、细胞组分 (Cellular component)、分子功能 (Molecular function), 富集 DEGs 数目最多的均为生物学过程。CL vs RL 组共有 328 个 DEGs 被注释到 46 个 GO 功能条目中, 生物学过程、细胞组分、分子功能分别注释到的条目为 20、16、10 条 (图 3-a); CL vs SL 组共有 5250 个 DEGs 被注释到 51 个 GO 功能条目中, 生物学过程、细胞组分、分子功能分别注释到的条目为 22、17、12 条 (图 3-b); SL vs RL 组共有 5395 个 DEGs 被注释到 51 个 GO 功能条目中, 生物学过程、细胞组分、分子功能分别注释到的条目为 22、17、12 条 (图 3-c)。其中, 生物学过程均显著富集在细胞过程和单个有机体过程, 细胞组分均显著富集在细胞、细胞部分和膜, 分子功能均显著富集在结合和催化活性。

2.4 差异表达基因 KEGG 通路富集分析

进一步探究大口黑鲈在 MSRV 胁迫下 DEGs 的生物学功能, 对 DEGs 进行 KEGG 功能注释发现, 各比较组均成功注释到细胞进程 (Cellular processes)、环境信息处理 (Environmental information processing)、遗传信息处理 (Genetic information processing)、人类疾病 (Human diseases)、代谢作用 (Metabolism), 其中 CL vs SL 组、SL vs RL 组还





(c) 易感组与抗病组 SL vs RL

图3 各比较组 DEGs 的 GO 功能注释

Fig. 3 GO functional classification of DEGs in each group

注释到生物系统 (Organismal systems), 注释条目最多的均为细胞进程。对 DEGs 进行 KEGG 富集分析发现, CL vs RL 组具有显著差异的通路有药物代谢-其他酶 (Drug metabolism-other enzymes)、丙型肝炎 (Hepatitis C)、蛋白酶体 (Proteasome)、细胞色素 P450 对外源性药物的代谢作用 (Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450)、抗坏血酸和醛酸盐代谢 (Ascorbate and aldarate metabolism)、药物代谢-细胞色素 P450 (Drug metabolism-cytochrome P450) (图 4-a); CL vs SL 组具有显著差异的通路有药物代谢-细胞色素 P450、碳代谢 (Carbon metabolism)、脂肪酸降解 (Fatty acid degradation)、蛋白酶体、核糖体 (Ribosome) 等 (图 4-b); SL vs RL 组具有显著差异的通路有细胞色素 P450 对外源性药物的代谢作用、碳代谢、药物代谢-细胞色素 P450、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (Glycine, serine and threonine metabolism)、蛋白酶体等 (图 4-c)。

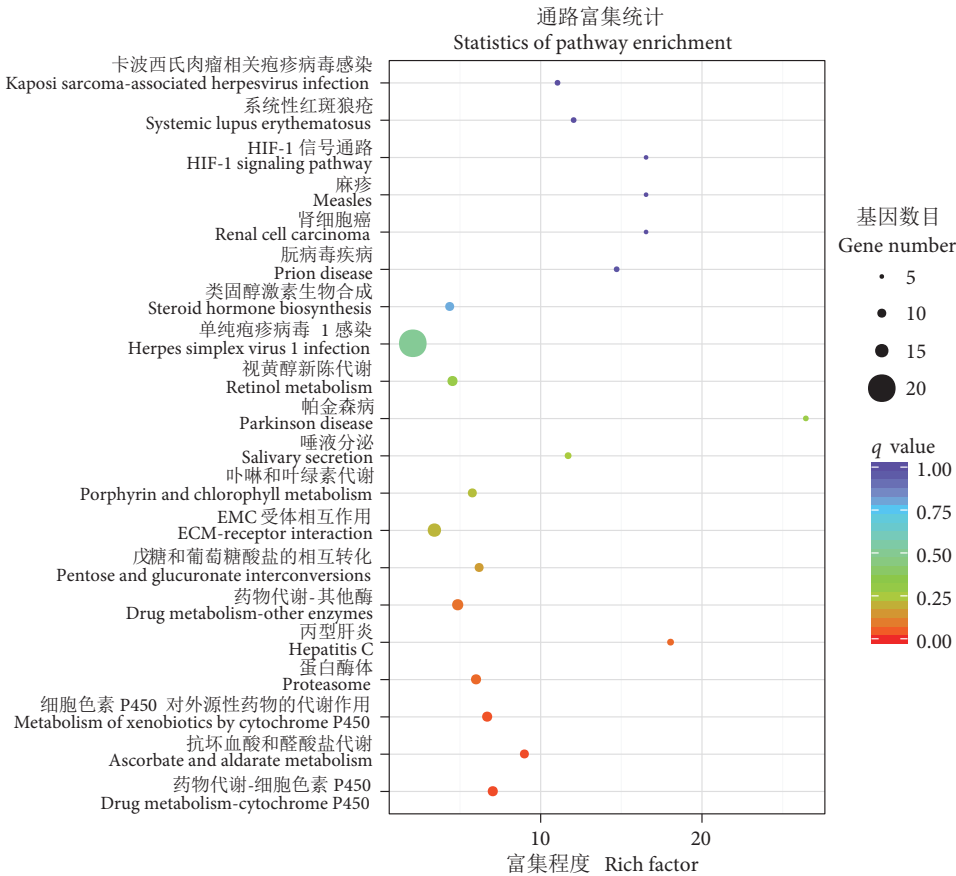
2.5 免疫相关 DEGs 富集分析

依据 KEGG 注释结果对免疫功能分类中的基因进行筛选, 对筛选出的基因进行通路富集发现,

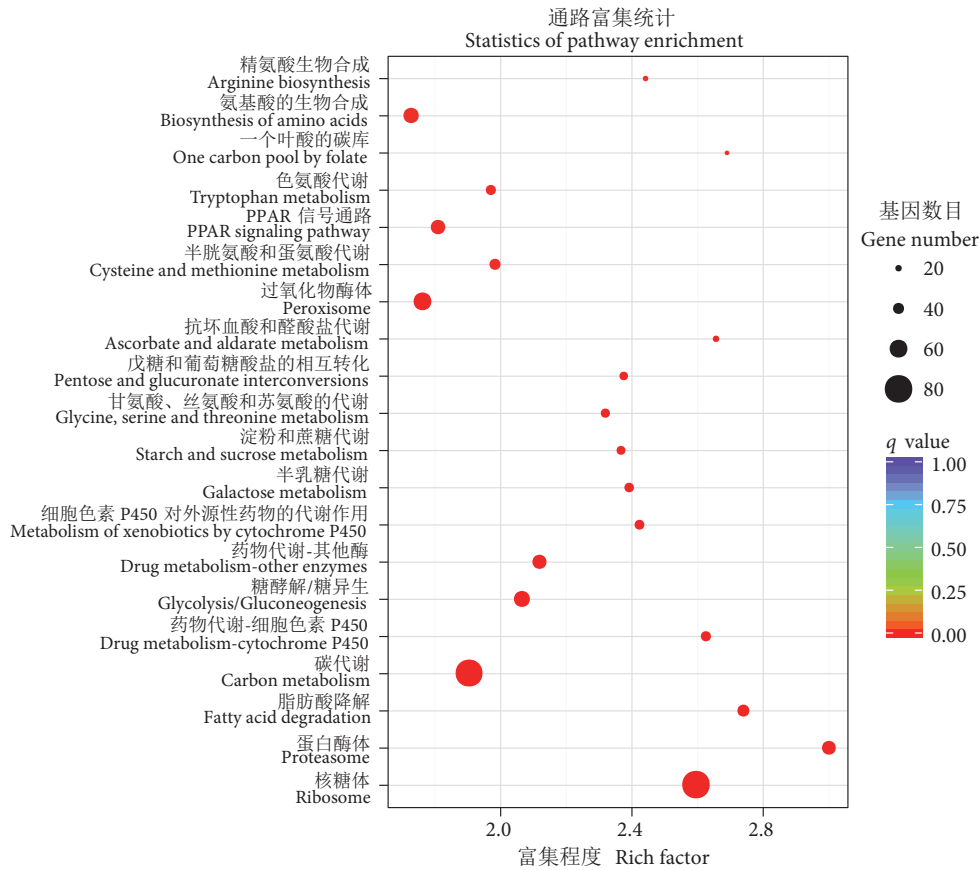
3 个比较组均富集到的通路有: NOD 样受体信号传导通路 (NOD-like receptor signaling pathway)、C 型凝集素受体信号通路 (C-type lectin receptor signaling pathway)、沙门氏菌感染 (*Salmonella* infection); CL vs SL 组和 SL vs RL 组均富集到 Toll 样受体信号传导通路 (Toll-like receptor signaling pathway) 和 RIG-I 样受体信号传导通路 (RIG-I-like receptor signaling pathway) (图 5-b、5-c); CL vs RL 组富集到的通路还有坏死性凋亡 (Necroptosis)、细胞溶质 DNA 传感途径 (Cytosolic DNA-sensing pathway) (图 5-a), 其中, C 型凝集素受体信号通路和细胞溶质 DNA 传感途径富集到的基因表达均呈上调趋势。

2.6 qRT-PCR 分析

随机挑选 5 个差异表达显著的基因, 对测序转录本进行定量分析以验证大口黑鲈转录组测序结果数据和分析的准确性。qRT-PCR 与 Illumina 测序得到的表达趋势基本一致 (图 6), 表明了 Illumina 测序获得的转录组数据以及生物信息学分析的可靠性。



(a) 对照组与抗病组 CL vs RL



(b) 对照组与易感组 CL vs SL

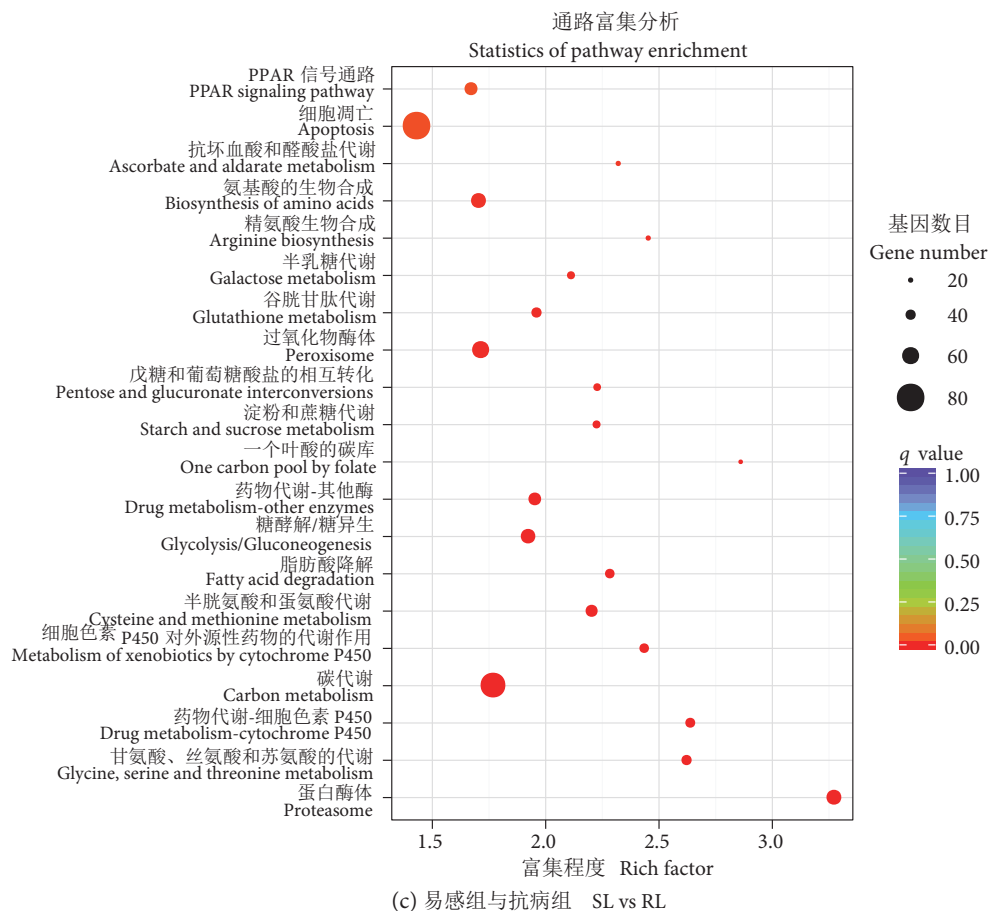
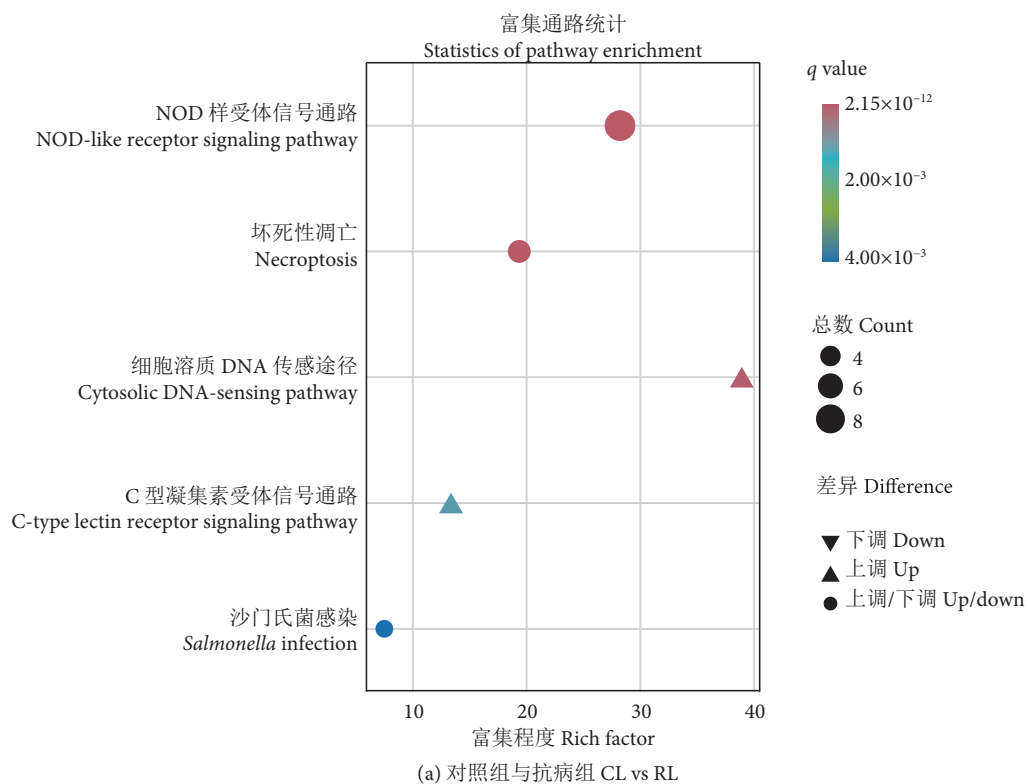
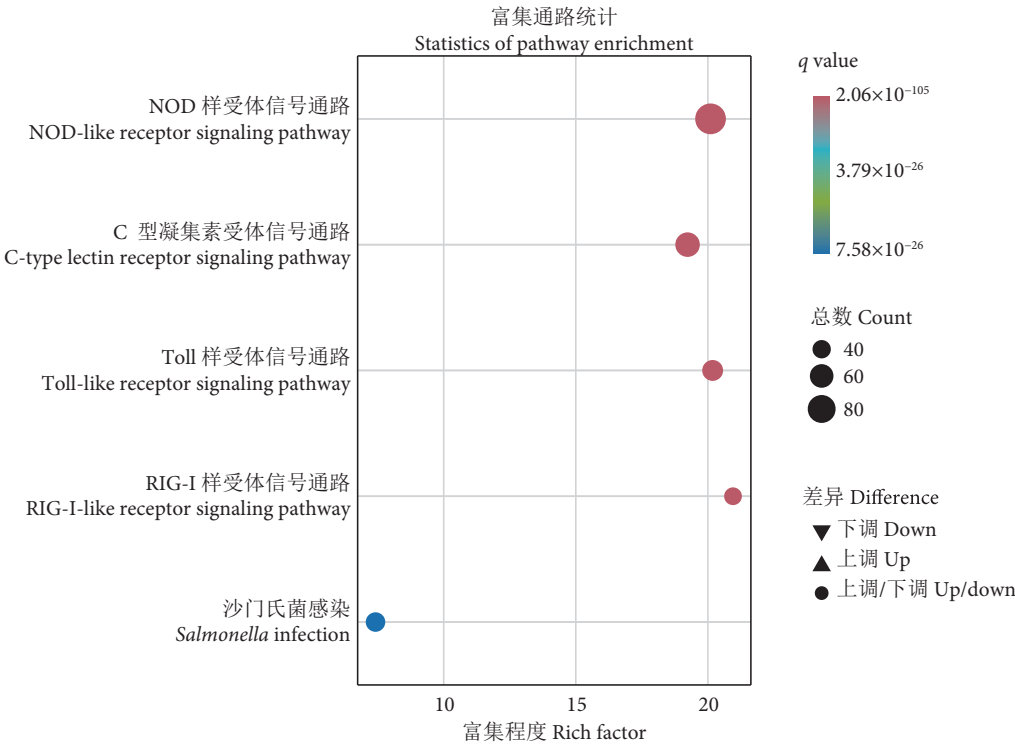


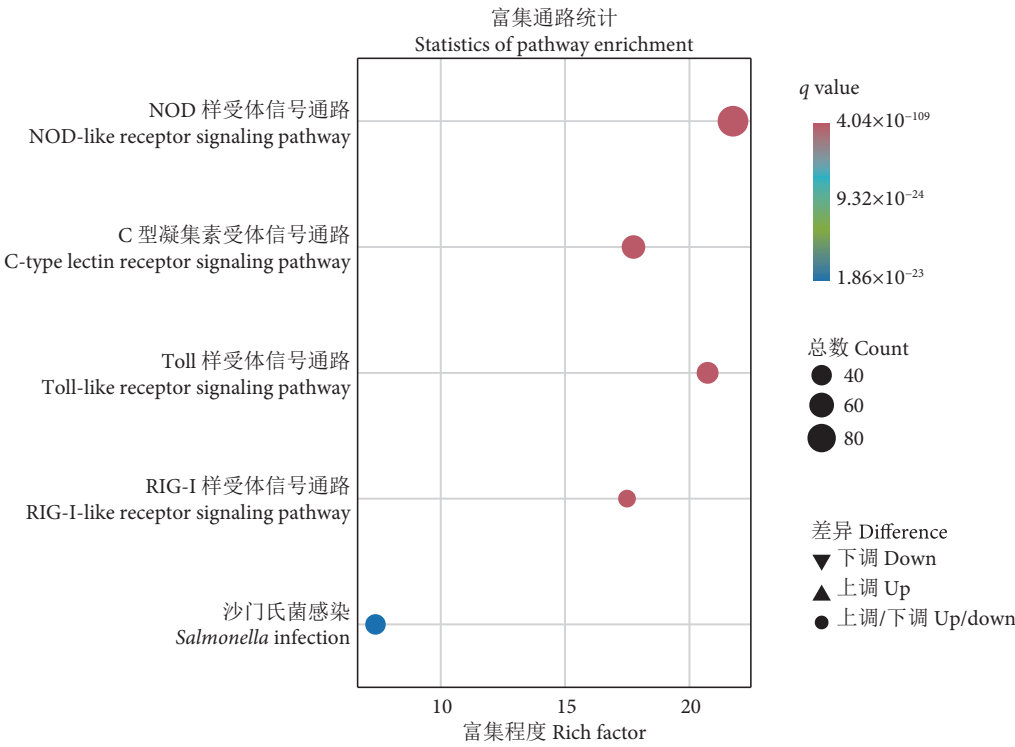
图4 各比较组 DEGs 的 KEGG 通路富集分析 (富集排名前 20)

Fig. 4 KEGG pathway function enrichment analysis of DEGs in each group (Top 20 of enrichment)





(b) 对照组与易感组 CL vs SL



(c) 易感组与抗病组 SL vs RL

图5 免疫相关 DEGs 的 KEGG 通路富集分析 ($p<0.01$, TOP 5)

Fig. 5 KEGG pathway function enrichment analysis of immune-related DEGs ($p<0.01$, TOP 5)

3 讨论

3.1 转录组测序 DEGs 结果分析

水产养殖业对全球粮食和营养安全起着关键作

用，中国对推动全球水产养殖行业的发展作出了巨大贡献^[21-22]。然而，病毒病等问题仍制约着整个行业的可持续发展。高通量转录组测序技术可实现从基因水平挖掘水产动物生物网络调控的分子机制，

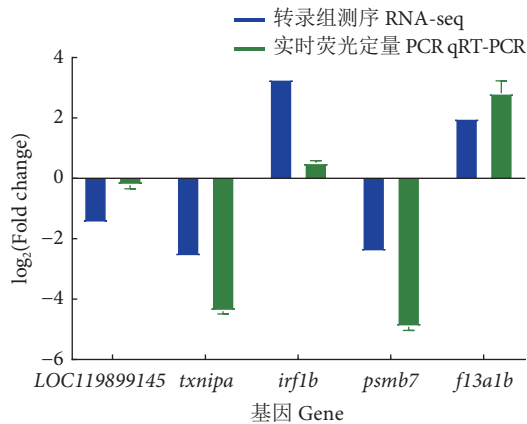


图6 荧光定量 PCR 验证部分差异表达基因

Fig. 6 qPCR validation of partial DEGs

从而进一步开展病害防治工作, 如药物研发以及抗病育种等。Gao 和 Chen^[23] 利用转录组测序技术探究体外感染 MSRV 的大口黑鲈皮肤细胞发现, 被感染的细胞在第 12 和第 24 小时分别有 2 432 和 2 480 个 DEGs。Fei 等^[24] 研究发现, 感染 MSRV 后, 大口黑鲈脾脏共鉴定出 1 574 个 DEGs, 其中上调基因 573 个, 下调基因 1 001 个。本研究通过构建大口黑鲈对照组、感染 MSRV 后的易感组和抗病组的肝脏转录组文库发现, 抗病组 DEGs 有 391 个, 上调、下调基因分别为 247、144 个; 易感组有 6 142 个 DEGs, 上调、下调基因分别为 2 917、3 225 个。与对照组相比, 易感组的 DEGs 数量明显多于抗病组。对翘嘴鲌 (*Siniperca chuatsi*) 感染传染性脾肾坏死病毒 (Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 的发病及抗病机制的研究发现, 发病组的 DEGs (4 667 个) 显著高于抗病组 (3 417 个)^[25], 与本研究结果一致。表明在感染初期, 病毒的入侵可能会刺激鱼体显著表达相关基因参与免疫反应。与易感组相比, 抗病组和对照组的 DEGs 数目相近, 说明攻毒后仍存活的大口黑鲈鱼体组织的基因变化水平会逐渐稳定并趋近对照组。对 DEGs 进行 GO 功能注释分析发现, DEGs 数目最多的分类均为生物学过程, 且显著富集在细胞和单个有机体过程。这可能与 MSRV 在大口黑鲈体内大量复制和宿主抵抗病毒感染的调控有关, 说明病毒侵入大口黑鲈肝脏组织会导致机体产生强烈的应激反应, 进而加快了细胞物质的代谢过程。

3.2 大口黑鲈响应 MSRV 胁迫的代谢通路分析

KEGG 通路富集分析发现, 与对照组相比, 抗病组与易感组大口黑鲈肝脏组织 DEGs 在药物代谢-细胞色素 P450、细胞色素 P450 对外源性药物

的代谢作用相关通路上显著富集。细胞色素 P450 是由含铁血红素蛋白组成的超家族单加氧酶, 作为多功能性的生物催化剂, 在哺乳动物肝脏中发挥的作用最为明显^[26-27], 主要参与多种内源性底物代谢和外源性物质解毒^[28-29]。对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[30] 抗维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 及凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[31] 镉 (Cd) 胁迫的转录组研究发现, DEGs 显著富集在与细胞色素 P450 相关的通路上, 基于细胞色素 P450 的解毒作用, 表明肝胰腺在甲壳动物抗病、解毒过程中发挥了重要作用。同时, 利用 RNA-seq 对斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[32] 的研究发现, 大量的细胞色素 P450 基因参与了对细菌的防御过程。本研究结果表明, 细胞色素 P450 在大口黑鲈肝脏中可能通过参与药物代谢-细胞色素 P450、细胞色素 P450 对外源性药物的代谢作用途径, 调控机体抗 MSRV 的免疫反应, 从而发挥肝脏组织的生物转化功能和解毒能力。

此外, 大口黑鲈肝脏组织受 MSRV 胁迫涉及的 DEGs 富集通路还包括抗坏血酸和醛酸盐代谢、脂肪酸降解、核糖体、碳代谢等代谢相关通路。抗坏血酸和醛酸盐代谢是保护细胞免受氧化损伤的重要碳水化合物代谢途径^[33], 其中抗坏血酸还可以通过缺氧诱导因子 1a 等间接影响细胞生长、抗感染以及对错误折叠蛋白的清除等^[34]; 脂肪酸作为细胞膜的主要成分, 参与对机体能量的供应和信号转导, 对细胞结构和功能的维持起重要作用, 在 T 细胞激活和分化中也扮演着重要角色^[35]。研究发现, 抗坏血酸和醛酸盐代谢的上调以及脂肪酸降解可能会增强调节性 T 细胞的免疫抑制^[36], 与本研究类似的结果在鲤 (*Cyprinus carpio*)^[37]、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*)^[38] 等的转录组分析中也有发现。另外, 核糖体作为蛋白质合成工厂, 可以通过合成的蛋白质来调控细胞的生长与分化、增殖与凋亡等过程^[39]。与此同时, 碳代谢可以提供合成蛋白质所需的能量 (ATP) 和底物 (氨基酸), 供能反应包括脂肪酸和碳水化合物的代谢。综上所述, 猜测大口黑鲈在 MSRV 胁迫下, 机体会通过协调代谢途径来增加如 T 细胞和 B 细胞等免疫细胞的合成和增殖, 以支撑机体发挥免疫作用来应对病毒的感染。

3.3 大口黑鲈响应 MSRV 胁迫的免疫通路分析

研究发现, 鱼类弹状病毒入侵信号主要由

Toll 样受体 (Toll-like receptors)、RIG-I 样受体 (RIG-I like receptors)、NOD 样受体 (NOD like receptors) 等模式识别受体识别, 从而介导如免疫细胞因子的产生^[40-42]。NOD 样受体是一类细胞内蛋白, 可以通过形成炎症体或参与转录信号级联反应, 从而介导促炎症细胞因子和杀菌因子的产生, 因此在先天免疫和细胞凋亡过程中发挥着重要作用^[43]。本研究发现, 在 MSRV 感染过程中有较多 DEGs 富集在 NOD 样受体信号通路中, 说明 NOD 样受体信号通路在 MSRV 感染的过程中被激活, 且在整个感染过程中发挥免疫作用。Toll 样受体主要作用于细胞外环境, 信号通路具有高度保守性, 可诱导细胞产生炎症因子, 在抵御病原微生物的感染过程中同样起着重要作用^[44]。对中华鳖 (*Trionyx sinensis*)^[45]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[46] 的感染实验发现, 均有免疫 DEGs 显著富集在 Toll 样受体信号通路中; 通过构建斑点叉尾鲷感染鲁氏耶尔森菌 (*Yersinia ruckeri*) 的急性感染模型, 分析宿主与病原体之间的相互作用, 发现免疫 DEGs 在 Toll 样受体信号通路和其他免疫相关通路中的表达量显著上调^[47]。与本研究结果类似, 表明大口黑鲈 Toll 样受体信号通路同样也在抗 MSRV 免疫反应中发挥着重要作用。RIG-I 样受体存在于细胞质内, 可以对细胞质中的病原微生物进行识别^[48], 在抗病毒信号转导中受 NOD 样受体的调控。研究发现, 病毒会通过破坏 RIG-I 样受体信号通路来逃避细胞的免疫应答^[49], 从而实现对宿主机体的侵染损害。测序结果显示, 与对照组、抗病组相比, 易感组免疫相关 DEGs 显著注释到了 RIG-I 样受体信号通路, 说明 MSRV 可能通过干扰 RIG-I 样受体介导的信号转导反应, 从而抑制鱼体初期对病毒入侵后的免疫应答反应。

C-型凝集素 (C-type lectins) 是一类钙离子依赖型的蛋白超家族, 在脊椎动物和无脊椎动物中都有重要的病原体识别作用, 参与脊椎动物免疫信号转导和抗原呈递过程^[50]。C-型凝集素会对致病微生物产生凝集作用, 在一定程度上减弱致病菌对鱼体的侵袭与感染, 也可引发下游的免疫效应, 如增强免疫细胞的吞噬能力、激活补体系统以及清除体内病原菌等^[51]。干扰素刺激因子 (Stimulator of interferon genes) 作为细胞溶质 DNA 的传感器, 可促进 I 型干扰素的产生, 胞内病原菌通过 Cgas-

STING 信号通路激活细胞溶质 DNA 传感途径, 从而发挥对感染、炎症等的先天免疫调节作用^[52-53]。在本研究中, 感染病毒后通路相关基因 *irf1b*、*irf3* 的表达均呈上调趋势, 并且表达量在易感组达到高峰。*irf1b* 可以参与调控细胞生长与凋亡, 而被激活的 *irf3* 通过表达水平的高低直接影响机体的抗病毒感染能力^[54], 由此推测, C 型凝集素受体信号通路和细胞溶质 DNA 传感途径在被弹状病毒感染后的大口黑鲈肝脏组织中发挥免疫作用, 调动了机体各种免疫防御因子参与消灭和清除感染病毒。

4 结论

本研究借助转录组技术, 对 MSRV 胁迫下的大口黑鲈肝脏组织进行测序研究, 发现对照组与抗病组的 DEGs 数目最少 (391 个), 对照组与易感组的 DEGs 数目最多 (6 142 个), 综合分析发现 3 个基因集共有的 DEGs 为 146 个。DEGs 主要富集在药物代谢-细胞色素 P450、抗坏血酸和醛酸盐代谢、脂肪酸降解等通路; 涉及的免疫通路主要有: NOD 样受体信号传导通路、C 型凝集素受体信号通路、Toll 样受体信号传导通路、RIG-I 样受体信号传导通路、细胞溶质 DNA 传感途径等。这些大口黑鲈免疫相关通路的获得, 促进了在转录组水平上对大口黑鲈的宿主免疫力和防御机制的理解, 为进一步探索大口黑鲈免疫调控机制和抗病毒药物、疫苗的研发提供了参考。

参考文献:

- [1] 李涵, 张桂芳. 加州鲈养殖产业现状与可持续发展建议[J]. 江西水产科技, 2024(1): 18-19, 33.
- [2] HUSSEIN G H G, CHEN M, QI P P, et al. Aquaculture industry development, annual price analysis and out-of-season spawning in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Aquaculture, 2020, 519: 734901.
- [3] 姚友锋, 邱军强, 王松刚. 加州鲈常见疾病的防治[J]. 科学养鱼, 2017(8): 92.
- [4] 雷燕. 加州鲈鱼弹状病毒病流行特点及综合防控技术[J]. 当代水产, 2015, 40(5): 76.
- [5] KHIEOKHAJONKHET A, AEKSIRI N, KANEKO G. Molecular characterization and homology modeling of liver X receptor in Asian seabass, *Lates calcarifer*: predicted functions in reproduction and lipid metabolism[J]. Fish Physiol Biochem, 2019, 45(2): 523-538.
- [6] KNOLLE P A, GERKEN G. Local control of the immune response in the liver[J]. Immunol Rev, 2000, 174: 21-34.

- [7] FREITAS-LOPES M A, MAFRA K, DAVID B A, et al. Differential location and distribution of hepatic immune cells[J]. Cells, 2017, 6(4): 48.
- [8] BUCHMANN K. Immune mechanisms in fish skin against monogeneans: a model[J]. Folia Parasit, 1999, 46(1): 1-9.
- [9] 刘问. 嗜水气单胞菌感染青鱼肝脏的蛋白质组学分析[J]. 水生生物学报, 2019, 43(2): 330-339.
- [10] 付静, 吕利群. 槲皮素拮抗草鱼呼肠孤病毒感染的药物学研究[J]. 中国水产科学, 2022, 29(11): 1659-1668.
- [11] 胡虎子, 曾伟伟, 王英英, 等. 罗非鱼湖病毒病研究进展[J]. 病毒学报, 2020, 36(1): 145-154.
- [12] 雷燕, 戚瑞荣, 崔龙波, 等. 大口黑鲈鱼种弹状病毒病的诊断[J]. 大连海洋大学学报, 2015, 30(3): 305-308.
- [13] 段晓晨, 程起群. 鱼类转录组学研究概况[J]. 渔业信息与战略, 2021, 36(3): 179-185.
- [14] 李岩. 植物乳杆菌 LP-S25 复合诱变筛选及其在大口黑鲈养殖中的应用效果研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022: 41-44.
- [15] 马世新. 纳米硒对大口黑鲈生长性能和肌肉品质的影响[D]. 钦州: 北部湾大学, 2022: 57-72.
- [16] ZOU J H, HU P, WANG M Y, et al. Liver injury and metabolic dysregulation in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) after ammonia exposure[J]. Metabolites, 2023, 13(2): 274.
- [17] MA D M, DENG G C, BAI J J, et al. A strain of *Siniperca chuatsi* rhabdovirus causes high mortality among cultured largemouth bass in South China[J]. J Aquat Anim Health, 2013, 25(3): 197-204.
- [18] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nat Methods, 2015, 12(4): 357-360.
- [19] PERTEA M, PERTEA G M, ANTONESCU C M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(3): 290-295.
- [20] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550.
- [21] WANG Q D, LI Z J, GUI J F, et al. Paradigm changes in freshwater aquaculture practices in China: moving towards achieving environmental integrity and sustainability[J]. Ambio, 2018, 47(4): 410-426.
- [22] NAYLOR R L, HARDY R W, BUSCHMANN A H, et al. A 20-year retrospective review of global aquaculture[J]. Nature, 2021, 591(7851): 551-563.
- [23] GAO E B, CHEN G F. *Micropterus salmoides* rhabdovirus (MSRV) infection induced apoptosis and activated interferon signaling pathway in largemouth bass skin cells[J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 76: 161-166.
- [24] FEI H, YI S F, ZHANG H M, et al. Transcriptome and 16S rRNA analysis revealed the response of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) to *Rhabdovirus* infection[J]. Front Immunol, 2022, 13: 973422.
- [25] 王莹莹. 基于转录组学合蛋白质组学的翘嘴鲻发病与抗病机制分析及 TRIM21 功能研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2021: 22.
- [26] NELSON D R. Cytochrome P450 diversity in the tree of life[J]. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom, 2018, 1866(1): 141-154.
- [27] GILLAM E M J. Extending the capabilities of nature's most versatile catalysts: directed evolution of mammalian xenobiotic-metabolizing P450s[J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 464(2): 176-186.
- [28] STEGEMAN J J. Cytochrome P450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities[J]. Xenobiotica, 1989, 19(10): 1093-1110.
- [29] UNO T, ISHIZUKA M, ITAKURA T. Cytochrome P450 (CYP) in fish[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2012, 34(1): 1-13.
- [30] 鞠蓉. 中华绒螯蟹抗维氏气单胞菌免疫防御机制和相关差异表达基因研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022: 34.
- [31] 李玲. 镉在凡纳滨对虾体内的富集、清除及其毒性作用研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2021: 29.
- [32] ZHANG J R, YAO J, WANG R J, et al. The cytochrome P450 genes of channel catfish: their involvement in disease defense responses as revealed by meta-analysis of RNA-Seq data sets[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(9): 2813-2828.
- [33] LIANG H, SONG K. Elucidating ascorbate and aldarate metabolism pathway characteristics via integration of untargeted metabolomics and transcriptomics of the kidney of high-fat diet-fed obese mice[J]. PLoS One, 2024, 19(4): e300705.
- [34] CHING B, CHEW S F, IP Y K. Ascorbate synthesis in fishes: a review[J]. IUBMB Life, 2015, 67(2): 69-76.
- [35] ZHOU X, ZHU X X, ZENG H. Fatty acid metabolism in adaptive immunity[J]. FEBS J, 2023, 290(3): 584-599.
- [36] PENG L, CHEN L, WAN J J, et al. Single-cell transcriptomic landscape of immunometabolism reveals intervention candidates of ascorbate and aldarate metabolism, fatty-acid degradation and PUFA metabolism of T-cell subsets in healthy controls, psoriasis and psoriatic arthritis[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1179877.
- [37] 李兴洋, 乔璐, 杨臻, 等. 鲤在阿维菌素胁迫下肝胰腺组织的转录组分析[J]. 水产学杂志, 2024, 37(2): 26-32.
- [38] 吴迪. 鲮鱼诺卡氏菌分离、培养及感染对小黄鱼免疫应答初步研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2023: 50-51.
- [39] LI L T, HU K, HONG B H, et al. The inhibitory effect of *Bacillus amyloliquefaciens* L1 on *Aeromonas hydrophila* and its mechanism[J]. Aquaculture, 2021, 539: 736590.
- [40] WU X M, HU Y W, XUE N N, et al. Role of zebrafish NLRC5 in antiviral response and transcriptional regulation of MHC related genes[J]. Dev Comp Immunol, 2017, 68: 58-68.
- [41] LI Y J, LI Y L, CAO X C, et al. Pattern recognition receptors in zebrafish provide functional and evolutionary insight into innate immune signaling pathways[J]. Cell Mol Immunol, 2017, 14(1): 80-89.
- [42] GABOR K A, CHARETTE J R, PIETRASZEWSKI M J, et al. A DN-mda5 transgenic zebrafish model demonstrates that Mda5 plays an important role in snakehead rhabdovirus resistance[J].

- Dev Comp Immunol, 2015, 51(2): 298-304.
- [43] CHUPHAL B, RAI U, ROY B. Teleost NOD-like receptors and their downstream signaling pathways: a brief review[J]. Fish Shellfish Immunol Rep, 2022, 3: 100056.
- [44] 庞纪彩. 尼罗罗非鱼 Toll 样受体信号通路基因表达研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 6-7.
- [45] 童正飞, 胡亚洲, 谭进, 等. 中华鳖脾脏转录组比较及免疫相关基因分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(12): 5449-5456.
- [46] WU X M, CAO L, HU Y W, et al. Transcriptomic characterization of adult zebrafish infected with *Streptococcus agalactiae*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 94: 355-372.
- [47] YANG Y B, ZHU X, ZHANG H X, et al. Dual RNA-Seq of trunk kidneys extracted from channel catfish infected with *Yersinia ruckeri* reveals novel insights into host-pathogen interactions[J]. Front Immunol, 2021, 12: 775708.
- [48] WILKINS C, GALE M Jr. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors[J]. Curr Opin Immunol, 2010, 22(1): 41-47.
- [49] 丁云磊, 孙英杰, 王晓旭, 等. RIG-I 样受体信号通路及其调控研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2014, 22(5): 72-79.
- [50] ZELENSKY A N, GREASY J E. The C-type lectin-like domain superfamily[J]. FEBS J, 2005, 272(24): 6179-6217.
- [51] 王莉, 张杰, 赵贤亮, 等. 鱼类 C-型凝集素结构特征及其免疫功能[J]. 水产科学, 2019, 38(2): 282-288.
- [52] MURTHY A M V, ROBINSON N, KUMAR S. Crosstalk between cGAS-STING signaling and cell death[J]. Cell Death Differ, 2020, 27(11): 2989-3003.
- [53] 张明洋, 曾茂芹, 刘妍罕, 等. 类志贺邻单胞菌感染杂交鲟肠道组织转录组分析[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(9): 2732-2740.
- [54] 吴莹. 卵形鲳鲹干扰素调节因子 IRF1、IRF3 和 IRF7 在抗菌免疫中的功能及机制研究[D]. 海口: 海南大学, 2021: 2-7, 113.