

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171220001

http://www.yykxjz.cn/

孟祥宇, 张艳丽, 霍忠明, 牟政强, 王化敏, 闫喜武. β -1,3-葡聚糖对副溶血弧菌感染菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的存活及两种免疫基因表达影响. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 106–113

Meng XY, Zhang YL, Huo ZM, Mu ZQ, Wang HM, Yan XW. Effects of β -1,3-glucan on the survival and expression of two immune genes in *Ruditapes philippinarum* infected with *Vibrio parahaemolyticus*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 106–113

β -1,3-葡聚糖对副溶血弧菌感染菲律宾 蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的存活 及两种免疫基因表达影响*

孟祥宇 张艳丽 霍忠明^① 牟政强 王化敏 闫喜武

(大连海洋大学 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心 农业农村部北方海水增殖重点实验室 大连 116023)

摘要 本文以菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)为材料,开展了不同浓度 β -1,3-葡聚糖对正常菲律宾蛤仔及副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染后蛤仔的存活率和凝集素基因(*Lectin*)、Toll 样受体 2 基因(*TLR2*)的表达研究。结果显示, β -葡聚糖浸泡蛤仔可以有效提高副溶血弧菌感染后蛤仔的存活率,在 1000 mg/L 浓度下,存活率最高,未感染组的鳃组织中, *TLR2* 在 6 h 时达到峰值,显著高于其他时间($P<0.05$)。在感染组中, *TLR2* 呈先升高后降低的趋势,在 1.5 h 时达到峰值。感染组和未感染组的 *Lectin* 表达均为先升高后下降趋势。在 3 h 时, 100 mg/L 未感染组的 *Lectin* 相对表达量显著高于 100 mg/L 感染组($P<0.05$)。在外套膜中,感染组和未感染组 *TLR2* 在 3~12 h 之间表达量逐渐降低。在 24 h 时, 1000 mg/L 未感染组表达量最高。感染组 *Lectin* 在外套膜中,浓度为 1000 mg/L 的实验组比 100 mg/L 实验组各时段都有更高的表达量,但只有 0 和 24 h 时差异显著($P<0.05$)。蛤仔鳃和外套膜 *Lectin* 的表达模式不同,但 β -葡聚糖的浸泡都促进了 *Lectin* 在感染初期的表达。从结果上看, β -葡聚糖的浸泡会增加这 2 种基因的相对表达,被 β -葡聚糖浸泡过的蛤仔被副溶血弧菌感染后,会更为快速地表达 *TLR2* 和 *Lectin*。本研究旨在通过不同浸泡浓度 β -葡聚糖对蛤仔存活及免疫基因表达的影响,初步了解 β -葡聚糖对蛤仔免疫力的作用,为蛤仔亲贝的保种、苗种繁育及池塘养殖的疾病防控提供一定的理论依据。

关键词 β -葡聚糖; 菲律宾蛤; 副溶血弧菌; 免疫基因

中图分类号 S944.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0106-08

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)是我国四大养殖贝类之一。目前,我国蛤仔年产量约 300 万 t, 约占世界蛤仔总产量的 90%(张国范等, 2010)。但近年来,由于水质环境恶化,养殖生产盲目扩大,主要

蛤仔养殖区病害频发,使产业遭受了巨大的损失,其中弧菌属(*Vibrio*)的病原菌是蛤仔疾病的主要致病因素(Moreira *et al*, 2012)。

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种嗜盐

* 国家贝类产业技术体系专项(CARS-49)和国家自然科学基金(31502163)共同资助[This work was supported by National Science Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-49), and National Natural Science Foundation of China (31502163)]. 孟祥宇, E-mail: 1048982628@qq.com

① 通讯作者: 霍忠明, E-mail: huozm@dlou.edu.cn

收稿日期: 2017-12-20, 收修改稿日期: 2018-02-27

的革兰氏阴性菌,是弧菌属的一个种类。副溶血弧菌是海水养殖动物主要病原菌之一, 虾蟹(王小玉等, 2006; Krantz *et al*, 1969)及贝类(Bartley *et al*, 1971)等水产动物都是其侵染对象。它通过与宿主细胞间相互作用产生致病毒素直至宿主死亡。沈亚林等(1993)报道了副溶血弧菌对健康文蛤(*Meretrix meretrix*)具有很强的致病性, 患病文蛤足伸出、对刺激反应迟纯、外壳边缘附有粘液、离水不久体液溢出。林强等(2012)研究表明, 牡蛎(*Crassostrea*)养殖中水温和副溶血弧菌总量呈正相关, 盐度和副溶血弧菌总量呈负相关。副溶血弧菌感染菲律宾蛤仔的研究只有零星报道。仅见于菲律宾蛤仔胃蛋白酶酶解产物能够抑制副溶血弧菌活性的报道(万慧一, 2012; 刘洪等, 2013)。

β -葡聚糖(β -1,3-glucans)是由 β (1 \rightarrow 3)糖苷键连接 α -D-葡萄糖形成的葡萄糖聚合物, 具有增强水产养殖动物自身的免疫力, 提高抗逆性, 减少死亡率, 改善生长状况和饲料利用的效率, 促进营养物质代谢等生物功能。现已被广泛认为是一种潜力巨大的免疫促进剂(Williams *et al*, 1991; Brown *et al*, 2003)和非特异性免疫的免疫激活剂(杜肖娜等, 2001)。目前, β -葡聚糖作为免疫促进剂在贝类中的应用, 仅见于王晶(2007)对菲律宾蛤仔的酚氧化酶的影响的研究, 在其他贝类中尚无报道。

与其他无脊椎动物一样, 蛤仔缺乏特异性免疫系统, 只能依赖其非特异性免疫来防御疾病。TLR2 (Toll-like receptor 2)具有识别病原体, 启动天然免疫等功能, 在抗感染过程中起到尤为重要的作用(唐深等, 2004)。TLR2 信号途径的激活, 可以产生促凋亡蛋白(FADD, Fas-associated death domain protein)和 Caspase-8, 导致表达 TLR2 的细胞发生凋亡, 从而可降低过度的免疫应答, 调控机体对入侵病原体的免疫应答在适度的水平(Means *et al*, 1999)。而动物凝集素也是无脊椎动物抵御病原体入侵过程中的极其重要的因子, 可以识别外源物质。此外, 动物凝集素能与体液中或细胞表面的糖配体结合, 对细胞产生信号, 调节细胞与细胞、细胞与基质间的反应(朱月, 2005)。Wang 等(2011)在对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)凝集素基因研究发现, 其存在于扇贝 TLR 信号通路的免疫系统中, 在抵御鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染过程中起着至关重要的作用。

本研究旨在通过不同浸泡浓度 β -葡聚糖对蛤仔存活及免疫基因表达的影响, 初步了解 β -葡聚糖对蛤仔免疫力的作用, 为蛤仔亲贝的保种、苗种繁育及池塘养殖的疾病防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

本研究菲律宾蛤仔采自大连黑石礁海区的野生群体。蛤仔壳长为 2.5~3.5 cm, 在实验室暂养 1 周, 养殖水温为 18 $^{\circ}$ C~21 $^{\circ}$ C, 24 h 连续充气培养。副溶血弧菌取自大连海洋大学水产病害研究室。

1.2 菌株的制备

菌株接种于 NA 营养培养基上(取 33 g NA 培养基用 1000 ml 蒸馏水加热溶解, 于 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌锅中灭菌 20 min, 倒板备用), 7 $^{\circ}$ C 时培养 24 h, 然后用灭菌海水洗下菌苔, 以 2000 r/min 离心 10 min, 弃掉上清液, 收集沉淀, 再用灭菌海水洗 3 次, 配成浓度为 3×10^9 cell/ml [10^8 ~ 10^9 CFU/ml (CFU/ml 指的是每毫升样品中含有的细菌菌落总数; CFU/g 指的是每克样品中含有的细菌菌落总数)]的菌悬液, 用于活菌免疫诱导。

1.3 蛤仔病原菌的人工感染

共设置 5 个实验组, 分别为副溶血弧菌感染的蛤仔实验组(C)、100 mg/L β -葡聚糖浸浴蛤仔实验组(A₁)、1000 mg/L β -葡聚糖浸浴蛤仔实验组(A₂)、100 mg/L β -葡聚糖浸浴后副溶血弧菌感染的蛤仔实验组(B₁)、1000 mg/L β -葡聚糖浸浴后副溶血弧菌感染的蛤仔实验组(B₂)。每组设 3 个平行, 每个实验组 38 个健康蛤仔。

用天平称取 200 g β -葡聚糖粉末(河北银峰食品科技有限公司, 白色粉末, 化学式[C₆H₁₀O₅]_n), 在容量瓶中加入 20 L 海水和称取好的粉末, 配制成 10 g/L 的母液(无色透明粘稠液体)备用。向容积为 30 L 水槽中加入 β -葡聚糖母液, 配置浓度为 100 mg/L(A₁, B₁)和 1000 mg/L(A₂, B₂)的 β -葡聚糖母液。分别向各个实验组放入 38 个健康蛤仔。 β -葡聚糖浸泡 1 d 后, 向 B₁、B₂、C 水槽中的蛤仔注射副溶血弧菌, 用注射器吸取浓度为 3×10^9 CFU/ml 的副溶血弧菌 10 μ l, 从蛤仔壳后缘倾斜插入到壳顶部位, 吸取到血液后连同血液和菌液一起注入胸腔内, 立即放回水槽中。向 A₁、A₂ 中, 以同样的方式注入 PBS。

1.4 实时荧光定量 PCR

在注射副溶血弧菌后的 0、1.5、3、6、12 和 24 h, 分别对 5 个实验组的蛤仔取样。每个时间点取 3 个个体的鳃组织和外套膜组织, 用液氮速冻, 储存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。将保存好的鳃和外套膜从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取

出,在液氮下研磨后,按照天根生化科技(北京)有限公司的动物组织总 RNA 提取试剂盒说明书进行总 RNA 提取,再按照 TaKaRa Primer Script™ RT Reagent Kit 说明合成 cDNA。从本实验室菲律宾蛤仔转录组中选取核心序列,用 Primer 5.0 设计引物,由大连万泽生物公司合成 *TLR2*, *Lectin* 引物。本研究采用 β -actin 作为内参基因,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequence

基因 Gene	引物 Primers (5'~3')
<i>TLR2</i>	F: ATAGAGTGGCACCTCAGACAGAA R: CTGGAATAGTGAGACCAAAAAGAGC
<i>Lectin</i>	F: TACTAGGTAACGTAATCGCT R: ATGATCCATTGCATTAGCGA
β -actin	F: CTCCCTTGAGAAGAGCTACGA R: GATACCAGCAGATTCCATACCC

将反转录所得的全部 cDNA 各取 2 μ l 混合,做为 cDNA 的混合模板,按照 5⁰、5¹、5²、5³、5⁴、5⁵ 倍数梯度稀释,制备目的基因和内参基因的扩增曲线。在每个扩增效率合格后(1.9~2.1),使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus)试剂盒(TaKaRa, 大连)在 LightCycler® 480 定量 PCR 仪(Roche, 上海)上对候选基因进行扩增,反应体系为 20 μ l,每个样品 3 组重复,反应体系见表 2。实验采用两步法 PCR 反应程序,反应条件为 95℃ 30 s; 95℃ 5 s; 60℃ 30 s,共 40 个循环。溶解曲线反应条件为 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 60℃~95℃; 50℃ 30 s。

表 2 实时荧光定量 PCR 反应体系
Tab.2 Quantitative real-time PCR detecting system

反应体系 Reaction system	体积 Volume (μ l)
SYBR premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(2 \times)	10
PCR forward primer(10 μ mol/L)	0.8
PCR reverse primer(10 μ mol/L)	0.8
DNA 模板	2
dH ₂ O(灭菌蒸馏水)	6.4
合计 Total	20

1.5 数据统计

24 h 后统计各实验组存活率。对于荧光定量结果的分析采用二阶导数 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 2 种蛤仔的免疫基因在 β -葡聚糖对副溶血弧菌感染的鳃和外套膜中相对表达量的变化。2 种蛤仔免疫相关基因的平均标准化表达量均用 C 组表达量校准。最终计算结果用平均

值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 具体计算方法如下:

$\Delta C_t = \text{目的基因 } C_t - \text{内参基因 } C_t$;

$\Delta\Delta C_t = \text{实验组 } \Delta C_t - \text{对照组 } \Delta C_t$;

最后,计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值,得出的值就是基因的相对表达量。

结果分析比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),用 SPSS20.0 处理数据,差异显著性设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 各实验组存活率比较

各实验组蛤仔存活率见图 1。从图 1 可以看出, A₁、A₂、B₁ 和 B₂ 组的存活率显著高于对照组($P < 0.05$),但彼此之间无显著差异($P > 0.05$)。

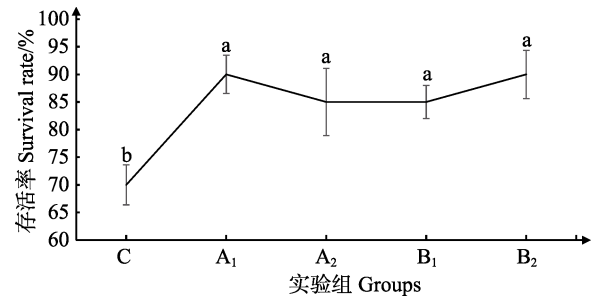


图 1 不同实验组的存活率

Fig.1 Survival rate of different experimental groups

C: 未经 β -葡聚糖浸泡,感染副溶血弧菌; A₁: 100 mg/L β -葡聚糖浸泡,未感染副溶血弧菌; A₂: 1000 mg/L β -葡聚糖浸泡,未感染副溶血弧菌; B₁: 100 mg/L β -葡聚糖浸泡,感染副溶血弧菌; B₂: 1000 mg/L β -葡聚糖浸泡,感染副溶血弧菌。下同。相同字母表示无显著差异($P > 0.05$),不同字母表示具有显著性差异($P < 0.05$)

C: Without β -glucan, infected with *V. parahaemolyticus*;
A₁: 100 mg/L β -glucan, without *V. parahaemolyticus* infection;
A₂: 1000 mg/L β -glucan, without *V. parahaemolyticus* infection;
B₁: 100 mg/L β -glucan, with *V. parahaemolyticus* infection;
B₂: 1000 mg/L β -glucan, with *V. parahaemolyticus* infection. The same as below. There is no significant difference between the same letters ($P > 0.05$), and the different letters mean significant difference ($P < 0.05$)

2.2 TLR2 表达

蛤仔鳃中 *TLR2* 表达情况见图 2。结果显示, A₁ 和 A₂ 组中, *TLR2* 在 6 h 时达到峰值,显著高于其他时间($P < 0.05$),其他时间段均无显著差异($P > 0.05$)。在 B₁ 和 B₂ 组中, *TLR2* 呈先升高后降低的趋势,在 1.5 h 时达到峰值。在 6 h 时, B₁、B₂ 组 *TLR2* 相对表达量显著低于 A₁、A₂ 组($P < 0.05$)。12 h 时, B₁ 组中,

TLR2 相对表达量显著高于其他组($P<0.05$)。24 h 时, B_1 组表达量仍显著高于 A_1 组($P<0.05$)。 B_1 组 0、1.5 和 12 h 时, *TLR2* 基因相对表达量无显著差异, 但都显著高于 3 和 6 h 时 *TLR2* 相对表达量($P<0.05$)。 B_2 组在 0、1.5 h 时, *TLR2* 相对表达量显著高于其他时间(24 h 除外)($P<0.05$)。

蛤仔外套膜中 *TLR2* 表达情况见图 3。结果显示,

同一时间下, 0 h 时 A_1 组 *TLR2* 相对表达量显著低于 A_2 组($P<0.05$)。所有实验组 *TLR2* 在 3~12 h 之间表达量逐渐降低, 而在 24 h 时, A_2 组表达量最高。但 3~24 h 时, 各实验组 *TLR2* 相对表达量无显著差异($P>0.05$)。相同实验条件下, A_2 、 B_1 、 B_2 组的 *TLR2* 相对表达量在 24 h 显著高于 12 h 时各组对应的 *TLR2* 相对表达量($P<0.05$)。

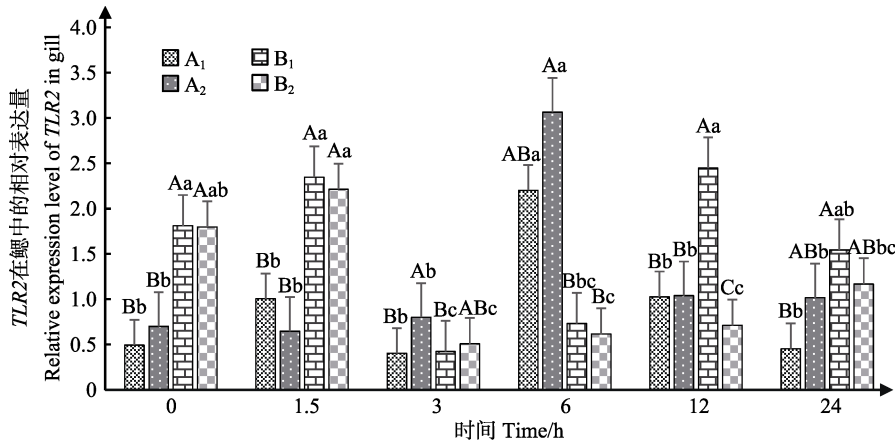


图 2 鳃组织中 *TLR2* 的表达

Fig.2 The expression level of *TLR2* in gill

同一时间, 大写字母表示组间差异显著($P<0.05$), 相同字母表示无显著差异($P>0.05$); 同一实验条件下, 不同小写字母表示各组在不同时间点差异显著($P<0.05$), 相同字母者表示差异不显著($P>0.05$)。下同

In the same experimental period, different capital letters indicate significant difference ($P<0.05$), the same letter indicate no significant difference ($P>0.05$); In the same experimental treatment, different small letters indicate significant difference($P<0.05$), the same letter indicate no significant difference ($P>0.05$). The same as below

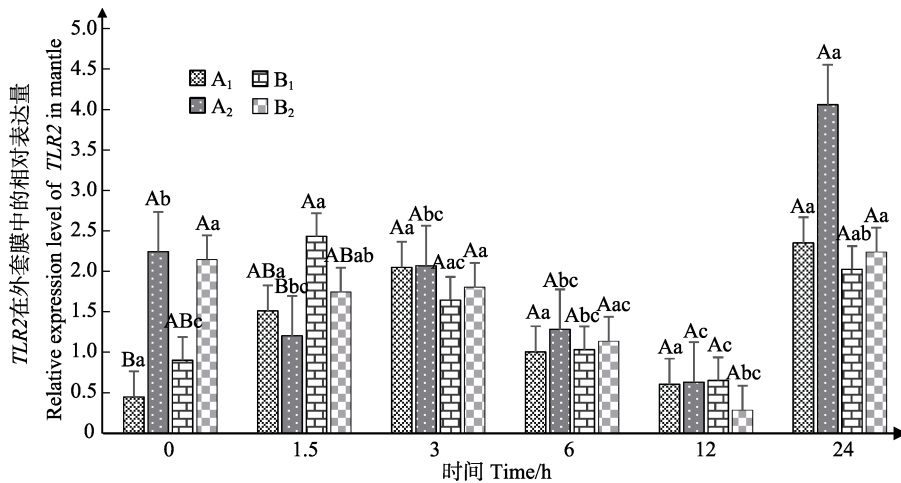


图 3 外套膜中 *TLR2* 的表达

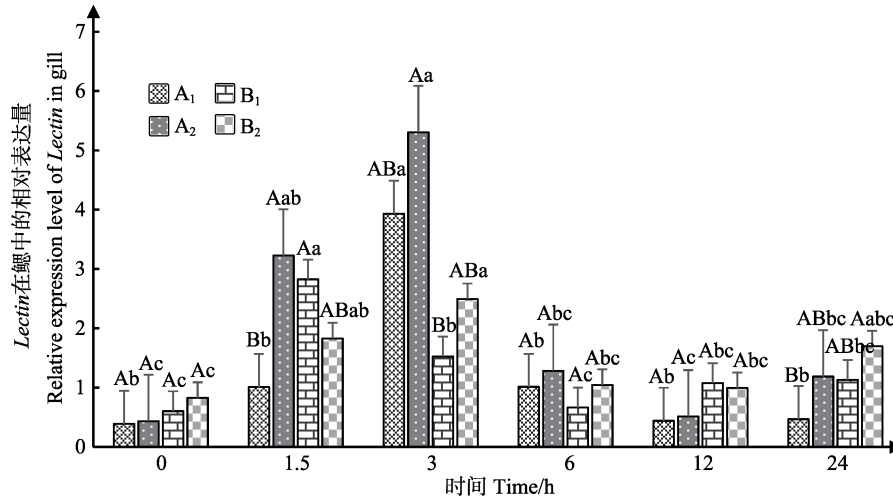
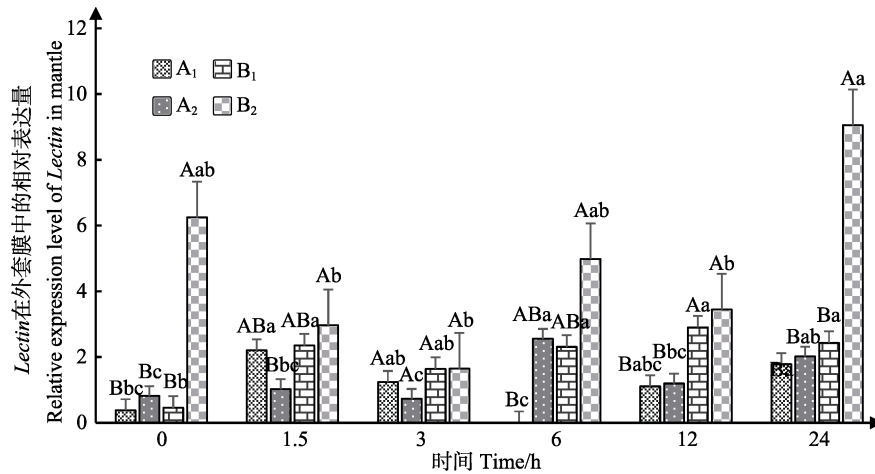
Fig.3 The expression of *TLR2* in mantle

2.3 Lectin 表达

蛤仔鳃中 *Lectin* 表达情况见图 4。结果表明, 各个实验组 *Lectin* 表达趋势均为先升高后下降。在 1.5~3 h 之间 *Lectin* 表达出现峰值。1.5 h 时, A_2 、 B_1 组的 *Lectin* 相对表达量显著高于 A_1 组($P<0.05$)。3 h 时,

A_1 组的 *Lectin* 相对表达量显著高于 B_1 组($P<0.05$)。6、12 h 时, 各实验组的 *Lectin* 相对表达量无显著差异($P>0.05$), 且在 6~24 h 之间, 各实验组 *Lectin* 表达模式趋于稳定, 无显著变化($P>0.05$)。

蛤仔外套膜中 *Lectin* 表达情况见图 5。结果表明, 相同时间下, 0 h 时, B_2 实验组 *Lectin* 相对表达量显

图4 鳃组织中 *Lectin* 的表达Fig.4 The expression of *Lectin* in gill图5 外套膜中 *Lectin* 的表达Fig.5 The expression of *Lectin* in mantle

著高于其他实验组。3 h 时, 各实验组 *Lectin* 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。12 h 时, A_1 、 A_2 和 B_1 、 B_2 组之间, *Lectin* 相对表达量无显著差异, 但 B_1 、 B_2 组 *Lectin* 相对表达量显著高于 A_1 、 A_2 组 ($P < 0.05$)。24 h 时, B_2 组 *Lectin* 相对表达量显著高于其他实验组 ($P < 0.05$)。 B_2 组 *Lectin* 表达量始终高于 B_1 组, 但只有 0 和 24 h 时差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

β -葡聚糖是一种广泛地存在于细菌、真菌、植物内部用于构筑多种细胞壁的材料。 β -葡聚糖有很好的应用前景, 已被广泛认为是一种非特异性免疫激活剂, 也可促进与补体相关的特异性抗体应答。本研究结果表明, β -葡聚糖可有效提高副溶血弧菌感染的蛤仔的存活率, 且浸泡 1000 mg/L β -葡聚糖的蛤仔的存活率高于浸泡 100 mg/L β -葡聚糖的蛤仔。目前, 关于

β -葡聚糖对鱼类免疫作用的研究已有较多报道(刘露等, 2017; Robertsen *et al*, 1990; Rørstad *et al*, 1993; Aakre *et al*, 1994)。但 β -葡聚糖在双壳类的研究相对较少, Anderson 等(2011)在弗吉尼亚牡蛎(*Crassostrea virginica*)中发现, β -葡聚糖能提高循环血细胞的数量用于防御反应, 促进血细胞的免疫活性, 并加强血液凝集。

菲律宾蛤仔为滤食性动物, 滤食水中的 β -葡聚糖会产生一系列免疫作用。本研究发现, 在鳃中, A_1 和 A_2 组的 *TLR2* 在 6 h 时达到峰值, 显著高于其他时间 ($P < 0.05$), 在其他时间段均无显著差异 ($P > 0.05$)。在 B_1 和 B_2 组中, *TLR2* 呈先升高后降低的趋势, 在 1.5 h 时达到峰值。可以看出, 感染组较未感染组提前出现基因表达峰, 说明副溶血弧菌感染蛤仔后, 蛤仔能迅速的表达 *TLR2* 来应对 LPS 的感染。但相同时间下, 不同 β -葡聚糖浸浴浓度感染组内(即 B_1 和 B_2 组)数据无明显规律更没有显著差异, 不同 β -葡聚糖

浸浴浓度的未感染组(即 A_1 和 A_2 组)在 3~6 h 时, A_2 组高于 A_1 组, 但差异不显著。而外套膜中, 感染组与未感染组之间基因表达量无显著差异。目前, 在露斯塔野鲮(*Labeo rohita*)(Samanta *et al*, 2012)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(Zhang *et al*, 2016)和石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(Li *et al*, 2011a)的相关研究中发现, *TLR2* 的表达在寄生虫和细菌感染下, 均出现显著的升高。另外, 在贝类相关的研究中, 栉孔扇贝存在一个相当典型的 MyD88 依赖的 TLR 信号通路, 并确定该通路在扇贝固有免疫系统, 特别是在抵御鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染过程中起至关重要的作用, 其具体机制可能包括调控抗氧化基因的表达、维持内环境稳定以及调控抗菌蛋白基因的表达(Wang *et al*, 2011)。Qiu 等(2007)发现, 栉孔扇贝血细胞中, *ctfoll-1* 在 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激下表达量在 6 h 时增加了 2 倍, 但在 100 ng/ml 浓度时, 出现表达下调。结果表明, *ctfoll-1* 的表达可能受 LPS 的诱导, 这种调节是剂量依赖性的。关于长牡蛎(*Crassostrea gigas*)中 *TLR* 的研究表明, *TLR* 定位于内涵体中发挥作用, 并且 *TLR* 通路中 *TLR* 被 Oyster Herpesvirus-1 (Oshv-1) 诱导上调并且在一些时间点与对照形成显著差异 ($P < 0.05$)(杜以帅, 2013)。

在本研究中, 各个实验组的鳃组织中, *Lectin* 表达趋势均为先升高后下降。在 1.5~3 h 之间, *Lectin* 表达出现峰值。说明 β -葡聚糖对 *Lectin* 表达有促进作用且副溶血弧菌的感染引起了机体内的免疫应答。外套膜 B 组内浸泡浓度 1000 mg/L 的实验组比 100 mg/L 组各时段都有更高的表达量, 但只有 0 和 24 h 时差异显著 ($P < 0.05$)。相对表达量的增值与 β -葡聚糖浓度的关系仍需要进一步探究。在甲壳纲中, 段亚飞等(2017)报道, 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)能引起脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)血细胞和肝胰腺中的 C 型凝集素基因(*CTL*)表达出现先增加后下降的趋势。*CTL* 可作为脊尾白虾感染粪肠球菌疾病的监测指标。对于双壳贝类 *Lectin*, 谈艳苗(2013)研究发现, 栉孔扇贝 *Cflec290* 在血细胞以及其他各组织中均有表达, 但在外套膜、肾脏以及性腺中的转录水平最高, 血细胞、鳃和肝胰腺次之, 在肌肉中的转录水平较弱。另外, 王昊(2006)研究发现, 在革兰氏阳性菌溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)和革兰氏阴性菌鳃弧菌刺激后, 栉孔扇贝血液中 *CFlec-1* 的表达均显著高于对照组, 并且呈明显的随时间变化趋势, 其结果说明, *CFlec-1* 不仅具有识别入侵微生物的功能, 而且可能作为效应因子起到直接杀灭入侵微生物的作用。

其他贝类的相关研究也得到了相同的表达趋势(吴彪等, 2013; 李猛等, 2015), 这表明, 凝集素基因参与对外源生物入侵的免疫应答, 有助于提高免疫防御能力。关于菲律宾蛤仔 *Lectin* 免疫应答方面的研究, Adhya 等(2010)发现, 各组织中 *Lectin* 在帕金虫(*Perkinsus olseni*)和弧菌(*Vibrio tapetis*)感染后表达量均显著上升。Li 等(2011b)发现, 鳃弧菌刺激后, 菲律宾蛤仔血细胞中唾液酸结合凝集素(SABL)表达呈先下降后上升的趋势。

本研究表明, β -葡聚糖浸浴蛤仔会增加 *TLR2* 和 *Lectin* 的相对表达量。被 β -葡聚糖浸浴过的蛤仔被副溶血弧菌感染后, 会快速表达 *TLR2* 和 *Lectin*, 识别异物物质。本研究为蛤仔亲贝的保种、苗种繁育及池塘养殖的疾病防控提供一定的理论依据。

参 考 文 献

- Aakre R, Wergeland HI, Aasjord PM, *et al*. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing β -1,3-M-Glucan as adjuvant. *Fish & Shellfish Immunology*, 1994, 4(1): 47-61
- Adhya M, Choi KS, Yu Y, *et al*. Expression and localization of MCsialec, a sialic acid-specific lectin in the marine bivalve Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(11): 889-899
- Anderson RS, Ozbay G, Kingsley DH, *et al*. Oyster hemocyte mobilization and increased adhesion activity after beta-glucan administration. *Journal of Shellfish Research*, 2011 30(3): 635-641
- Bartley CH, Slanetz LW. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine waters and oysters of New Hampshire. *Applied Microbiology*, 1971, 21(5): 965-966
- Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*, 2003, 19(3): 311-315
- Du XN, Wang RT, Liu DW, *et al*. Preliminary study on anti-tumor mechanism of polyporus polysaccharide. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2001, 21(3): 296-297 [杜肖娜, 王润田, 刘殿武, 等. 中药猪苓多糖抗肿瘤作用机理的初探. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2001, 21(3): 296-297]
- Du YS. Study on the Toll like receptor and RIG-I like receptor signal pathways and their immune functions in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2013 [杜以帅. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)TLR 和 RLR 信号通路的免疫功能研究. 中国科学院大学博士研究生学位论文, 2013]
- Duan YF, Li J, Li JT, *et al*. The expression profiles of immunity-related genes after pathogenic *Enterococcus faecalis* challenge in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 148-155 [段亚飞, 李健, 李吉涛, 等. 致病性粪肠球菌对脊尾白虾(*Exopalaemon*

- carinicauda*)免疫相关基因表达的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 148–155]
- Krantz GE, Colwell RR, Lovelace E. *Vibrio parahaemolyticus* from the blue crab *Callinectes sapidus* in Chesapeake Bay. Science, 1969, 164(3885): 1286
- Li C, Yu S, Zhao J, et al. Cloning and characterization of a sialic acid binding lectins (SABL) from Manila clam *Venerupis philippinarum*. Fish & Shellfish Immunology, 2011a, 30(4–5): 1202–1206
- Li M, Zhou SM, Liu L, et al. Molecular clone and expression of C-type lectin in *Meretrix Meretrix*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(5): 1186–1192 [李猛, 周素明, 刘璐, 等. 文蛤(*Meretrix meretrix*)C-型凝集素基因的分子克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1186–1192]
- Li YW, Luo XC, Dan XM, et al. Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) TLR2, MyD88 and IL-1 β involved in anti-*Cryptocaryon irritans*, response. Fish & Shellfish Immunology, 2011b, 30(6): 1230–1240
- Lin Q, Li NQ, Fu XZ, et al. The relationship of *Vibrio parahaemolyticus* densities and water quality factor during oyster culture. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(3): 415–421 [林强, 李宁求, 付小哲, 等. 牡蛎养殖过程中副溶血弧菌与水质因子间的关系. 水产学报, 2012, 36(3): 415–421]
- Liu L, Li D, Xiao Q. Effect of beta glucan on the related immune function of fish. Feed Research, 2017(1): 13–18 [刘露, 李代宗, 肖勤. β -葡聚糖对鱼类相关免疫功能的影响. 饲料研究, 2017(1): 13–18]
- Liu Q, Xie S, Zhao L, et al. Antimicrobial activity of hydrolysates from *Ruditapes philippinarum*. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(2): 109–113 [刘淇, 谢沙, 赵玲, 等. 菲律宾蛤仔酶解产物的抑菌活性. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 109–113]
- Means TK, Wang S, Lien E, et al. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Immunology, 1999, 163(7): 3920–3927
- Moreira R, Balseiro P, Planas JV, et al. Transcriptomics of *in vitro* immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. PLoS One, 2012, 7(4): e35009
- Qiu L, Song L, Xu W, et al. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(5): 451–466
- Robertsen B, Rørstad G, Engstad R, et al. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. Journal of Fish Diseases, 1990, 13(5): 391–400
- Rørstad G, Aasjord PM, Robertsen B. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish & Shellfish Immunology, 1993, 3(3): 179–190
- Samanta M, Swain B, Basu M, et al. Molecular characterization of toll-like receptor 2 (TLR2), analysis of its inductive expression and associated down-stream signaling molecules following ligands exposure and bacterial infection in the Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*). Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(3): 411–425
- Shen YL, Yu YS. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* to healthy clam *Meretrix meretrix* and the prevention and treatment of *Vibrio* infections. Journal of Fisheries of China, 1993, 17(3): 249–252 [沈亚林, 于业绍. 副溶血弧菌对文蛤的致病性及其防治. 水产学报, 1993, 17(3): 249–252]
- Tan YM. Agglutination activities of haemolymph and tissue extracts in scallop *Chlamys farreri* and development and characterization of monoclonal antibody of a C-type lectin. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [谈艳苗. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)组织凝集活性分析及一种 C-型凝集素单克隆抗体的研制和特性研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- Tang S, Leng J. The research progress of TLR family and its function. Progress in Microbiology and Immunology, 2004, 32(2): 42–45 [唐深, 冷静. TLR 家族及其功能研究进展. 微生物学免疫学进展, 2004, 32(2): 42–45]
- Wan HY. Study on the preparation of antibacterial hydrolysates of *Ruditapes philippinarum* and its antimicrobial mechanism. Master's Thesis of Qingdao University, 2012 [万慧一. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)抑菌酶解物的制备与作用机理研究. 青岛大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Wang H. Study on Lectin gene family of scallop *Chlamys farreri*. Master's Thesis of Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2006 [王昊. 栉孔扇贝凝集素家族基因的研究. 中国科学院研究生院硕士研究生学位论文, 2006]
- Wang M, Yang J, Zhou Z, et al. A primitive Toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Developmental & Comparative Immunology, 2011, 35(4): 511–520
- Wang XY, Yu DH, Huang GJ, et al. Preliminary study on the virulence of *Vibrio parahaemolyticus* to *Penaeus vannamei* and the antibacterial activity of flavonoids. Reservoir Fisheries, 2006, 26(3): 89–91 [王小玉, 喻达辉, 黄桂菊, 等. 副溶血弧菌对南美白对虾致病力及黄酮抗菌作用初步研究. 水利渔业, 2006, 26(3): 89–91]
- Wang J. Effects of several immunostimulants on the yield, activities of phenoloxidase and the number, ultrastructure of hemocytes in clam *Ruditapes philippinarum*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2007 [王晶. 几种免疫促进剂对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) 酚氧化酶的产量和活性以及血细胞的数量和超微结构的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Williams DL, Pretus HA, McNamee RB, et al. Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*. Immunopharmacology, 1991, 22(3): 139–156
- Wu B, Chi CF, Yang AG, et al. A preliminary study on the maternal transfer and bacteriostasis of a C-type lectin in scallop (*Patinopecten yessoensis*). Journal of Fisheries of China, 2013, 37(5): 777–783 [吴彪, 迟长风, 杨爱国, 等. 虾夷扇贝 C-型凝集素母源传递与抑菌作用的初步研究. 水产学报, 2013, 37(5): 777–783]
- Zhang GF, Yan XW. Clam aquaculture study. Beijing: Science

Press, 2010, 113–135 [张国范, 闫喜武. 蛤仔养殖学. 北京: 科学出版社, 2010, 113–135]
Zhang H, Hu G, Liu Q, *et al.* Cloning and expression study of a Toll-like receptor 2 (*tlr2*) gene from turbot, *Scophthalmus*

maximus. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 59: 137–148
Zhu Y. The function and application of agglutinin. Fisheries Science, 2005, 24(12): 48–49 [朱月. 凝集素的作用与应用. 2005, 24(12): 48–49]

(编辑 马瑾艳)

Effects of β -1,3-Glucan on the Survival and Expression of Two Immune Genes in *Ruditapes philippinarum* Infected with *Vibrio parahaemolyticus*

MENG Xiangyu, ZHANG Yanli, HUO Zhongming^①,
MU Zhengqiang, WANG Huamin, YAN Xiwu

(Dalian Ocean University; Engineering and Technology Research Center of Shellfish Breeding of Liaoning Province;
Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Dalian 116023)

Abstract In this study, the effect of beta-glucan on survival rates and the mRNA expression of *Lectin* and *TLR2* in both uninfected and infected Manila clams *Ruditapes philippinarum* were studied. The results showed that beta-glucan could effectively improve the survival rate of Manila clams infected by *Vibrio parahaemolyticus*. The survival rate was highest at a beta-glucan concentration of 1000 mg/L. In the gill tissues of the uninfected group (A₁ and A₂), the *TLR2* peaked at 6 h, which was significantly higher than that of other times ($P < 0.05$). In the infected group, *TLR2* increased to a peak at 1.5 h and then decreased. *Lectin* expression in both the infected and the uninfected group increased first and then decreased. The relative expression of *Lectin* in the A₁ group was significantly higher than that of the B₁ group at 3 h ($P < 0.05$). In the mantle, the expression of *TLR2* in both infected and uninfected groups decreased gradually between 3–12 h. At 24 h, the expression of group A₂ was highest. However, in the infected group, the expression of *Lectin* in 1000 mg/L beta-glucan was higher than at 100 mg/L in the mantle, but there was only a significant difference at 0 h and 24 h ($P < 0.05$). The expression patterns of *Lectin* in the gill and in the mantle were different, but the feeding of beta-glucan promoted the expression of *Lectin* during the early stages of infection. From these results, beta-glucan soaking can increase the relative expression of the two genes, and *TLR2* and *Lectin* are expressed more quickly after infection by *V. parahaemolyticus* when soaked with beta-glucan. The aim of this study is to understand the dose dependent effect conferred by beta-glucan on the immune system and the survival rate of Manila clams, which might provide some theoretical basis for the stock culture, seed breeding and disease control in pond culture of Manila clams.

Key words Beta-glucan; *Ruditapes philippinarum*; *Vibrio parahaemolyticus*; Immune gene

^① Corresponding author: HUO Zhongming, E-mail: huozm@dloou.edu.cn