

文章编号: 1674-5566(2024)01-0009-09

DOI: 10.12024/jsou.20230304108

RseB影响溶藻弧菌感染花鲈的能力

周家宇^{1,2}, 姜维^{1,2}, 王雨果^{1,2}, 陈小辉³, 罗士炎⁴, 鲍宝龙^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 3. 福建闽威实业股份有限公司, 福建 福鼎 355200; 4. 福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 为研究 *RseB* 基因缺失对溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 感染花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 能力的影响, 评估花鲈感染后的 LD₅₀、定殖能力和免疫响应。结果显示, 溶藻弧菌野生株 LD₅₀ 为 2.013×10^5 cfu/mL, *RseB* 缺失溶藻弧菌 LD₅₀ 为 5.526×10^5 cfu/mL, *RseB* 缺失溶藻弧菌毒力下降 63.6%; 溶藻弧菌主要在花鲈的鳃部、肠道和皮肤定殖, 相对野生菌株, *RseB* 缺失溶藻弧菌定殖肠道的空泡化程度更低, 鳃组织结构的损坏程度更低; 分别对野生株与 *RseB* 缺失溶藻弧菌感染的花鲈头肾组织进行转录组测序, 发现与免疫相关的差异表达基因一共有 236 个, 其中包括了 122 个显著上调的免疫基因和 114 个显著下调的免疫基因, 大部分显著富集在 Th1 和 Th2 细胞分化、B 细胞受体信号通路、T 细胞受体信号通路等特异性免疫通路上, 部分基因显著富集在与细胞凋亡相关的通路以及与炎症相关的 NF- κ B 信号通路中。结果表明: *RseB* 缺失溶藻弧菌能引起宿主细胞的免疫反应且毒力明显降低。

关键词: 溶藻弧菌; 花鲈; *Rse* 基因; 致病性; 免疫响应

中图分类号: S 943

文献标志码: A

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 是水产动物常见的条件致病菌^[1], 发病率高、致死率高以及传播范围广^[2]。花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 作为我国重要的海水养殖鱼类, 由溶藻弧菌等引起的弧菌病严重影响了花鲈养殖业的发展^[3]。已有研究报道溶藻弧菌对宿主的侵袭、黏附、定殖以及毒力释放等的影响, 如: 通过敲除溶藻弧菌 *cbpD* 基因发现其细菌游动能力和胞外蛋白酶活性显著降低以及对斑马鱼的毒力减弱^[4]; 干扰溶藻弧菌 Va1686 效应蛋白正常翻译能导致其诱导宿主细胞凋亡能力降低^[5]; 使用 RNAi 技术敲降溶藻弧菌 *Rpos* 发现其黏附能力严重受损^[6]。然而, 与溶藻弧菌包膜应激反应以及毒力相关的研究还很少。

当细菌遭受攻击时, 它们通常会产生产包膜应激反应去保持自身膜的完整性以抵御外界的攻击。而研究人员在大肠杆菌中发现, 包膜应激反应是由 *sigmaE* 因子控制^[7]。*RseA* 作为一个抗 *sigmaE* 因子,

通过 DegS、RseP 和细胞质蛋白酶将自身消化以解除 *sigmaE* 拮抗作用使得大肠杆菌产生膜应激反应, *RseB* 与 *RseA* 结合能增强对 *sigmaE* 抑制作用^[8]。但 *RseA* 和 *RseB* 缺失影响溶藻弧菌感染能力的研究很少, *RseB* 缺失溶藻弧菌感染凡纳滨对虾的能力下降^[9], 关于 *Rse* 基因家族对溶藻弧菌感染花鲈的能力、途径等研究尚未有报道。本研究评估 *RseB* 缺失对溶藻弧菌感染花鲈致病力的影响, 为开发花鲈抗弧菌免疫增强剂或减毒疫苗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼和所用细菌

实验所用花鲈来自福建省闽威国家级花鲈良种场, 所用溶藻弧菌野生型菌株购买于中国菌种保藏中心 (ATCC 号: 17749), *RseB* 缺失溶藻弧菌菌株 $\Delta RseB$ 为本实验基因工程菌株^[9]。本实验所用菌株和引物见表 1。

收稿日期: 2023-03-03

修回日期: 2023-04-22

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFD2400100); 福建省区域发展项目 (2021N3016); 福建省省属公益类科研院所基本科研专项 (2020R1022009)

作者简介: 周家宇 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: 1479861889@qq.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.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>

表 1 菌株和引物列表
Tab. 1 Strains and primers in this study

菌株及引物	表型及相关特征	用途	
Strains and primers	Phenotypes and correlative characters	Usage	
菌株 Strains	溶藻弧菌	Ampr ⁺	供试菌
	$\Delta RseB$	Ampr ⁺	供试菌
	<i>RseB</i> -up-F	AAGGAAAAAGCGGCCGACGGCATTTCATCAAGT(引入 <i>NotI</i> 酶切位点)	PCR 验证
	<i>RseB</i> -down-F	CGGGATCCGCTCTCATGGATGGAGAAT (引入 <i>BamH</i> I 酶切位点)	PCR 验证
	<i>uroc1</i> -F	AGTTGGATGGGAGAGGTGA	qRT-PCR
	<i>uroc1</i> -R	ACCCCGTTAGAGACATCCCA	qRT-PCR
	<i>G6pc</i> -F	GCTGGAGTCTTGTGTCAGGCATT	qRT-PCR
	<i>G6pc</i> -R	AATCCAAGCGGAAACCAAA	qRT-PCR
	<i>cyp1a1</i> -F	AAAGGCCACACAGAAGGGAC	qRT-PCR
	<i>cyp1a1</i> -R	TCGGGATGTTTAGCAAGCAG	qRT-PCR
	<i>Ahcyl2</i> -F	AGCCATGAACGTCAACGACTC	qRT-PCR
	<i>Ahcyl2</i> -R	CCCACCTCTCCATATCCACAC	qRT-PCR
	<i>MAP7</i> -F	GGAGCCAGAGAACCAACAGA	qRT-PCR
引物 Primers	<i>MAP7</i> -R	GACTGGATAGAGAAAGCCGA	qRT-PCR
	<i>Vegfaa</i> -F	GGGCAGTCGCTTGAAGAGAA	qRT-PCR
	<i>Vegfaa</i> -R	GAGAGACAGACAGGGGTGGGG	qRT-PCR
	<i>NCOA7</i> -F	CCAGCAGAGGAGAAAAGGAA	qRT-PCR
	<i>NCOA7</i> -R	GTCAGGCTCAGGCCAGACT	qRT-PCR
	<i>Itga6</i> -F	TGGGCTTTCTGGGTCTTTGC	qRT-PCR
	<i>Itga6</i> -R	CCCCTGTGGATTATCGTGG	qRT-PCR
	<i>ITGA2</i> -F	CTGCAGGGGAGAAAGGAGATG	qRT-PCR
	<i>ITGA2</i> -R	GGCCGAGTCAGGGAACAC	qRT-PCR
	<i>ANPEP</i> -F	CCTTCATCATTGCTCCATCC	qRT-PCR
	<i>ANPEP</i> -R	CTTCGCTCAGCCACATCTCCT	qRT-PCR
	β -actin-F	CAACTGGGATGACATGGAGAAG	qRT-PCR
	β -actin-R	TTGGCTTTGGGTTTCAGG	qRT-PCR

1.2 溶藻弧菌半致死浓度 LD_{50} 测定

选取 3 月龄健康花鲈幼鱼, 设立 3 个处理组, 分别以 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 cfu/mL 的最终细菌浓度进行腹腔注射。野生型、 $\Delta RseB$ 溶藻弧菌各浓度处理 10 尾, 设生理盐水作对照。统计 7 d 内各处理组的花鲈死亡情况, 使用寇式计算公式^[10]得出 7 d 内的 50% 致死浓度 (LD_{50})。

1.3 溶藻弧菌腹腔注射花鲈试验

设 3 个处理组, 腹腔注射的菌体浓度为 5.0×10^5 cfu/mL, 野生型、 $\Delta RseB$ 实验组各 30 尾, 设生理盐水作对照。观察感染后花鲈的发病情况, 试验持续 7 d。随机选取被感染第 4、8、12、24、48、72 和 120 h 的花鲈, 用无菌镊子采集肝脏、脾脏、肠道、鳃、脑、头肾、皮肤、肌肉、心脏和眼睛, 研磨后

用 PBS 重悬取上清, 进行菌株分离计数。在含 $100 \mu\text{g/mL}$ 氨苄霉素的 TCBS 平板上随机挑选 300 个单菌落, 以 *RseB*-up-F 和 *RseB*-down-R 为上下游引物进行 PCR 鉴定, 分离弧菌数量进行统计分析^[9]。

1.4 花鲈病理组织切片

在腹腔注射感染溶藻弧菌后的第 0、4、8、12、24 和 48 小时, 随机挑选花鲈用于解剖, 获取肠道和鳃组织, 经固定、梯度脱水、透明后用于制作石蜡切片, 观察感染后的组织结构变化。将固定的肠道和鳃组织进行梯度乙醇脱水, 70%、75%、80% 和 90% 乙醇各处理 45 min; 2 次 100% 乙醇各处理 30 min; 最后按照乙醇与二甲苯 1:1 的比例透明肠道和鳃组织 5 min; 2 次二甲苯各处理 1 min^[11]。

1.5 RNA提取与转录组测序

采集感染 12 h 后的花鲈头肾立即转移到 RNater(Phygene, 中国)保护液,保存于 -20°C 。使用 Trizol 试剂盒(Invitrogen, CA, USA)从头肾中提取总 RNA,使用 NanoPhotometer[®]分光光度计评估总 RNA 的纯度;使用 Qubit2.00[®] Fluorometer 测量 RNA 浓度;使用 Agilent2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)检测 RNA 的完整性。使用 Ribo-zero[™] rRNA Removal Kit (Epicentre, Madison, WI, USA)去除核糖体 RNA (rRNA),富集 mRNA。然后,通过带有 Oligo(dT) 的磁珠富集具有 polyA 尾巴的真核 mRNA 后,用超声波把 mRNA 打断。以片段化的 mRNA 为模版,随机寡核苷酸为引物,在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 第一条链,随后用 RNaseH 降解 RNA 链,并在 DNA polymerase I 体系下,以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第二条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复、加 A 尾并连接测序接头,用 AMPure XP beads 筛选 200 bp 左右的 cDNA,进行 PCR 扩增并再次使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物,最终获得文库,在 IlluminaHiSeq[™] 4000 平台上,由 Gene Denovo Biotechnology 公司(广州,

中国)进行测序。

1.6 差异表达基因验证和功能富集

为了验证转录组测序结果,随机选择 6 个差异表达的基因($|\log_2(\text{FC})| > 1$)进行实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)分析。使用与转录组测序同批次的 RNA 反转录获得相应的 cDNA。 β -actin 作为 mRNA 的内参基因使用。扩增程序: 95°C 预变性 3 min, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 30 s,共 40 个循环。反应结束后,对 PCR 产物进行熔解曲线检测,以验证扩增产物的特异性。每次做 3 个样品,每个样品重复检测 3 次。基于转录组测序结果,进行 KEGG 功能富集分析,其中 $P < 0.05$ 可认为 KEGG 被差异基因显著富集。

2 结果

2.1 *RseB* 缺失影响溶藻弧菌感染花鲈的致死能力

用 *RseB* 缺失溶藻弧菌 $\Delta RseB$ 和野生菌株 WT 对花鲈进行注射感染,如表 2 所示,野生菌株和 $\Delta RseB$ 的 LD_{50} 分别为 2.013×10^5 和 5.526×10^5 cfu/mL,与野生菌株相比, $\Delta RseB$ 缺失菌株 LD_{50} 提高至 2.75 倍,即致死能力下降了 63.6%。

表 2 *RseB* 缺失菌株和野生溶藻弧菌感染花鲈的 LD_{50}

Tab. 2 The LD_{50} of *L. maculatus* after the infection of $\Delta RseB$ and wild strains of *V. alginolyticus* respectively

感染组别 Group	感染浓度 Infection concentration/ (cfu/mL)	实验花鲈数 Total number of seabass/尾	死亡花鲈数 Number of dead seabass/尾	死亡率 Mortality/%	50% 致死浓度 LD_{50} /(cfu/mL)
野生菌株 WT	1.00×10^8	10	10	100	2.013×10^5
	1.00×10^7	10	8	80	
	1.00×10^6	10	6	60	
	1.00×10^5	10	5	50	
	1.00×10^4	10	2	20	
	1.00×10^3	10	1	10	
<i>RseB</i> 缺失 $\Delta RseB$	1.00×10^8	10	10	100	5.526×10^5
	1.00×10^7	10	6	60	
	1.00×10^6	10	5	50	
	1.00×10^5	10	4	40	
	1.00×10^4	10	2	20	
	1.00×10^3	10	2	20	
对照组 Control group	0	10	1	10	

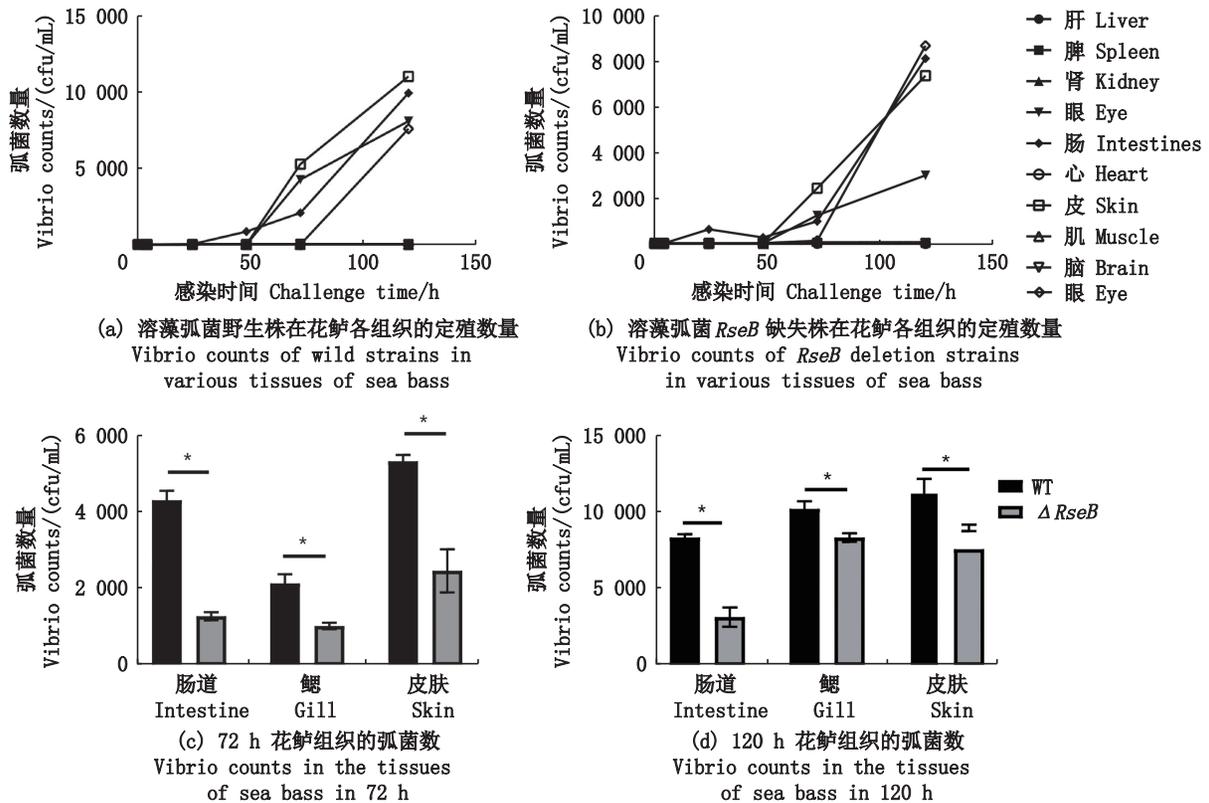
2.2 *RseB* 缺失影响溶藻弧菌在花鲈体内的定殖能力

感染溶藻弧菌之后,花鲈出现体表溃烂,鳃丝

充血,眼睛充血或发白,脾脏肿大和肠道水肿等现象。分别在感染的花鲈肝脏、脾脏、头肾、肠道、鳃、心脏、皮肤、肌肉、脑和眼睛中分离弧菌,经

PCR鉴定,溶藻弧菌野生株在感染后24 h,在花鲈鳃和肠道都能检测到少量存在, $\Delta RseB$ 缺失菌株感染24 h后,仅在花鲈鳃检测到。随着感染时间的延长,花鲈的皮肤、肠道和眼睛都能检测到弧菌,且在48 h弧菌数开始大量增加(图1)。溶藻弧菌

主要在花鲈鳃、肠道和皮肤被检测到,在感染72 h和120 h后尤为明显。对比野生株, $\Delta RseB$ 缺失菌株在各组织被检测到的弧菌数较少,定殖能力较野生株更弱。 $\Delta RseB$ 缺失菌株与野生株两个样本的均值呈现显著差异($P<0.05$),见图1。



柱状图上方含“*”代表差异显著($P<0.05$)。

“*” at the top of the bar chart indicate extremely significant difference ($P<0.05$).

图1 溶藻弧菌在花鲈体内的定殖能力

Fig. 1 Colonization ability of *V. alginolyticus* in *L. maculatus*

2.3 *RseB* 缺失降低溶藻弧菌对花鲈肠道和鳃的损伤

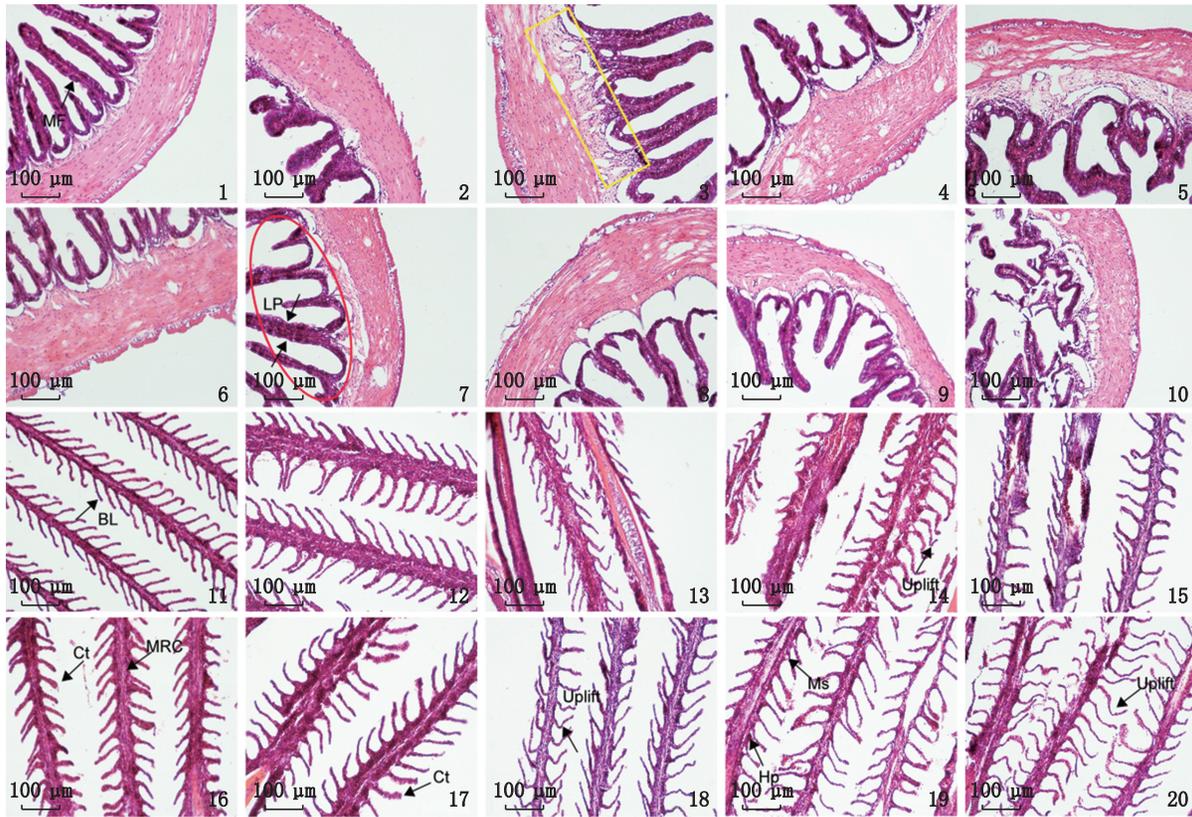
花鲈受到溶藻弧菌感染后,肠道结构受到损伤,肌肉层和黏膜层下层以及黏膜层分离,黏膜层的绒毛上皮细胞以及肌肉层的细胞出现空泡化。观察4、8、12、24和48 h这5个时间点的病理切片,发现随着感染时间的延长,肠道损伤程度不断加重且愈加明显,黏膜层的绒毛上皮细胞以及肌肉层的细胞空泡化程度加重,肠道的结构完整性也被严重破坏。相对于野生菌株, $\Delta RseB$ 菌株感染的花鲈肠道受损程度较轻(图版)。

溶藻弧菌感染后花鲈鳃组织显微结构同样发生了明显变化。感染4 h后鳃组织结构仍比较完整,鳃丝两侧鳃小片排列整齐,形状良好,线粒体丰富细胞聚集在鳃小片基部,随着感染时间的

延长,血细胞排列有序,鳃小片结构逐渐卷曲,且鳃小片末端发生肿胀,鳃弓的结构松散,鳃小片断裂,鳃细胞脱落。感染后期鳃弓的结构完整性被严重破坏。相对于溶藻弧菌野生菌株, $\Delta RseB$ 菌株感染的花鲈鳃组织受损程度较轻(图版)。

2.4 *RseB* 缺失影响花鲈对溶藻弧菌感染的免疫响应模式

溶藻弧菌野生株与 $\Delta RseB$ 缺失菌株处理组比较,一共有5 312个差异表达基因(图2),包括1 443个显著上调的基因和3 869个显著下调的基因。而与免疫相关的基因共有236个,其中包括了122个显著上调的免疫基因和114个显著下调的免疫基因。随机挑选6个差异表达的基因,通过实时荧光定量验证,发现与转录组测序RNA-seq的基因表达量结果趋势相同(图2)。



1-5. 4、8、12、24、48 h的花鲈肠道(WT组),黄色区域是黏膜下层,肠绒毛(MF);6-10. 4、8、12、24、48 h的花鲈肠道($\Delta RseB$ 组),红色区域是黏膜层,肠绒毛固有层(LP);11-15. 4、8、12、24、48 h的花鲈鳃组织(WT组),鳃小片(BL),鳃小片顶部棒状(Ct),抬升(Uplift);16-20. 4、8、12、24、48 h的花鲈鳃组织($\Delta RseB$ 组),线粒体丰富细胞(MRC),鳃小片(BL),鳃小片顶部棒状(Ct),线粒体丰富细胞肿胀(Ms),增生(Hp),抬升(Uplift)。

1-5. The intestinal tract of *L. maculatus* at 4, 8, 12, 24 and 48 h (WT group), the yellow area is the submucosa, intestinal villus (MF); 6-10. The intestinal tract of *L. maculatus* at 4, 8, 12, 24 and 48 h ($\Delta RseB$ group), the red area is the mucosa, intestinal villus lamina propria (LP); 11-15. The gill of *L. maculatus* at 4, 8, 12, 24 and 48 h (WT group), gill lamellae (BL), rod-shaped top of gill lamellae (Ct), Uplift (Uplift); 16-20. The gill of *L. maculatus* at 4, 8, 12, 24 and 48 h ($\Delta RseB$ group), mitochondrial-rich cells (MRC), gill lamellae (BL), rod-shaped top of gill lamellae (Ct), mitochondrial-rich cell swelling (Ms), hyperplasia (Hp), Uplift (Uplift).

图版 感染溶藻弧菌不同时段的花鲈肠道和鳃组织显微结构

Plate Structure of intestine and gill of *L. maculatus* at different time point after the infection of *V. alginolyticus*

为了进一步探究花鲈对 *RseB* 基因缺失溶藻弧菌感染的免疫响应,对野生株和 $\Delta RseB$ 菌株组与免疫相关的差异基因进行了 KEGG 功能富集分析,与免疫相关的差异表达基因显著富集到 127 个信号通路中,其中一些下调的基因如 *jun*、*tnf*、*agrp* 富集到 Th1 和 Th2 细胞分化、B 细胞受体信号通路、T 细胞受体信号通路和 NOD-like 受体信号通路等免疫通路;显著变化的细胞凋亡相关的通路有细胞凋亡、PI3K-Akt 信号通路、FoxO 信号通路和 JAK-STAT 信号通路等,如基因 *ctsl*、*tnf*、*cst*、*bcl4* 下调,*pik3r1*、*gadd45a* 上调;显著富集到与炎症相关的 NF-kappa B 信号通路的 *nfkb1* 上调(图 2)。

3 讨论

弧菌病是水产养殖过程中危害性极高的

病害之一,其中,溶藻弧菌引发的弧菌病是目前海水鱼养殖中常见的病害^[12]。虽然已有一些关于溶藻弧菌的致病机制报道^[4-6],但感染鱼类的致病机制尚未完全清楚。在本研究中,分别利用溶藻弧菌野生株和 *RseB* 缺失菌株感染花鲈,对不同时间段的肝脏、脾脏、头肾、肠道、鳃、心脏、皮肤、肌肉、脑和眼睛进行了细菌定殖能力评估以及对肠道和鳃进行组织切片,比较溶藻弧菌野生株和 *RseB* 缺失菌株对花鲈组织的损伤程度;同时选取野生株和 *RseB* 缺失菌株感染 12 h 后的花鲈头肾混合样品做转录组测序,探究了花鲈对溶藻弧菌 *RseB* 缺失菌株感染引起的免疫响应,探索 *RseB* 缺失菌株作为花鲈溶藻弧菌病减毒活疫苗的可能性。

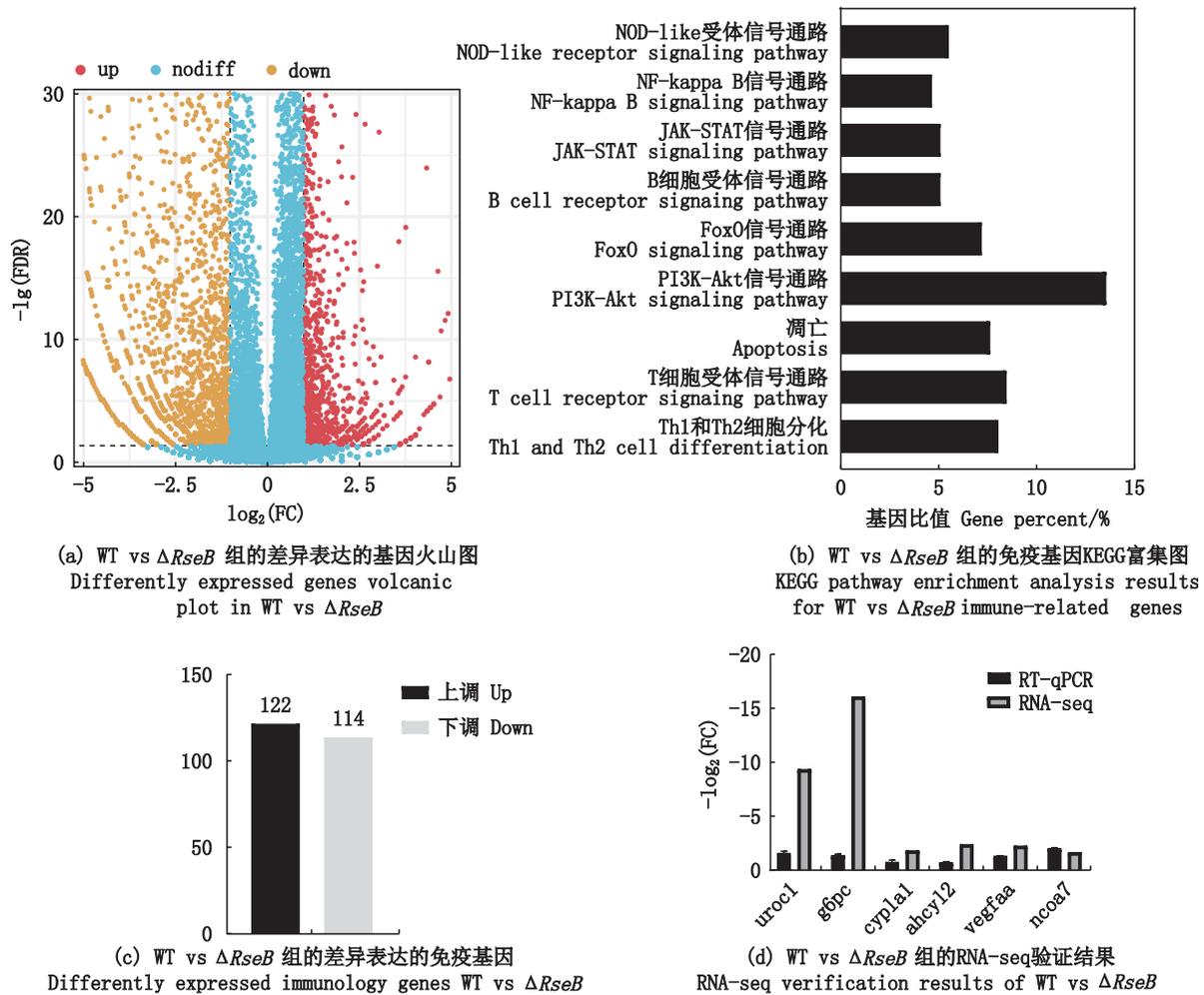


图2 溶藻弧菌野生菌株和 $\Delta RseB$ 菌株感染花鲈头肾转录组差异分析

Fig. 2 Comparative transcriptome analysis of head kidney of *L. maculatus* after challenge with wild and $\Delta RseB$ strains of *V. alginolyticus*

细菌包膜是包裹细胞的周围一层脂多糖与肽聚糖复合物。大部分病原微生物的包膜都以其可塑性而闻名:即通过改变其自身包膜的蛋白质、脂类、碳水化合物等成分含量以适应不同的环境^[13-14]。细菌一般是通过 sigmaE 因子激活包膜应激反应去感知和调节细菌包膜中错误折叠蛋白质来抵御机械损伤、抗生素或者免疫系统的侵害^[15], *RseB* 参与到抗 sigmaE 因子调控的通路当中^[8]。 *RseB* 已被证明与细菌的毒力有关,例如创伤弧菌 *RseB* 缺失株在小鼠中验证发现毒力减弱^[16]; 哈维氏弧菌 *RseB* 基因处引入 *rpoE* 操纵子的敲除株在绵羊血琼脂中表现出低溶血活性,并且在南美白对虾中表现出毒力减弱^[17]; 革兰氏阴性菌会通过细菌毒力中起关键作用的应激反应途径对包膜中错误折叠的蛋白质作出反应,而错误折叠的外膜蛋白(OMPs)通常被依赖于 *RseB*

的 sigmaE 途径识别^[18]。理论上,敲除溶藻弧菌 *RseB* 基因可以降低其在宿主的免疫反应。在实际实验中,我们分别以半致死浓度使用野生株和 *RseB* 缺失菌株进行感染实验,这两个实验组中的花鲈均出现了弧菌病典型的病症^[19-20],如,皮肤脱色、鳃和肝脏发白、出血、角膜混浊、皮肤溃疡、内脏脆弱、肠道肿胀、腹腔积液和坏死性肠炎,这在一定程度上说明了 *RseB* 缺失菌株可以引起花鲈急性免疫反应。相比野生株, *RseB* 敲除株的 LD₅₀ 提高至 2.75 倍且定殖能力下降,但在定殖路线上两个实验组只在初期有细微的差异,这可能在一定程度上可以解释为 *RseB* 缺失菌株在某些免疫组织上更容易被宿主免疫系统清理。在侵入宿主能力方面, *RseB* 基因可能只起到一定的作用,因为图 1 结果显示在 120 h 内两组的定殖路线均无差异。另外,从组织切片结果来看,两个实验

组的肠道显微结构损伤程度并没有明显差异,然而从鳃组织切片结果来看,RseB缺失菌株对鳃组织损伤程度明显低于野生株。综合以上结果来看,RseB缺失菌株对花鲈的半致死浓度LD₅₀相对野生株降低了,且对花鲈鳃组织的损伤明显减弱,表明其毒力明显减弱。

免疫系统可以利用自噬来监测入侵病原体特异性特征,以启动先天免疫和适应性免疫^[21]。本研究将RseB敲除缺失溶藻弧菌注射到花鲈体内能引起局部、轻微的弧菌病症状,同时亦能诱导其形成特异性免疫。头肾是硬骨鱼类的重要免疫器官^[22],用溶藻弧菌野生株以及RseB缺失菌株分别感染花鲈后,对12 h的花鲈头肾组织进行转录组测序,并对筛选出来与免疫相关的基因进行了功能富集分析,发现RseB基因缺失溶藻弧菌感染花鲈后,负责启动细胞凋亡相关的*ctsl*、*tnf*、*cst*、*bcl4*等基因表达量显著下调以减少细胞凋亡^[23-26],*pik3rl*以及*gadd45a*基因表达量显著上调促进细胞抗氧化与DNA修复^[27-28];这些基因通过改变表达量介导凋亡、PI3K-Akt信号通路、FoxO信号通路和JAK-STAT等信号通路调控细胞凋亡。同时,*jun*、*tnf*、*agr*等调控体液免疫以及细胞免疫的基因显著富集到Th1和Th2细胞分化、B细胞受体信号通路、T细胞受体信号通路和NOD-like受体信号通路等通路中,降低机体免疫原性^[29-31]。另外,NF-kappa B信号通路中的*nfb1*基因显著上调,调控炎症的发生^[32]。这些免疫基因表达量的变化以及通路开启侧面说明了溶藻弧菌在敲除RseB基因后毒力在一定程度上降低。

综上所述,RseB缺失溶藻弧菌感染花鲈的能力,包括定殖能力、对组织的损伤、致死率等相比野生菌均有一定的下降,此外,转录组分析表明,RseB缺失溶藻弧菌一定程度上保留了野生型溶藻弧菌诱发花鲈产生特异性免疫反应的能力,说明RseB缺失菌株有望在不引起宿主产生明显的感染迹象或死亡条件下引起宿主产生免疫反应。

参考文献:

- [1] CARLI A, PANE L, CASARETO L, et al. Occurrence of *Vibrio alginolyticus* in Ligurian coast rock pools (Tyrrhenian Sea, Italy) and its association with the copepod *Tigriopus fulvus* (Fisher 1860) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(6): 1960-1962.
- [2] YAN Q P, CHEN Q, MA S, et al. Characteristics of adherence of pathogenic *Vibrio alginolyticus* to the intestinal mucus of large yellow croaker (*Pseudosciaea crocea*) [J]. Aquaculture, 2007, 269 (1/4): 21-30.
- [3] 陈寅儿, 金珊, 王国良. 鲈鱼溶藻弧菌病的血液生理生化指标研究[J]. 台湾海峡, 2005, 24(1): 104-108. CHEN Y E, JIN S, WANG G L. Study on blood physiological and biochemical indices of *Vibrio alginolyticus* disease of *Lateolabrax japonicus* [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2005, 24(1): 104-108.
- [4] 苏雯晓, 邓益琴, 臧树军, 等. *cbpD*基因对溶藻弧菌毒力及相关生物学特性的影响[J]. 南方水产科学, 2022, 18(5): 81-90. SU W X, DENG Y Q, ZANG S J, et al. Effects of *cbpD* gene on virulence and related biological characteristics of *Vibrio alginolyticus* [J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(5): 81-90.
- [5] ZHAO Z, LIU J X, DENG Y Q, et al. The *Vibrio alginolyticus* T3SS effectors, Val1686 and Val1680, induce cell rounding, apoptosis and lysis of fish epithelial cells [J]. Virulence, 2018, 9(1): 318-330.
- [6] HUANG L X, GUO L N, XU X J, et al. The role of *rpoS* in the regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence and the response to diverse stresses [J]. Journal of Fish Diseases, 2019, 42(5): 703-712.
- [7] AHUJA N, KORIKIN D, CHABA R, et al. Analyzing the interaction of RseA and RseB, the two negative regulators of the σ^E envelope stress response, using a combined bioinformatic and experimental strategy [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(8): 5403-5413.
- [8] CHABA R, ALBA B M, GUO M S, et al. Signal integration by DegS and RseB governs the σ^E -mediated envelope stress response in *Escherichia coli* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(5): 2106-2111.
- [9] 孟璐. 溶藻弧菌RseAB基因缺失对致病性的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022. MENG L. Research on pathogenicity of RseAB gene in *Vibrio alginolyticus* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022.
- [10] 顾兵, 张政, 李玉萍, 等. 半数致死量及其计算方法概述[J]. 中国职业医学, 2009, 36(6): 507-508, 511. GU B, ZHANG Z, LI Y P, et al. Summary of median lethal dose and its calculation methods [J]. China Occupational Medicine, 2009, 36(6): 507-508, 511.
- [11] 胡存洁, 车金远, 黄旭雄, 等. *vah1*缺失鳃弧菌株构建及致病性评估[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(3): 481-490. HU C J, CHE J Y, HUANG X X, et al. Construction and pathogenicity evaluation of *Vibrio anguillarum* strain with

- vah1* deletion [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(3): 481-490.
- [12] WANG Y Y, WU Z L, CHEN H, et al. *Astragalus* polysaccharides protect against inactivated *Vibrio alginolyticus*-induced inflammatory injury in macrophages of large yellow croaker [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 131: 95-104.
- [13] SILHAVY T J, KAHNE D, WALKER S. The bacterial cell envelope [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010, 2(5): a000414.
- [14] SIEGEL S D, LIU J, TON-THATH. Biogenesis of the Gram-positive bacterial cell envelope [J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 34: 31-37.
- [15] RAIVIO T L, SILHAVY T J. The σ^E and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses [J]. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2(2): 159-165.
- [16] BROWNR N, GULIG P A. Roles of RseB, σ^E , and DegP in virulence and phase variation of colony morphotype of *Vibrio vulnificus* [J]. Infection and Immunity, 2009, 77(9): 3768-3781.
- [17] RATTANAMA P, THOMPSON J R, KONGKERD N, et al. Sigma E regulators control hemolytic activity and virulence in a shrimp pathogenic *Vibrio harveyi* [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32523.
- [18] KULP A, KUEHN M J. Recognition of β -strand motifs by RseB required for σ^E activity in *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(22): 6179-6186.
- [19] ZORRILLA I, CHABRILLÓN M, ARIJO S, et al. Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain [J]. Aquaculture, 2003, 218(1/4): 11-20.
- [20] GAUGER E, SMOLOWITZ R, UHLINGER K, et al. *Vibrio harveyi* and other bacterial pathogens in cultured summer flounder, *Paralichthys dentatus* [J]. Aquaculture, 2006, 260(1/4): 10-20.
- [21] MOHD-ARIS A, SAAD M Z, DAUD H M, et al. *Vibrio harveyi* protease deletion mutant as a live attenuated vaccine candidate against vibriosis and transcriptome profiling following vaccination for *Epinephelus fuscoguttatus* [J]. Aquaculture International, 2019, 27(1): 125-140.
- [22] MORÓN P, MONTERO D, TORRECILLAS S, et al. *In vitro* study of the serum effect on the supplementation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophage culture medium: effect on the immune response [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 91: 409-410.
- [23] LI L Y, GAO L Y, SONG Y Z, et al. Activated cathepsin L is associated with the switch from autophagy to apoptotic death of SH-SY5Y cells exposed to 6-hydroxydopamine [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 470(3): 579-585.
- [24] KONTCHOU C W, TZIVELEKIDIS T, GENTLE I E, et al. Infection of epithelial cells with *Chlamydia trachomatis* inhibits TNF-induced apoptosis at the level of receptor internalization while leaving non-apoptotic TNF-signalling intact [J]. Cellular Microbiology, 2016, 18(11): 1583-1595.
- [25] GENG L, WANG X T, YU J, et al. Antagonism of cortistatin against cyclosporine-induced apoptosis in rat myocardial cells and its effect on myocardial apoptosis gene expression [J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(10): 3207-3213.
- [26] TAO S F, GU J C, WANG Q, et al. Translational control of Bcl-2 promotes apoptosis of gastric carcinoma cells [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 12.
- [27] HUANG J F, SHI C, GAO Y P, et al. Heterozygous depletion of *pik3r1* improves growth and feed conversion efficiency in Gibel carp (*Carassius gibelio*) [J]. Aquaculture, 2021, 545: 737207.
- [28] KIM Y J, KIM H J, KIM H L, et al. A protective mechanism of visible red light in normal human dermal fibroblasts: enhancement of GADD45A-mediated DNA repair activity [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2017, 137(2): 466-474.
- [29] LI B. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation [J]. The EMBO Journal, 1999, 18(2): 420-432.
- [30] MEHTA A K, GRACIAS D T, CROFT M. TNF activity and T cells [J]. Cytokine, 2018, 101: 14-18.
- [31] SHAINER I, BUCHSHTAB A, HAWKINS T A, et al. Novel hypophysiotropic AgRP2 neurons and pineal cells revealed by BAC transgenesis in Zebrafish [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44777.
- [32] CARTWRIGHT T, PERKINS N D, WILSON C L. NFKB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer [J]. The FEBS Journal, 2016, 283(10): 1812-1822.

RseB* deletion affects the ability of *Vibrio alginolyticus* to infect *Lateolabrax maculatus

ZHOU Jiayu^{1,2}, JIANG Wei^{1,2}, WANG Yuguo^{1,2}, CHEN Xiaohui³, LUO Tuyan⁴, BAO Baolong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Fujian Minwell Industrial Co., Ltd, Fuding 355200, Fujian, China; 4. Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-Products, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China)

Abstract: In order to study the effect of *RseB* gene deletion on the ability of *Vibrio alginolyticus* to infect the *Lateolabrax maculatus*, the LD₅₀, colonization ability and immune response of the *L. maculatus* after infection were evaluated. The results showed that the LD₅₀ of *V. alginolyticus* was 2.013×10⁵ cfu/mL, and the LD₅₀ of *V. alginolyticus* with *RseB*-deletion was 5.526×10⁵ cfu/mL, and the virulence of *RseB*-deletion *V. alginolyticus* decreased by 63.6%. *V. alginolyticus* mainly colonized in the gill, intestine and skin of *L. maculatus*. Compared with *V. alginolyticus*, the degree of intestinal vacuolization and the damage of gill tissue were lower in *L. maculatus* after challenged with the *RseB*-deletion *V. alginolyticus*. Transcriptome sequencing was performed on the head kidney tissues of *L. maculatus* challenged by wild-type and *RseB*-deletion *V. alginolyticus*, respectively. A total of 236 immune-related differentially expressed genes were found, including 122 significantly up-regulated immune genes and 114 significantly down-regulated immune genes. Most of these genes were significantly enriched in specific immune pathways such as Th1 and Th2 cell differentiation, B cell receptor signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, and some genes were significantly enriched in apoptosis-related pathways and inflammation-related NF-kappa B signaling pathway. In summary, the results show that *RseB*-deletion *V. alginolyticus* can cause immune response of host cells and reduce virulence.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; *Lateolabrax maculatus*; *RseB*; pathogenicity; immune response