

DOI: 10.3969/j.issn.2095-9869.20241125002

http://www.yykxjz.cn/

王思婕, 许星鸿, 迟嘉乐, 孙秀俊, 李百玉, 席晨宵, 杨笑. 单环刺螠体腔液对不同病原菌暴露的免疫应答分析. 渔业科学进展, 2025, 46(6): 190–202

WANG S J, XU X H, CHI J L, SUN X J, LI B Y, XI C X, YANG X. Analysis of the immune responses to pathogenic bacterial exposure in *Urechis unicinctus* coelomic fluid. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(6): 190–202

单环刺螠体腔液对不同病原菌暴露的 免疫应答分析*

王思婕¹ 许星鸿^{1①} 迟嘉乐¹ 孙秀俊² 李百玉¹ 席晨宵¹ 杨 笑¹

(1. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院 连云港 222005;

2. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071)

摘要 为探讨单环刺螠(*Urechis unicinctus*)体腔液应对不同病原菌暴露的免疫应答反应,本研究检测了凡隆氏气单胞菌(*Aeromonas veronica*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)刺激下,单环刺螠体腔液细胞数量、吞噬率、溶血反应,以及体腔液上清液和体腔细胞破碎液上清液的总抗氧化能力、过氧化氢酶活性、NO 含量和溶菌酶活性变化,并分析了 4 种病原菌[鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、凡隆氏气单胞菌和藤黄微球菌]攻毒后单环刺螠体腔细胞免疫相关基因表达的变化规律。结果显示,不同病原菌暴露后,单环刺螠体腔细胞数量和吞噬率总体呈现先下降后上升又下降的趋势;溶血反应强度从大到小依次为凡隆氏气单胞菌+脂多糖组、凡隆氏气单胞菌组、藤黄微球菌组;随着细菌处理时间的延长,体腔液上清液和体腔细胞破碎液上清液的总抗氧化能力、过氧化氢酶活性和 NO 含量先下降后上升再下降,溶菌酶活性先升高后下降又上升;单环刺螠体腔细胞 *cbl-b*、*actr3*、*gck* 和 *lhpp* 等基因表达量先上升后下降, *cyp450* 基因表达量总体呈先降后升再降的趋势;在病原菌刺激下,单环刺螠体腔液上清液的抗氧化和免疫能力均强于体腔细胞破碎液上清液;脂多糖能够诱导单环刺螠体腔细胞免疫及提高其抗氧化能力。本研究可为深入探讨单环刺螠应对细菌感染的先天免疫机制提供参考。

关键词 单环刺螠;病原菌;免疫;抗氧化;基因表达

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)06-0190-13

养殖水体具有丰富的微生物群落,与水体植物、养殖动物存在互作关系。在特定条件下,某些微生物在水体环境内外因素影响下成为致病菌,引发细菌性疾病进而影响养殖动物生存和生长发育(Islam *et al.*, 2024)。在高生产效率的集约化养殖模式下,水产养殖动物经常面临由细菌引起的疾病所带来的影响,降

低了产量和经济效益。

养殖水环境中常见的致病菌有鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、凡隆氏气单胞菌(*Aeromonas veronica*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)等,对水生动物和人类健康均有威胁。鳃弧菌为革兰氏阴性兼性厌氧菌,广泛存在

* 江苏省科技厅苏北科技专项(SZ-LYG202124; LYG-SZ201814)、连云港市花果山英才计划(KK20100)和江苏海洋大学研究生和大学生创新项目(KYCX2023-137)共同资助。王思婕, Email: 2511575447@qq.com

① 通信作者: 许星鸿, 教授, Email: xhxul19@163.com

收稿日期: 2024-11-25, 收修改稿日期: 2025-02-25

于海水环境中(王小鹿等, 2021)。当水产动物养殖密度大或水环境变差时, 鳃弧菌易成为致病菌, 导致养殖动物出现体表溃烂、器官充血和肝脏肿大等症状(Li *et al*, 2024)。凡隆氏气单胞菌是造成许多经济和观赏性鱼类发生流行性死亡的主要病原菌之一, 感染鱼类多表现出流行性溃疡综合征(Chen *et al*, 2024); 凡隆氏气单胞菌亦是一种人畜共患菌, 已有报道其可引起人类胃肠道慢性炎症性疾病(Lee *et al*, 2023)。金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性细菌, 亦是造成人类感染的病原体之一, 在许多研究中被用作研究水生动物免疫反应的代表性细菌病原体(Li *et al*, 2023; Zhan *et al*, 2023)。藤黄微球菌广泛存在于大气、土壤、水环境以及动物体表, 在一定环境条件下可造成鱼类内脏出血, 伤口和组织感染以及人体组织炎症和败血症(张楠驰等, 2020)。

单环刺螭(*Urechis unicinctus*)为分布于中国沿海的唯一无管螭目(Xenopneusta)物种, 具有丰富的营养和药用价值(Li *et al*, 2022; Chen *et al*, 2023)。单环刺螭为较低等的滤食性海洋无脊椎动物, 栖息于泥沙底质中, 易受外界病原体的侵袭。其主要依靠物理屏障以及体腔液中的细胞和体液免疫因子构成的非特异性免疫进行机体防御(Kuo *et al*, 2018)。单环刺螭体腔液相当于脊椎动物的血液, 内脏器官浸浴于其中, 是发挥免疫作用的重要途径。目前关于单环刺螭体腔液的研究主要有纤溶酶的分离纯化(韩宝芹等, 2014), 以及硫化物(Zhang *et al*, 2024)、六价铬(Liu *et al*, 2024b)和双酚 A (Liu *et al*, 2024a)等环境因子胁迫的影响, 而有关细菌对单环刺螭的影响研究较少。目前, 已有学者从单环刺螭肠道中分离出一株与新喀里多尼亚弧菌(*Vibrio neocaledonicus*)高度相似的致病菌, 命名为菌株 SX-1, 该菌可使单环刺螭活动能力减弱、体表变红(于士翔等, 2019)。基于前期研究发现的单环刺螭体腔液对鳃弧菌等有一定抑菌作用(甘宏涛等, 2022), 以及单环刺螭转录组测序结果(王思婕等, 2024), 本研究筛选免疫相关基因, 通过对单环刺螭进行细菌攻毒, 测定不同处理时间体腔细胞数量和吞噬率、体腔液抗氧化和免疫指标变化以及利用分子生物学技术分析免疫相关基因表达情况, 以期从不同层次探讨单环刺螭体腔液应对病原菌暴露的免疫应答反应, 为单环刺螭应对细菌感染的免疫防御机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康单环刺螭购于连云港市海州区海宁路农产

品市场, 体长为 (12.1 ± 0.7) cm, 体质量为 (18.0 ± 0.3) g。在实验室 40 L 养殖箱中暂养 1 周, 暂养条件: pH 为 8.0 ± 0.1 , 温度为 (16 ± 1) °C, 盐度为 25 ± 1 , 连续充氧; 日投喂 1 次小球藻(*Chlorella pacifica*); 每日换水 1 次, 换水量为 1/2。

实验所用菌株包括 2 种革兰氏阳性菌: 藤黄微球菌和金黄色葡萄球菌, 2 种革兰氏阴性菌: 凡隆氏气单胞菌和鳃弧菌, 均来源于江苏海洋大学海洋逆境生物学实验室。菌株经过活化后, 180 r/min、28 °C 下恒温震荡培养至对数期, 5 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀用 0.1 mol/L 无菌磷酸盐缓冲液(pH=7.4)调整浓度为 10^6 CFU/mL, 用于后续实验。

1.2 样品采集

选取体表完整、活力好的单环刺螭, 用无菌注射器抽取体腔液, 与抗凝剂等比例混匀, 4 °C 冷藏, 24 h 内使用。设置对照组和 3 个实验组: 藤黄微球菌组、凡隆氏气单胞菌组和凡隆氏气单胞菌+脂多糖组(终浓度为 100 µg/mL)。分别于 0.5、1、3、6、12、24 h 取样, 先取出 100 µL 样品测细胞数量和吞噬率; 其余样品于 4 °C 下 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液和沉淀。细胞沉淀加入 4 mL 无菌生理盐水悬浮, 在细胞破碎仪(Biosafe650-92, 赛飞)功率 60 W 下破碎 5 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。2 种上清液分别于 -80 °C 冻存备用。

1.3 体腔细胞数量和溶血反应

体腔细胞数量用细胞计数板进行计数。每毫升样品细胞数量=4 个中方格的细胞平均数×稀释倍数× 10^4 。溶血反应测定采用体外实验方法(秦真东, 2018): 新鲜采集的体腔液在 4 °C 下 3 000 r/min 离心 15 min, 收集的细胞沉淀用无菌生理盐水洗涤 3 次后, 用 L-15 细胞培养液重悬细胞, 调节浓度至 1×10^6 cells/mL, 获得细胞悬液; 细胞悬液分别与藤黄微球菌、凡隆氏气单胞菌和(凡隆氏气单胞菌+脂多糖)混匀; 于处理 0、5、10、20、30、40、50、60 min 时取样, 1 500 r/min 离心 5 min, 在 404 nm 下测定上清液的吸光度值, 重复 3 次。

1.4 抗氧化和免疫指标

测定的抗氧化指标为总抗氧化能力、过氧化氢酶活性和 NO 含量; 免疫指标包括细胞吞噬率和溶菌酶活性。总抗氧化能力、过氧化氢酶活性和溶菌酶活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, NO 含量检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。细胞吞噬率=(有吞噬作用的细胞数量/随机选取的 100 个体腔

细胞数量) $\times 100\%$ 。

1.5 基因表达水平

根据前期单环刺螠转录组测序结果(王思婕等, 2024)筛选免疫相关基因, 包括 *cbl-b*、*gck*、*ACTR3*、*lhpp* 和 *cyp450*。设置对照组和 4 个实验组(鳃弧菌组、金黄色葡萄球菌组、凡隆氏气单胞菌组和藤黄微球菌组), 以无菌生理盐水作为对照, 分别对单环刺螠进行细菌攻毒试验, 每组设 3 个平行。在距离单环刺螠吻部 3 cm 处, 用 1 mL 灭菌注射器注射 200 μ L 菌液, 对照组注射等量无菌生理盐水。分别于处理 3、6、12、24、48 和 96 h 后, 用无菌注射器收集体腔液。在 4 $^{\circ}$ C 下 3 000 r/min 离心 15 min 获得体腔细胞沉淀, 投入液氮中快速冷冻后, 保存于-80 $^{\circ}$ C 备用。

1.5.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 使用 RNAiso plus 提取单环刺螠体腔细胞总 RNA, 通过 NanoDrop 分光光度计(Thermo, 美国)和琼脂糖凝胶电泳测定总 RNA 的浓度及完整性。按照 PrimeScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa)说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA。逆转录体系 10 μ L, 反应条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s, 合成的 cDNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

1.5.2 实时荧光定量 PCR Primer 6 软件设计的 qRT-PCR 所需引物见表 1, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。根据 TB Green[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus)试剂盒(TaKaRa)建立 qRT-PCR 体系, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s (40 个循环); 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。以 β -actin 和 18s rRNA 基因作为内参基因, 通过全自动医用 PCR 分析系统(北京乐普诊断)进行扩增曲线

和熔融曲线分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达量。

1.6 数据统计与分析

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示, 通过 SPSS 26.0 对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), Duncan 法进行多重比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。绘图使用 GraphPad Prism 9.0 软件。

2 结果

2.1 细菌对单环刺螠体腔细胞数量和溶血反应的影响

细菌对单环刺螠体腔细胞数量的影响见图 1。不同细菌处理下, 凡隆氏气单胞菌+脂多糖组单环刺螠体腔细胞数量于处理 0.5 h 有明显增加; 其他实验组体腔细胞数量随着处理时间延长呈先减少后增加、随之又减少的趋势。各实验组体腔细胞数量于处理 6 h 达到峰值, 处理 12 h 后细胞数量减少, 显著低于对照组水平($P<0.05$)。至处理 24 h, 各组体腔细胞数量差异显著, 数量从多到少依次为对照组、藤黄微球菌组、凡隆氏气单胞菌组、凡隆氏气单胞菌+脂多糖组。

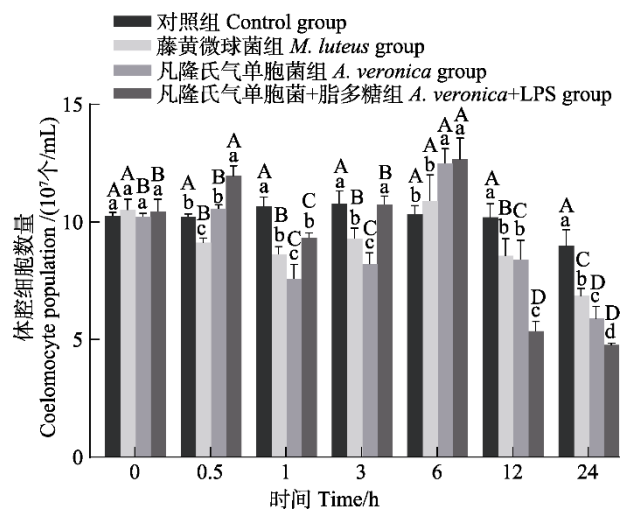


图 1 细菌对单环刺螠体腔细胞数量的影响
Fig.1 Influence of the bacteria on the number of coelomocytes in *U. unicinctus*

标有不同小写字母表示同一时间点组间有显著性差异 ($P<0.05$), 标有不同大写字母表示同一处理组不同时间点有显著性差异 ($P<0.05$), 下同。

Different lowercase letters indicate significant differences between groups at the same time point ($P<0.05$), and different uppercase letters indicate significant differences at different time points for the same treatment group ($P<0.05$). The same below.

由图 2 可见, 在细菌处理 10 min 时, 凡隆氏气单胞菌+脂多糖组和 2×10^6 CFU/mL 凡隆氏气单胞菌组开始出现溶血反应; 处理 20~30 min, 各实验组均出现明显的溶血反应, 反应强度从大到小依次为凡隆氏气单胞菌+脂多糖组、 2×10^6 CFU/mL 凡隆氏气单胞菌组、 1×10^6 CFU/mL 凡隆氏气单胞菌组、藤黄微球菌组。随后藤黄微球菌组趋于稳定, 凡隆氏气单胞菌组溶血反应仍在持续。在处理 50 min 后, 凡隆氏气单胞菌+脂多糖组溶血反应减弱。

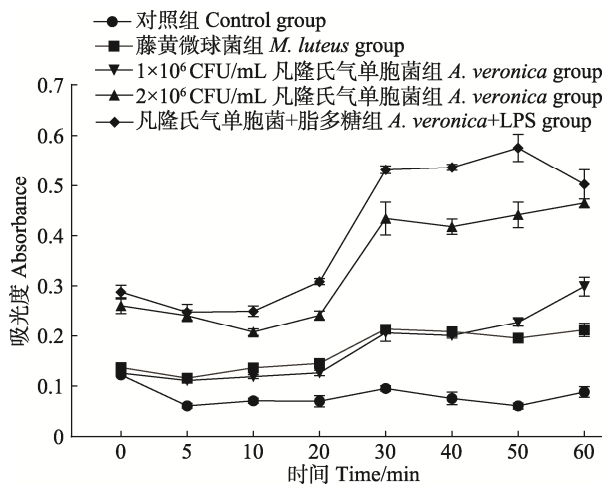


图 2 细菌对单环刺螈体腔细胞溶血反应的影响

Fig.2 Influence of bacteria on the hemolytic reaction of coelomocytes in *U. uncinatus*

2.2 细菌对单环刺螈体腔液抗氧化能力的影响

细菌对单环刺螈体腔液上清抗氧化能力的影响见图 3。随着细菌处理时间的增加, 除凡隆氏气单胞菌+脂多糖组外, 其他实验组总抗氧化能力总体呈先下降后上升再下降的趋势(图 3A)。处理 3 h 时, 凡隆氏气单胞菌+脂多糖组总抗氧化能力显著高于其他各组($P < 0.05$); 各实验组总抗氧化能力于处理 6 h 时达到峰值, 但藤黄微球菌组总抗氧化能力显著低于对照组($P < 0.05$); 至处理 24 h, 凡隆氏气单胞菌组和凡隆氏气单胞菌+脂多糖组总抗氧化能力仍显著高于对照组($P < 0.05$), 但两组间差异不显著($P > 0.05$)。

由图 3B 可见, 在细菌刺激下, 凡隆氏气单胞菌+脂多糖组单环刺螈体腔液上清液过氧化氢酶活性先上升后下降, 其他实验组过氧化氢酶活性呈先下降后上升再下降的趋势。处理 0.5 h 时, 凡隆氏气单胞菌+脂多糖组过氧化氢酶活性显著高于其他各组($P < 0.05$), 至处理 1 h 时, 该组过氧化氢酶活性达到峰值, 随后逐渐下降; 处理 6 h 时, 凡隆氏气单胞菌组过氧化氢酶活性达到最大; 至处理 24 h 时, 凡隆氏气单胞菌+脂多糖组过氧化氢酶活性仍显著高于对照组($P < 0.05$)。

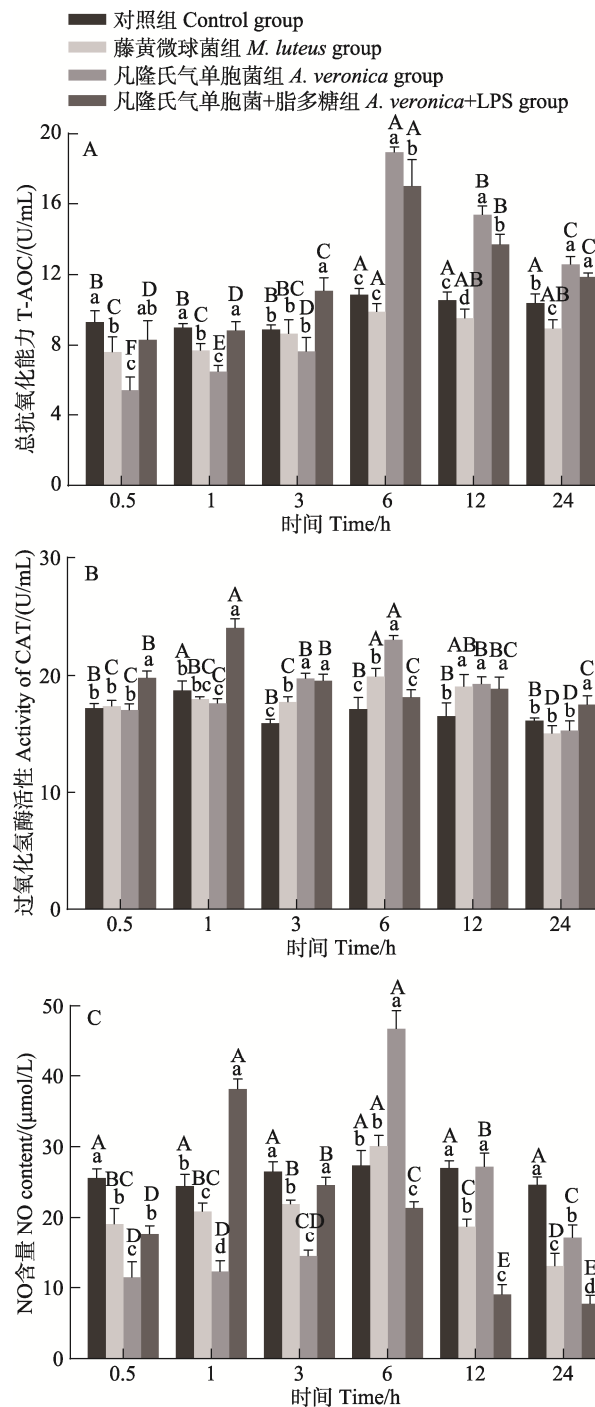


图 3 细菌对单环刺螈体腔液上清液抗氧化能力的影响

Fig.3 Influence of bacteria on the antioxidant capacity of the supernatant of coelomic fluid in *U. uncinatus*

随着细菌处理时间的延长, 体腔液上清液中 NO 含量总体呈先下降后上升又下降的趋势(图 3C)。凡隆氏气单胞菌+脂多糖组、凡隆氏气单胞菌组和藤黄微球菌组的 NO 含量分别于处理 1、6 和 6 h 达到最大, 随后下降; 至处理 24 h 时, 各实验组 NO 含量均显著低于对照组($P < 0.05$)。

细菌对单环刺螈体腔细胞破碎液上清液抗氧化

能力的影响见图 4。由图 4A 可见, 处理 3 h 内, 各试验组体腔细胞破碎液上清液总抗氧化能力变化较为平缓, 除凡隆氏气单胞菌+脂多糖组外, 其他实验组略有下降随后呈现先上升后下降的趋势; 于 12 h 显著上升达到峰值, 随后下降; 至处理 24 h 时, 各实验组总抗氧化能力仍均明显高于对照组($P<0.05$), 以藤黄微球菌组体腔细胞破碎液上清液的总抗氧化能力最高。

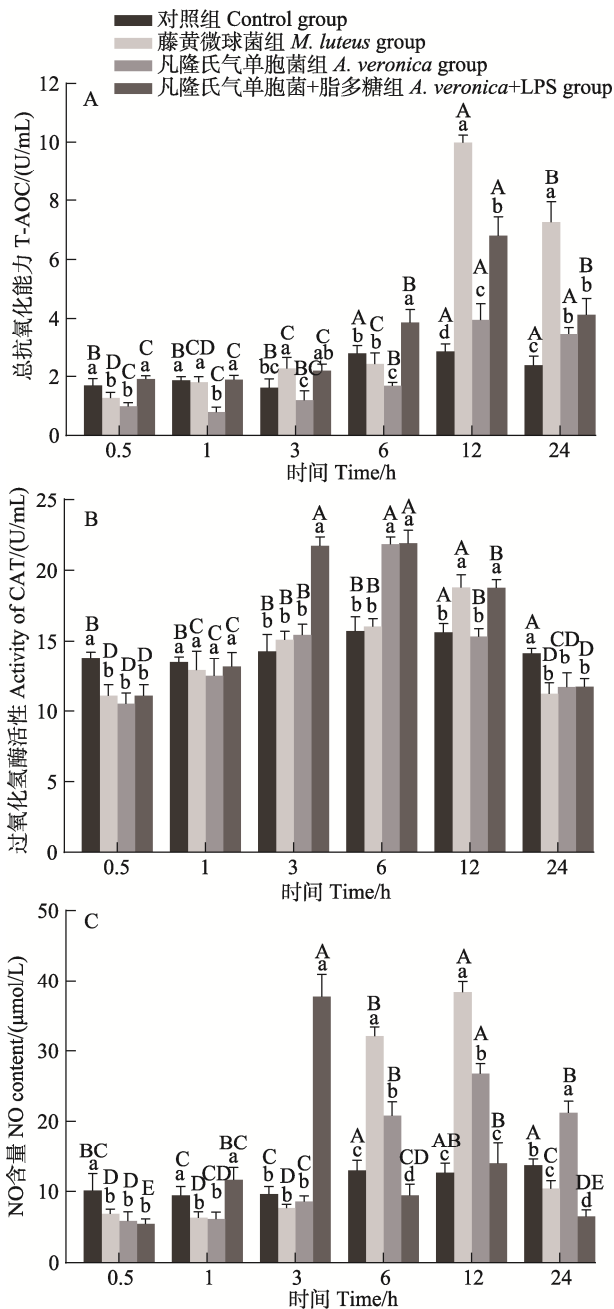


图 4 细菌对单环刺螈体腔细胞破碎液上清液抗氧化能力的影响

Fig.4 Influence of bacteria on the antioxidant capacity of the breaking solution supernatant of coelomocytes in *U. unicinctus*

在细菌刺激下, 不同实验组单环刺螈体腔细胞破碎液上清液中过氧化氢酶活性均呈先下降后上升再下降的趋势(图 4B)。至处理 3 h, 凡隆氏气单胞菌+脂多糖组过氧化氢酶活性显著高于其他各组($P<0.05$), 该组和凡隆氏气单胞菌组于处理 6 h 达到峰值, 随后下降; 藤黄微球菌组过氧化氢酶活性于处理 12 h 时达到峰值, 随后下降; 至处理 24 h 时, 各实验组体腔细胞破碎液上清液过氧化氢酶活性均显著低于对照组($P<0.05$), 但不同实验组间差异不显著($P>0.05$)。

随着细菌处理时间的延长, 单环刺螈体腔细胞破碎液上清液中 NO 含量总体呈先下降后上升再下降的趋势(图 4C)。凡隆氏气单胞菌+脂多糖组 NO 含量在处理 0.5 h 有所下降后迅速升高, 至处理 3 h 时达到峰值, 显著高于其他实验组($P<0.05$); 藤黄微球菌组和凡隆氏气单胞菌组体腔细胞破碎液上清液中 NO 含量于处理 12 h 时达到峰值, 随后下降; 至处理 24 h 时, 凡隆氏气单胞菌组体腔细胞破碎液上清液中 NO 含量仍显著高于对照组($P<0.05$)。

不同细菌处理组中, 体腔液上清液中的总抗氧化能力、过氧化氢酶活性以及 NO 含量总体均高于体腔细胞破碎液上清液。

2.3 细菌对单环刺螈体腔液免疫指标的影响

由图 5 可见, 在细菌刺激 0.5 h 时, 各实验组体腔细胞吞噬率均大于 40%, 藤黄微球菌组和凡隆氏气单胞菌组间差异不显著, 但均显著高于凡隆氏气单胞菌+脂多糖组; 随后, 藤黄微球菌组和凡隆氏气单胞菌组的体腔细胞吞噬率呈先下降后上升又下降的趋势, 而凡隆氏气单胞菌+脂多糖组体腔细胞的吞噬率先升高后下降, 于 1 h 达到峰值, 至处理 24 h, 仍

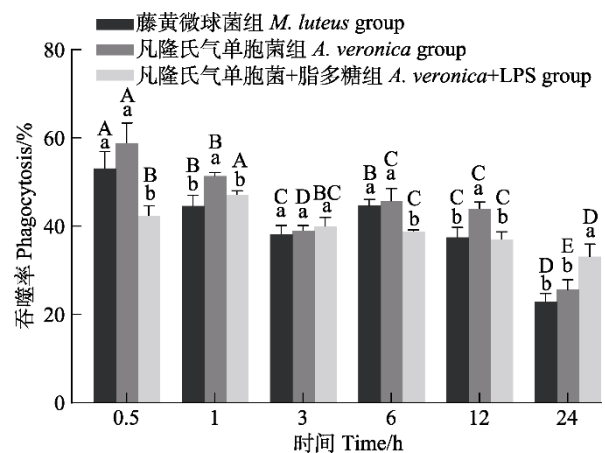


图 5 细菌对单环刺螈体腔细胞吞噬率的影响

Fig.5 Influence of bacteria on the phagocytosis of coelomocytes in *U. unicinctus*

显著高于其他实验组($P<0.05$)。实验期间, 凡隆氏气单胞菌组体腔细胞的吞噬率高于同期藤黄微球菌组。

随着细菌刺激时间的延长, 凡隆氏气单胞菌+脂多糖组单环刺螈体腔液上清液溶菌酶活性先上升后下降, 其他 2 个实验组溶菌酶活性呈先下降后上升再下降的趋势(图 6)。处理 0.5 h, 凡隆氏气单胞菌+脂多糖组溶菌酶活性显著高于其他各组($P<0.05$), 随后持续上升, 至处理 12 h 时达到最大值; 藤黄微球菌组和凡隆氏气单胞菌组溶菌酶活性变化幅度较小, 于处理 12 h 达到峰值, 至处理 24 h 时仍显著高于对照组($P<0.05$)。

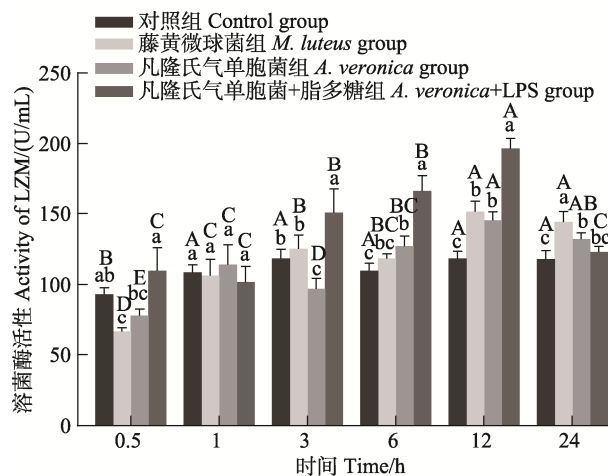


图 6 细菌对单环刺螈体腔液上清液溶菌酶活性的影响
Fig.6 Influence of bacteria on the activity of LZM in the supernatant of coelomic fluid in *U. uncinatus*

由图 7 可见, 在细菌刺激下, 各实验组体腔细胞破碎液上清液溶菌酶活性均有显著变化, 对溶菌酶活性的诱导强度从大到小依次为凡隆氏气单胞菌+脂多糖组、凡隆氏气单胞菌组、藤黄微球菌组, 分别于处理 12、6 和 6 h 时达到最大值; 至处理 24 h 时, 凡隆氏气单胞菌+脂多糖组和凡隆氏气单胞菌组体腔细胞破碎液上清液溶菌酶活性仍显著大于对照组($P<0.05$)。

2.4 细菌对单环刺螈体腔细胞免疫基因表达的影响

分别注射 4 种病原菌后, 单环刺螈体腔细胞免疫相关基因的表达水平变化见图 8。单环刺螈体腔细胞 *cbl-b* 基因的表达水平在不同细菌刺激下总体呈先上调后下降的趋势(图 8A)。处理 3 h 后, *cbl-b* 基因在金黄色葡萄球菌和凡隆氏气单胞菌刺激下表达水平显著上调($P<0.05$), 其中金黄色葡萄球菌组中 *cbl-b* 基因表达诱导程度最大; 至处理 12 h, 各实验组 *cbl-b* 基因表达水平均显著高于对照组, 其中金黄色葡萄球

菌和藤黄微球菌组基因表达水平最高; 随着处理时间的延长, 各实验组 *cbl-b* 基因表达水平逐渐降低。

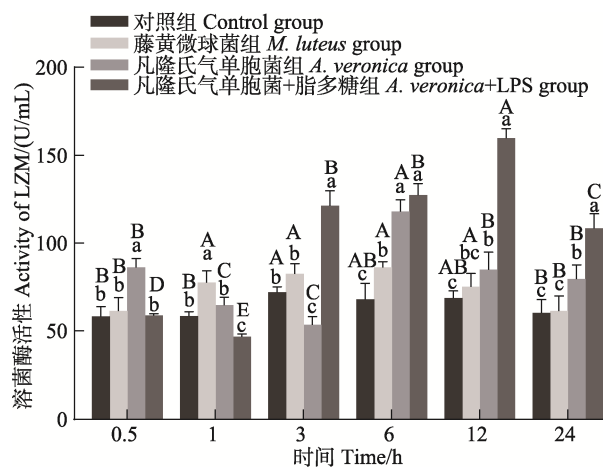


图 7 细菌对单环刺螈体腔细胞破碎液上清液溶菌酶活性的影响

Fig.7 Influence of bacteria on the activity of LZM in the breaking solution supernatant of coelomocytes in *U. uncinatus*

由图 8B 可见, 不同实验组单环刺螈体腔细胞 *actr3* 基因表达水平总体呈先上升后下降的趋势。处理 6 h 时, 各实验组中 *actr3* 基因表达水平显著高于对照组($P<0.05$), 其中, 鳗弧菌组 *actr3* 基因表达达到该组最高水平, 随后下降; 至处理 12 h 时, 金黄色葡萄球菌组、凡隆氏气单胞菌组和藤黄微球菌组的 *actr3* 基因表达水平达到峰值, 且金黄色葡萄球菌组 *actr3* 基因表达水平高于其他实验组; 处理 96 h 时, 藤黄微球菌组的 *actr3* 基因表达仍显著高于对照组($P<0.05$), 其他实验组与对照组差异不显著($P>0.05$)。

随着处理时间延长, 各实验组单环刺螈体腔细胞 *gck* 基因表达水平总体呈先上调后下降的趋势(图 8C)。处理 3 h 时, 各实验组中 *gck* 基因表达水平与对照组相比没有显著变化($P>0.05$); 处理 6 h 时, 各实验组中 *gck* 基因表达水平均显著上调且达到峰值($P<0.05$), 其中藤黄微球菌组中 *gck* 基因表达水平最高; 处理 12 h 后, 各实验组中 *gck* 基因表达水平逐渐下降; 至处理 96 h, 凡隆氏气单胞菌组和藤黄微球菌组 *gck* 基因表达仍显著高于对照组($P<0.05$)。

随着处理时间的延长, 各实验组单环刺螈体腔细胞 *lhpp* 基因表达水平总体呈先上升后下降的趋势(图 8D)。其中, 鳗弧菌和藤黄微球菌组中 *lhpp* 表达水平于处理 6 h 时达到峰值, 金黄色葡萄球菌和凡隆氏气单胞菌组中 *lhpp* 基因表达水平则分别在处理 12 h 和 24 h 达到最大值, 均显著高于对照组($P<0.05$), 随后下降。

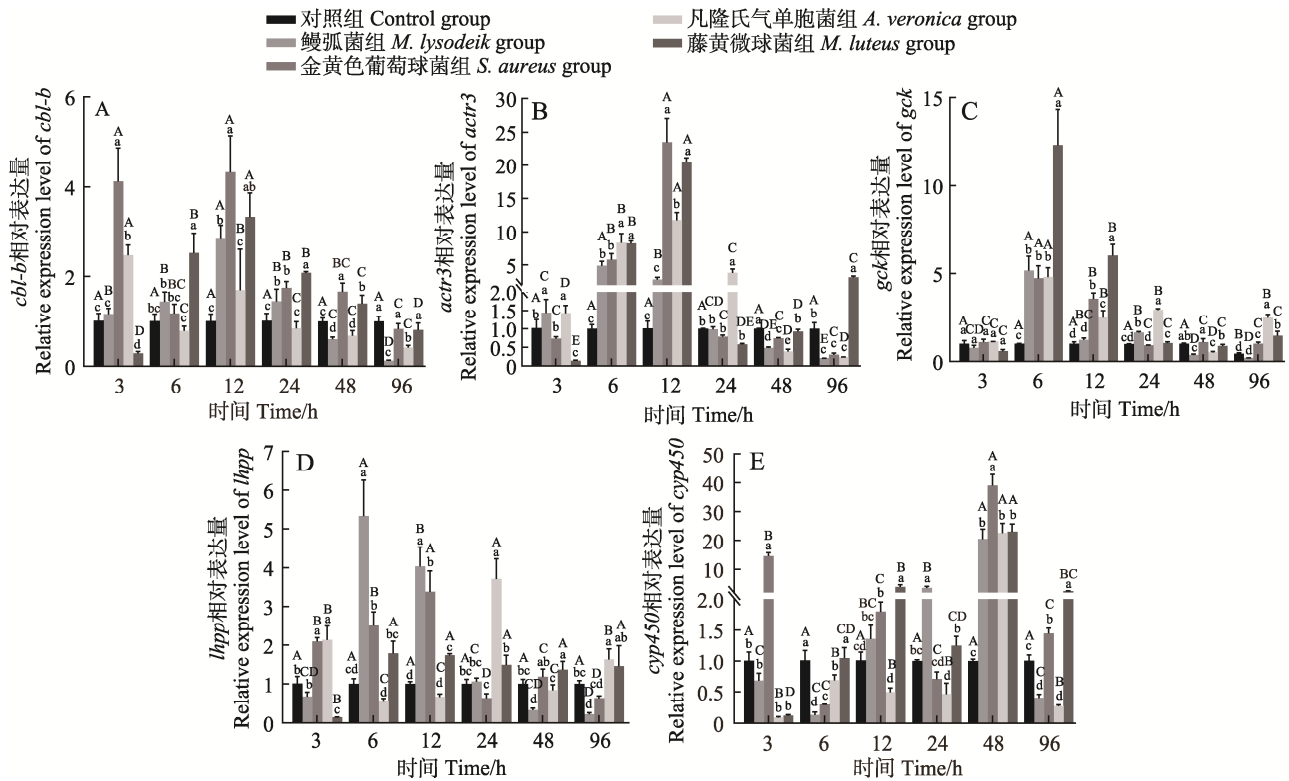


图8 细菌对单环刺螈体腔细胞免疫相关基因表达水平的影响

Fig.8 Influence of bacteria on the expression levels of genes related to immunity in the coelomocytes of *U. unicinctus*

由图8E可见,除金黄色葡萄球菌组外,其他实验组单环刺螈体腔细胞 *cyp450* 基因表达水平随细菌处理时间的延长呈先下降后上升再下降的变化趋势。各实验组体腔细胞 *cyp450* 基因表达均于处理48 h时达到峰值,显著高于对照组($P < 0.05$),且以金黄色葡萄球菌组 *cyp450* 基因表达诱导程度最大;至处理96 h时,藤黄微球菌组和金黄色葡萄球菌组 *cyp450* 基因表达仍显著高于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 细菌对单环刺螈体腔细胞数量和溶血反应的影响

海洋无脊椎动物主要通过血细胞或体腔细胞发挥细胞免疫功能,因此,血细胞或体腔细胞数量可作为反映海洋无脊椎动物免疫变化的指标之一(Zhang T et al, 2014)。殷维骏等(2024)研究发现,在棘皮动物弧菌(*Vibrio echinoideorum*)的侵染下,中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)细胞总数先减少后增加再减少。本实验中,在凡隆氏气单胞菌和藤黄微球菌2种病原菌刺激下,单环刺螈体腔细胞数量也呈先下降后上升又下降的变化趋势。推测短时间的细菌刺激产生了毒性作用,使得体腔细胞发生细胞凋亡,但长时间的细菌刺激诱导了细胞免疫,具有吞噬能力的

细胞数量增加以提高机体防御水平进而消灭细菌。

溶血是指红细胞膜破裂导致血红蛋白溢出的现象。黄栋(2022)报道大肠杆菌(*Escherichia coli*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)可使单环刺螈体腔细胞发生溶血。Zhu等(2023)研究发现,单环刺螈体腔细胞包括颗粒细胞、透明细胞和血栓细胞,其中颗粒细胞数量比例最大,具有吞噬功能和颗粒外排现象,颗粒外排可能伴随着具有杀菌作用的酶类物质释放。本研究结果显示,体腔细胞溶血反应剧烈程度从大到小依次为凡隆氏气单胞菌+脂多糖组、凡隆氏气单胞菌组、藤黄微球菌组。甘宏涛等(2022)研究表明,单环刺螈体腔液对革兰氏阴性菌的抑制作用更强。本研究中,凡隆氏气单胞菌引起的体腔细胞溶血反应比藤黄微球菌更强烈,表明该菌能快速激发单环刺螈体腔细胞免疫反应,使体腔细胞释放更多的颗粒和酶类物质以杀灭细菌,与上述研究结果相吻合。脂多糖是革兰氏阴性菌细胞壁外壁的主要成分,作为毒力因子已在多个物种中用于评估免疫反应(Swain et al, 2008)。本研究中,增加脂多糖处理组的体腔细胞表现出更强的溶血反应,表明脂多糖在一定程度上能够诱导单环刺螈体腔细胞免疫。对缢蛏(*Sinonovacula constricta*)(彭茂潇, 2017)的研究也报道了脂多糖对其溶血反应的诱导作用,主要表现为激活补体系统参与免疫反应,与本研

究结果类似。

3.2 细菌对单环刺螠体腔液抗氧化能力的影响

在正常条件下,生物体内的活性氧水平处在一个较稳定的水平,但当生物受到外部伤害或者刺激时,过量的活性氧自由基可能会引起氧化应激现象,进而损伤生物体内的细胞和组织(管敏等, 2020; Nair *et al.*, 2015)。机体本身具有抗氧化系统,在保护细胞免受氧化应激方面发挥着至关重要的作用(Cai *et al.*, 2022)。总抗氧化能力能够反映机体非酶系统总体能力的高低,过氧化氢酶是抗氧化系统中具有清除活性氧自由基功能的酶类物质(郭赛等, 2023; 相智巍等, 2023)。在本研究中,随着细菌刺激时间的延长,体腔液的总抗氧化能力和过氧化氢酶活性在显著升高后下降,与宋欣(2010)对青蛤(*Cyclina sinensis*)和陈仲(2018)对仿刺参(*Apostichopus japonicus*)的细菌攻毒研究结果一致。这可能由于细菌刺激前期,单环刺螠体内出现氧化应激现象,机体抗氧化系统诱导过氧化氢酶合成和总抗氧化能力增强以减少细胞损伤;后期,总抗氧化能力和过氧化氢酶活性下降,推测长时间的细菌刺激损伤了抗氧化系统,导致抗氧化能力减弱。

NO 能够结合氧自由基生成过氧化一氮杀伤入侵细菌,是呼吸爆发应对外来物质入侵的一种表现形式(朱旭枫等, 2021)。已有研究表明,在大肠杆菌刺激下,单环刺螠体腔细胞的 NO 水平有所上升(黄栋, 2022)。本研究中,体腔液上清液和体腔细胞破碎液上清液中 NO 含量随着细菌处理时间的延长逐渐增加,与上述结果类似。这表明细菌刺激产生了大量的活性氧自由基,NO 含量增加通过结合过量氧自由基,进而减少机体损伤和消灭细菌。

本研究结果还显示,单环刺螠体腔液上清液中的总抗氧化能力、过氧化氢酶活性和 NO 含量均高于体腔细胞破碎液上清液,表明在细菌刺激下体腔细胞通过溶血反应,将抗氧化酶释放于体腔液中,从而提高机体的抗氧化应激能力,保护细胞组织免受氧化应激损伤。

3.3 细菌对单环刺螠体腔液免疫指标的影响

吞噬细胞是海洋无脊椎动物先天性免疫系统一类重要的功能细胞,能够清除外来入侵异物。颗粒细胞是单环刺螠体内发挥吞噬作用的主要体腔细胞种类,细胞吞噬率可以反映吞噬作用的强弱(Zhu *et al.*, 2023)。本研究发现,经过凡隆氏气单胞菌和藤黄微球菌分别刺激 0.5 h 后,单环刺螠体腔细胞吞噬率均达到峰值随后下降,至细菌处理 6 h 时吞噬率有

一定回升,此时体腔细胞数量同样有所增加,推测单环刺螠体腔细胞吞噬作用的提升首先依靠增加吞噬细胞的数量,这与殷维骏等(2024)研究棘皮动物弧菌感染对中间球海胆免疫指标影响的结果类似。本实验期间,凡隆氏气单胞菌组单环刺螠体腔细胞吞噬率始终高于藤黄微球菌组,表明单环刺螠体腔细胞对凡隆氏气单胞菌的吞噬作用更强,与甘宏涛等(2022)研究发现单环刺螠体腔液对革兰氏阴性菌具有较好抑制作用的结果相吻合。徐翊轩等(2015)发现脂多糖能够显著增加栉孔扇贝(*Azumapecten farreri*)血细胞吞噬活性。本研究中,添加脂多糖的实验组在处理 24 h 时,能保持较高的体腔细胞吞噬率,表明脂多糖对于维持单环刺螠体腔细胞吞噬活性具有一定诱导作用。

溶菌酶是一种生物体内广泛存在的非特异性免疫因子,能够催化构成细菌细胞壁的糖类水解,可作为环境微生物扰动相关的先天免疫反应敏感指标(Mai *et al.*, 2009; Canesi *et al.*, 2010)。本研究中,单环刺螠体腔液中溶菌酶活性在细菌刺激下总体呈先上升后下降的趋势,在溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)感染中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) (莫伟, 2022)和鳗弧菌感染脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) (葛倩倩, 2013)的研究中也得到了相似结果。这表明在细菌入侵初期,先天免疫系统快速反应,提高溶菌酶活性以达到破坏细菌细胞壁和瓦解细菌的作用;随着细菌刺激时间的延长,可能损伤了机体免疫系统进而降低了免疫防御能力,使得溶菌酶活性下降,这与高氨氮胁迫黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的影响研究结果相一致(聂丽玲等, 2024)。

3.4 细菌对单环刺螠体腔细胞免疫相关基因表达的影响

Casitas B 细胞淋巴瘤 b (*cbl-b*)是一种存在于细胞和组织中的连接酶,能够调节多种膜受体和共受体的下游蛋白,影响先天性和适应性免疫系统状态(Ebner *et al.*, 2017)。*cbl-b* 基因作为一种负向调节免疫因子,其表达异常会影响机体的免疫耐受(Tang *et al.*, 2019)。本研究中,不同细菌刺激下单环刺螠体腔细胞 *cbl-b* 基因表达水平均有所上调,表明该基因积极参与单环刺螠抵御细菌入侵的免疫应答过程。在人类临床医学方面, *cbl-b* 基因是一种具有潜力的细胞内免疫治疗靶点,已应用于癌症免疫治疗试验(Hu *et al.*, 2024)。

actr3 是一种蛋白质编码基因,该基因编码的肌动蛋白 3 具有调节肌动蛋白的细胞骨架、细胞运动以及免疫系统过程的作用(Huang *et al.*, 2021)。此外,肌动蛋白 3 还参与调节多种细胞过程,包括内吞作用、

吞噬作用以及受损 DNA 的修复等(Abella *et al.*, 2016)。在本研究中, 细菌刺激 12 h 后, *actr3* 基因表达水平显著上调, 表明此时 *actr3* 基因积极参与单环刺螠体腔细胞对细菌的免疫应答, 细胞通过吞噬作用达到消灭入侵细菌的目的。

葡萄糖是动物进行正常生命活动的能量来源。*gck* 基因编码葡萄糖酸激酶, 与动物体内葡萄糖的摄取和利用有关, 具有维持葡萄糖稳态的功能(夏如等, 2024)。本研究中, 在 4 种细菌分别刺激下, 单环刺螠体腔细胞 *gck* 基因表达水平均在处理 6 h 时显著上调且达到峰值, 推测细菌入侵短时间内可刺激单环刺螠体腔细胞的免疫反应, 需要大量葡萄糖提供能量以维持正常免疫机能。

lhpp 基因编码组氨酸磷酸酶, 介导组氨酸磷酸化, 调节细胞增殖、分化和凋亡以及信号转导(Zhao *et al.*, 2021)。Wang 等(2023)报道, 在凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)中分离鉴定出一种组氨酸磷酸酶同系物, 发现其在感染副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的凡纳对虾血细胞和肝胰腺中显著表达且促进了血细胞凋亡, 表明其参与机体抗细菌感染的免疫过程。本研究中, 4 种病原菌处理下的单环刺螠体腔细胞 *lhpp* 基因表达水平呈现波动式变化, 推测细菌刺激使其不断表达, 进而调节相关信号通路引起细胞凋亡, 以维持内部稳态和提高机体耐受性。

细胞色素 P450 (*cyp450*)是编码自然界中最多样化的酶超家族之一, 涉及次生代谢产物的生物合成、运输和分解代谢以及对外源物质的解毒(Uno *et al.*, 2012)。中华绒螯蟹抗维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)的转录组分析结果表明, 差异表达基因显著富集在与细胞色素 P450 相关的信号通路(鞠蓉, 2022)。本研究中, 单环刺螠体腔细胞 *cyp450* 基因在不同细菌刺激下表现出不同的诱导或抑制效应, 与 *cyp450* 基因在感染了爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)和柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)的斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)组织中选择性表达(Zhang J R *et al.*, 2014)相吻合, 表明 *cyp450* 基因积极调控相关物质代谢, 发挥对细菌的解毒作用, 参与机体抗菌免疫反应。

4 结论

综上所述, 鳃弧菌和凡隆氏气单胞菌 2 种病原菌可对单环刺螠的体腔细胞数量和细胞吞噬率以及体腔液抗氧化能力和免疫指标产生显著影响; 在细菌刺激下, 体腔细胞发生溶血反应释放颗粒参与抗氧化和免疫反应, 体腔液上清液的抗氧化能力和免疫功能均

强于体腔细胞破碎液上清液; 脂多糖能够诱导单环刺螠体腔细胞免疫以及提高抗氧化能力; 在鳃弧菌、金黄色葡萄球菌、凡隆氏气单胞菌和藤黄微球菌 4 种病原菌刺激下, 单环刺螠体腔细胞中 *cbl-b*、*actr3*、*gck*、*lhpp* 和 *cyp450* 基因的表达水平变化显著。

参 考 文 献

- ABELLA J V G, GALLONI C, PERNIER J, *et al.* Isoform diversity in the Arp2/3 complex determines actin filament dynamics. *Nature Cell Biology*, 2016, 18(1): 76–86
- CAI B N, WAN P, CHEN H, *et al.* Purification and identification of novel myeloperoxidase inhibitory antioxidant peptides from tuna (*Thunnus albacares*) protein hydrolysates. *Molecules*, 2022, 27(9): 2681
- CANESI L, BARMO C, FABBRI R, *et al.* Effects of *Vibrio* challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2010, 152(3): 399–406
- CHEN J, WANG Y J, YANG Z, *et al.* Identification and validation of the reference genes in the echinuran worm *Urechis unicinctus* based on transcriptome data. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 248
- CHEN Q K, XING Y F, LEI Y, *et al.* Genetic diversity, antibiotic resistance, and pathogenicity of *Aeromonas veronii* isolated from farmed largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in the main aquaculture regions of China. *Aquaculture*, 2024, 592: 741150
- CHEN Z, JIANG J W, GAO S, *et al.* Response of immune-related enzyme activities in the coelomocytes of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* challenged with different pathogenic bacteria. *Fisheries Science*, 2018, 37(3): 295–300 [陈仲, 蒋经伟, 高杉, 等. 不同病原菌刺激后仿刺参幼参体腔细胞中免疫相关酶的应答变化. 水产科学, 2018, 37(3): 295–300]
- EBNER P, VERSTEEG G A, IKEDA F. Ubiquitin enzymes in the regulation of immune responses. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 52(4): 425–460
- GAN H T, LIU T H, DING Z Y, *et al.* Antibacterial analysis of coelomic fluid from echinuran worm *Urechis unicinctus*. *Fisheries Science*, 2022, 41(3): 459–466 [甘宏涛, 刘统昊, 丁子媛, 等. 单环刺螠体腔液抑菌特性研究. 水产科学, 2022, 41(3): 459–466]
- GE Q Q. Effects of *Vibrio anguillarum* infection on the expression of genes related to Imd immune pathway and nonspecific immune factors. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 [葛倩倩. 鳃弧菌感染对 Imd 免疫通路相关基因表达及非特异性免疫因子的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- GUAN M, ZHANG D Z, TANG D M. Effects of chronic ammonia stress on growth, antioxidative and immunity

- indices in liver of juvenile *Acipenser schrenckii*. South China Fisheries Science, 2020, 16(2): 36–42 [管敏, 张德志, 唐大明. 慢性氨氮胁迫对史氏鲟幼鱼生长及其肝脏抗氧化、免疫指标的影响. 南方水产科学, 2020, 16(2): 36–42]
- GUO S, CHEN X R, YUAN H W, *et al.* Effects of dietary protein levels and processing techniques on the growth performance, digestibility, and antioxidant capacity of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(5): 90–103 [郭赛, 陈效儒, 袁汉文, 等. 饲料蛋白质水平和加工工艺对克氏原螯虾生长性能、消化力和抗氧化性能的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(5): 90–103]
- HAN B Q, DU F, BI Q Q, *et al.* Molecular cloning of *Urechis unicinctus* fibrinolytic enzymes UFEIII and prokaryotic expression. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(3): 44–49 [韩宝芹, 杜芳, 毕庆庆, 等. 单环刺螭纤溶酶III基因克隆及原核表达. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(3): 44–49]
- HU X Q, LI E D, ZHOU Y G, *et al.* Casitas b cell lymphoma-B (cbl-b): A new therapeutic avenue for small-molecule immunotherapy. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2024, 102: 117677
- HUANG D. Cell types and antibacterial activity of coelomocytes of *Urechis unicinctus*. Master's Thesis of Ludong University, 2022 [黄栋. 单环刺螭体腔液细胞类型及抗菌作用. 鲁东大学硕士研究生学位论文, 2022]
- HUANG S L, LI D, ZHUANG L L, *et al.* Identification of Arp2/3 complex subunits as prognostic biomarkers for hepatocellular carcinoma. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021, 8: 690151
- ISLAM S I, MAHFUJ S, BAQAR Z, *et al.* Bacterial diseases of Asian sea bass (*Lates calcarifer*): A review for health management strategies and future aquaculture sustainability. Heliyon, 2024, 10(9): e29793
- JU R. Immune defence mechanisms and differentially expressed genes against *Aeromonas veronii* in *Eriocheir sinensis*. Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2022 [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. 山东农业大学硕士研究生学位论文, 2022]
- KUO C J, HANSEN M, TROEMEL E. Autophagy and innate immunity: Insights from invertebrate model organisms. Autophagy, 2018, 14(2): 233–242
- LEE S A, LIU F, YUWONO C, *et al.* Emerging *Aeromonas enteric* infections: Their association with inflammatory bowel disease and novel pathogenic mechanisms. Microbiology Spectrum, 2023, 11(5): e0108823
- LI J J, LU J J, ASAKIYA C, *et al.* Extraction and identification of three new *Urechis unicinctus* visceral peptides and their antioxidant activity. Marine Drugs, 2022, 20(5): 293
- LI S, LI W F, CHEN F Y, *et al.* Metabolomic and transcriptomic analysis reveals immune and hormone modulation at the molting stage of juvenile mud crabs challenged with *Staphylococcus aureus* and *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture, 2023, 575: 739775
- LI Z Y, SUN Y G, TAN R M, *et al.* Identification, characterization and complete genome analysis of a *Vibrio anguillarum* isolated from *Sebastes schlegelii*. Microbial Pathogenesis, 2024, 190: 106611
- LIU S, GAO A, MA Y Y, *et al.* Nonspecific immune, histology and accumulation of marine worm, *Urechis unicinctus* in response to bisphenol A (BPA). Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024a, 271: 115993
- LIU S, XI C X, WU Y X, *et al.* Hexavalent chromium damages intestinal cells and coelomocytes and impairs immune function in the echiuran worm *Urechis unicinctus* by causing oxidative stress and apoptosis. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2024b, 285: 110002
- MAI W J, HU C Q. Molecular cloning, characterization, expression and antibacterial analysis of a lysozyme homologue from *Fenneropenaeus merguensis*. Molecular Biology Reports, 2009, 36(6): 1587–1595
- MO W. Effects of acute *Vibrio alginolyticus* infection on the immune defense and transcriptome of the *Eriocheir sinensis*. Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2022 [莫伟. 溶藻弧菌急性感染对中华绒螯蟹免疫防御和转录组的影响研究. 山东农业大学硕士研究生学位论文, 2022]
- NAIR R R, BAGHERI M, SAINI D K. Temporally distinct roles of ATM and ROS in genotoxic-stress-dependent induction and maintenance of cellular senescence. Journal of Cell Science, 2015, 128(2): 342–353
- NIE L L, YANG Z H, ZHANG Q, *et al.* High ammonia exposure after pre-acclimatization to low ammonia concentration on gill tissue structure, immune indices, and related genes in *Tachysurus fulvidraco*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2024, 48(11): 1812–1821 [聂丽玲, 杨占虎, 张卿, 等. 低浓度氨氮预适应后高氨氮暴露对黄颡鱼鳃组织结构、免疫指标及相关基因的影响. 水生生物学报, 2024, 48(11): 1812–1821]
- PENG M X. Research on characterization and preliminary hemolysis function of complement component 3 in *Sinonovacula constricta*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [彭茂潇. 缢蛏补体C3基因特征及溶血功能初步研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- QIN Z D. The immunity features and the underlying anti-bacterial mechanism of fish erythrocyte and shrimp hemocyte. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2018 [秦真东. 鱼类红细胞和虾类血淋巴细胞的免疫特性和抗菌机理研究. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2018]
- SONG X, ZHANG L Y, GAO W W, *et al.* Effect of *Vibrio anguillarum* on activity of phosphatase in *Cyclina sinensis*.

- Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(2): 254–258 [宋欣, 张丽岩, 高玮玮, 等. 鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*) 感染对青蛤(*Cyclina sinensis*)磷酸酶活性的影响. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 254–258]
- SWAIN P, NAYAK S K, NANDA P K, *et al.* Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 191–201
- TANG R, LANGDON W Y, ZHANG J. Regulation of immune responses by E3 ubiquitin ligase Cbl-b. *Cellular Immunology*, 2019, 340: 103878
- UNO T, ISHIZUKA M, ITAKURA T. Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2012, 34(1): 1–13
- WANG S J, XU X H, TU D Y, *et al.* Transcriptomic analysis of the coelomocytes of *Urechis unicinctus* infected with *Vibrio anguillarum*. *Journal of Jiangsu Ocean University (Natural Science Edition)*, 2024, 33(2): 5–16 [王思婕, 许星鸿, 涂丁颖, 等. 鳗弧菌感染单环刺螠体腔细胞转录组分析. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2024, 33(2): 5–16]
- WANG X L, LI J, LI G Y, *et al.* The effect of *rpoS* on *Hcp* expression and bactericidal activity in *Vibrio anguillarum* MHK3. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(6): 125–134 [王小鹿, 李杰, 李贵阳, 等. *rpoS* 对鳗弧菌 MHK3 株 *Hcp* 表达和杀菌能力的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 125–134]
- WANG Z Y, ZHANG Y L, AWEYA J J, *et al.* The histidine phosphatase LHPP of *Penaeus vannamei* is involved in shrimp hemocytes apoptosis. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2023, 5: 100109
- XIA R, SUN H, WANG K W, *et al.* Prokaryotic expression, antibody preparation, and regulation by dietary starch levels of G6pc and Gck in *Micropterus salmoides*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, 48(11): 1835–1844 [夏如, 孙皓, 王康伟, 等. 大口黑鲈 G6pc 和 Gck 的原核表达、抗体制备及饲料淀粉水平对其表达的影响. 水生生物学报, 2024, 48(11): 1835–1844]
- XIANG Z W, JIANG K J, CHU H Y, *et al.* Effects of salinity on growth performance, digestive enzymes, and nonspecific immunity in juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus*♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(3): 64–73 [相智巍, 姜柯君, 褚洪永, 等. 不同盐度对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、消化酶活性和非特异性免疫的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(3): 64–73]
- XU Y X, ZHAN W B, XING J. Effect of water temperature on phagocytic activity of the haemocytes of scallop (*Chlamys farreri*) after stimulated by lipopolysaccharide. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(6): 31–38 [徐翊轩, 战文斌, 邢婧. 温度与脂多糖对栉孔扇贝血细胞吞噬活力的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2015, 45(6): 31–38]
- YIN W J, LIU Y S, TIAN W Z, *et al.* Analysis of immune priming phenomenon in sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) induced by *Vibrio echinoideorum*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2024, 39(2): 266–274 [殷维骏, 刘岩松, 田文卓, 等. 棘皮动物弧菌诱导中间球海胆免疫致敏现象分析. 大连海洋大学学报, 2024, 39(2): 266–274]
- YU S X, JI Y, LI X, *et al.* Isolation, identification, characterization, and sensitivity analysis of gut pathogenic *Vibrio* of *Urechis unicinctus*. *Marine Sciences*, 2019, 43(7): 112–121 [于士翔, 纪元, 李新, 等. 一株单环刺螠致病弧菌的分离鉴定、生长特性研究及药敏分析. 海洋科学, 2019, 43(7): 112–121]
- ZHAN F B, ZHOU S C, SHI F, *et al.* Transcriptome analysis of *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes in response to *Staphylococcus aureus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 139: 108927
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2014, 1840(9): 2813–2828
- ZHANG N C, WANG L, FANG Q. Development of a triple PCR detection method and antibiotic resistance analysis for *Micrococcus luteus* isolated from fish. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(5): 94–100 [张楠驰, 王利, 方庆. 鱼源藤黄微球菌三重 PCR 检测法的建立及耐药性分析. 食品工业科技, 2020, 41(5): 94–100]
- ZHANG T, QIU L M, SUN Z B, *et al.* The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 45(1): 141–150
- ZHANG W Q, ZHANG L, FENG Y X, *et al.* Genome-wide profiling of DNA methylome and transcriptome reveals epigenetic regulation of *Urechis unicinctus* response to sulfide stress. *Science of the Total Environment*, 2024, 927: 172238
- ZHAO J, ZOU L X, LI Y, *et al.* HisPhosSite: A comprehensive database of histidine phosphorylated proteins and sites. *Journal of Proteomics*, 2021, 243: 104262
- ZHU L, WANG S J, CAO S Y, *et al.* Biochemical and cytological evaluation of the coelomic fluid of *Urechis unicinctus*: Its responses under pathogenic exposure and potential phagocytic activities. *Aquaculture*, 2023, 577: 739985
- ZHU X F, DENG Q X, GUO H, *et al.* Effect of hydrolyzable tannins on hemolymph and cellular immunological responses of *Litopenaeus vannamei* challenged by *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2021, 41(3): 12–19 [朱旭枫, 邓秋霞, 郭慧, 等. 水解单宁对副溶血弧菌感染凡纳滨对虾血液及血细胞免疫指标的影响. 广东海洋大学学报, 2021, 41(3): 12–19]

Analysis of the Immune Responses to Pathogenic Bacterial Exposure in *Urechis unicinctus* Coelomic Fluid

WANG Sijie¹, XU Xinghong^{1①}, CHI Jiale¹, SUN Xiujun², LI Baiyu¹, XI Chenxiao¹, YANG Xiao¹

(1. Marine Science and Fisheries College, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract Aquatic environments support a diverse range of microbial communities that have mutualistic associations with aquatic plants and farm animals. Under certain conditions, some microorganisms undergo transition to potential pathogenic bacteria in response to the influence of internal and external factors within the water environment, which can contribute to bacterial diseases and influence the survival and growth of farm animals. The fat innkeeper worm (*Urechis unicinctus*), which is the only Xenopneusta worm distributed along the coast of China, has rich nutritional and medicinal values. *U. unicinctus* is a filter-feeding marine invertebrate that inhabits muddy and sandy substrates and is susceptible to attack by environmental pathogens. As a means of defense, these worms are primarily dependent on physical barriers and cellular and humoral immune factors within the coelomic fluid that constitute a non-specific type of immunity. The coelomic fluid of *U. unicinctus* is equivalent to the blood of vertebrates, in which the internal organs are bathed, and plays a particularly important role in immunity. To date, studies on the coelomic fluid of *U. unicinctus* have mainly focused on the isolation and purification of fibrinolytic enzymes and the effects of environmental factors, such as sulfide, hexavalent chromium, and bisphenol A stress, whereas comparatively few studies have sought to examine the effects of bacteria on *U. unicinctus*. In this study, we assessed the patterns of antioxidant and immune activities in the coelomic fluid of *U. unicinctus* in response to bacterial infection. On the basis of our findings that the coelomic fluid has certain inhibitory effects on aquatic pathogens, we sought to determine the number and phagocytotic rates of coelomocytes, the antioxidant and immune indices of the coelomic fluid, and the expression of immune-related genes in response bacterial attack, with the aim of providing a reference for further studies on the immune defense mechanisms of *U. unicinctus* for countering bacterial infections.

In this study, *Aeromonas veronica* and *Micrococcus luteus* were selected as experimental bacterial pathogens, to which *U. unicinctus* was exposed, and coelomic fluid samples were collected at 0.5, 1, 3, 6, 12, and 24 h post-infection. Initially, 100 μ L samples were obtained to determine coelomocyte cell numbers and the rate of phagocytosis. The remaining samples were centrifuged for 10 min at 3,000 r/min and 4°C, and the coelomic fluid supernatant and cell precipitates were collected, respectively. The cell precipitates were suspended in sterile saline, and the supernatants containing coelomocytes were collected by centrifugation after fragmentation, and we subsequently determined the total antioxidant capacity, catalase activity, NO content, and lysozyme activity in the two supernatants. In addition, freshly obtained coelomic fluid was centrifuged for 15 min at 3,000 r/min and 4°C, and the resulting coelomocyte precipitate was washed three times with sterile saline, after which, the coelomocytes were resuspended in L-15 cell culture medium, with the concentration being adjusted to 1×10^6 cells/mL to obtain a coelomocyte suspension. This suspension was subsequently mixed with *A. veronica*, *M. luteus*,

① Corresponding author: XU Xinghong, Email: xhxu119@163.com

or *A. veronica* +lipopolysaccharides, and thereafter, samples were collected following 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min of treatment. These samples were centrifuged at 1,500 r/min for 5 min, and the absorbance values of the supernatants were measured at 404 nm for analysis of the hemolysis of coelomocytes. On the basis of previous transcriptome sequencing of *U. unicinctus* in response to *Vibrio anguillarum* treatment, we screened five immunity-related genes, namely, *cbl-b*, *gck*, *actr3*, *lhpp*, and *cyp450*, and assessed the expression of these genes in response to treatment with the four pathogens *A. veronica*, *M. luteus*, *V. anguillarum*, and *Staphylococcus aureus*, and a bacterial attack toxicity test was performed separately on *U. unicinctus* using sterile saline as a control. Coelomic fluid was collected with a sterile syringe at 3, 6, 12, 24, 48, and 96 h post-treatment. The coelomocytes were obtained by centrifugation for 15 min at 3,000 r/min and 4 °C, and changes in the expression patterns of immune-related genes in coelomocytes were analyzed using real-time fluorescence quantitative PCR, with the *β-actin* and *18S rRNA* genes being used as internal reference genes.

The results revealed that in response to the different bacterial treatments, the number and rate of phagocytosis of coelomocytes were characterized by a trend of an initial decline, followed by a subsequent increase, after which there was a further decline, and we found that the intensity of hemolytic reactions could be ordered as follows: *A. veronica*+lipopolysaccharide group > *A. veronica* group > *M. luteus* group. Similar patterns of initial decline, subsequent increase, and further decline were also observed for the total antioxidant capacity, catalase activity and NO content of the coelomic fluid supernatant and fragmented coelomocyte supernatant, whereas lysozyme activity was characterized by an increase-decline-increase trend, with a prolongation of the bacterial treatment time. Furthermore, the expression of *cbl-b*, *actr3*, *gck*, and *lhpp* in the coelomocytes of *U. unicinctus* initially increased and subsequently declined, whereas the expression of *cyp450* generally showed a trend of an initial decline, subsequent increase, and further decline.

In conclusion, different pathogens can have significant effects on the number of coelomocytes and the rates of coelomocyte phagocytosis in *U. unicinctus*, as well as the antioxidant capacity and immune indices of the coelomic fluid. Our comparisons revealed that in response to bacterial stimulation, the antioxidant and immunological capacities of coelomic fluid supernatant obtained from *U. unicinctus* were stronger than those of a fragmented coelomocyte supernatant. Furthermore, lipopolysaccharide was found to induce cellular immunity and thereby enhance the antioxidant capacity of *U. unicinctus*. Our findings in this study may provide important insights into the innate immune mechanisms of *U. unicinctus* in response to bacterial infections.

Key words *Urechis unicinctus*; Pathogenic bacterium; Immunity; Antioxidant activity; Gene expression