

基于转录组分析的蛙虹彩病毒减毒株对大口黑鲈的免疫调控机制

楚馨 陈静 高铭悦 蔺凌云 姚嘉赞 沈锦玉 潘晓艺

THE IMMUNEREGULATORY MECHANISMS OF AN ATTENUATED LMBV IN *MICROPTERUS SALMOIDES* BASED ON TRANSCRIPTOME ANALYSIS

CHU Xin, CHEN Jing, GAO Ming-Yue, LIN Ling-Yun, YAO Jia-Yun, SHEN Jin-Yu, PAN Xiao-Yi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2025.2024.0466>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

急性氨氮胁迫下大口黑鲈的肝脏转录组特征分析

LIVER TRANSCRIPTOME OF LARGEMOUTH BASS (*MICROPTERUS SALMOIDES*) UNDER ACUTE AMMONIA NITROGEN STRESS

水生生物学报. 2024, 48(5): 713–724 <https://doi.org/10.7541/2024.2023.0238>

大口黑鲈 amh 基因全长cDNA克隆、表达及多克隆抗体制备

MOLECULAR CLONING, EXPRESSION ANALYSIS AND POLYCLONAL ANTIBODY PREPARATION OF ANTI-MLLERIAN HORMONE (amh) GENE IN LARGEMOUTH BASS *MICROPTERUS SALMOIDES*

水生生物学报. 2023, 47(5): 775–785 <https://doi.org/10.7541/2022.2021.0343>

基于CRISPR/Cas13a系统建立大口黑鲈弹状病毒检测方法

A METHOD FOR DETECTION OF *MICROPTERUS SALMOIDES* RHABDOVIRUS BASED ON CRISPR/CAS13A SYSTEM

水生生物学报. 2024, 48(2): 283–291 <https://doi.org/10.7541/2023.2023.0199>

金钱鱼下丘脑转录组分析及其对雌激素在体注射的响应

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF HYPOTHALAMUS IN MALE AND FEMALE SPOTTED SCAT (*SCATOPHAGUS ARGUS*) AND DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN 17 β -ESTRADIOL INJECTED MALES

水生生物学报. 2023, 47(8): 1195–1210 <https://doi.org/10.7541/2023.2022.0286>

大口黑鲈鱼诺卡氏菌传代弱毒株特性及免疫效果评价

CHARACTERISTICS AND IMMUNOPROTECTIVE EFFECTS OF ATTENUATED *NOCARDIA SERIOLAE* FROM LARGEMOUTH BASS INDUCED BY CONTINUOUS PASSAGING

水生生物学报. 2024, 48(7): 1120–1129 <https://doi.org/10.7541/2024.2023.0399>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2025.2024.0466

CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0466

基于转录组分析的蛙虹彩病毒减毒株对大口黑鲈的免疫调控机制

楚馨^{1,2*} 陈静^{1*} 高铭悦^{1,3} 蔺凌云¹ 姚嘉赞¹ 沈锦玉^{1,2,3} 潘晓艺¹

(1. 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 湖州 313001;
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. 湖州师范学院生命科学学院, 湖州 313000)

摘要: 实验室通过连续传代致弱获得一株具有良好免疫保护效果的大口黑鲈蛙虹彩病毒减毒株(LMBV-ZJDSS-F110)。为评估该减毒株对鱼体的免疫作用, 采集免疫后1d、4d、7d及28d的肝、脾、头肾组织样本, 进行组织病理学和病毒载量分析, 结果发现该减毒株对鱼体组织的损伤较轻, 且病毒载量随时间推移在各组织中下降。此外, 为进一步探究该减毒株对大口黑鲈的免疫调控机制, 通过对头肾样本的转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq), 发现免疫早期(1d和4d)的4979和6891个差异基因主要富集于先天性免疫通路, 如细胞因子-细胞因子受体相互作用、胞质DNA感知及凋亡等通路; 免疫中后期(7d和28d)的1693和1758个差异基因则主要富集于适应性免疫通路, 如T细胞受体、B细胞受体、Fc epsilon RI信号及Th1/Th2细胞分化等通路。此外, 代谢通路中半胱氨酸和蛋氨酸代谢, 谷胱甘肽代谢通路主要在免疫前期富集, 糖酵解/糖异生代谢通路主要在免疫中后期富集。研究筛选IRF3、MX、TRIM25、NAMPT、DHX58、SRC、RSAD2、TMEM38和C4九个基因进行RT-qPCR验证。结果显示转录组测序具有可靠性。研究为大口黑鲈的免疫应答机制提供了新见解, 并为疫苗的进一步开发与应用奠定基础。

关键词: 组织病理; 转录组; 差异基因; 免疫反应; 大口黑鲈蛙虹彩病毒

中图分类号: S941.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2025)06-062507-14



大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)又称加州鲈, 原产自北美^[1], 自20世纪80年代引入中国以来, 已成为我国重要的淡水养殖鱼类^[2]。近年来大口黑鲈养殖产业的持续发展受到大口黑鲈蛙虹彩病毒病的严重制约^[3], 该病的病原为大口黑鲈蛙虹彩病毒(Largemouth bass ranavirus, LMBV), LMBV首次于1991年在美国佛罗里达州被分离^[4], 隶属于虹彩病毒科(Iridoviridae)蛙病毒属(*Ranavirus*)^[5], 是一种裸露或有囊膜的二十面体单分子线性双链DNA病毒。LMBV可通过水体、其他水生动物^[5]甚至带病饵料^[6]等多种途径传播。自从首次在广东佛山发现大口黑鲈感染LMBV以来^[7], 其他地区包括广东^[8,9]、湖北^[2]、浙江^[10]等地陆续都有发现, 影响范围不断

扩大, 此外, 研究发现LMBV的亚洲株具有更广泛的宿主范围, 涵盖鲤形目和鲈形目鱼类, 并存在感染其他鱼类的潜在风险^[11], 因此该病毒亟需得到关注和解决。

LMBV传播迅速, 目前尚未发现针对LMBV的特效药物^[3], 因此, 该疾病的早期诊断和预防显得尤为重要。近年来, 该疾病检测技术的不断进步^[12,13], 为及时响应疾病的发生提供了有力支持。除了诊断技术, 疫苗接种也是控制鱼类病毒性疾病的有效策略之一。目前, 针对虹彩病毒疫苗的研发多集中于肿大细胞病毒属的传染性脾肾坏死病毒(Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV)^[14], 而LMBV的研究相对较少^[3]。目前, 针对LMBV的

收稿日期: 2024-11-19; 修订日期: 2025-01-23

基金项目: 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(2024C02005); 湖州市公益性应用研究项目(2022GZ28); 浙江省科研院所专项(2025YSZX02和2024YSZX04)资助 [Supported by the Zhejiang Key Research and Development Project (2024C02005); Key Project Program of Huzhou City (2022GZ28); the Zhejiang Provincial Institute Special Project (2025YSZX02 and 2024YSZX04)]

作者简介: 楚馨, 硕士研究生; 主要从事水生动物病害研究。E-mail: zero0zero0@163.com 陈静, 助理研究员; 主要从事水生动物病害防控研究。E-mail: cjing24511@163.com *共同第一作者

通信作者: 潘晓艺, 研究员; E-mail: panxiaoyi@163.com

疫苗主要基于其主要衣壳蛋白(Major Capsid Protein, MCP)作为免疫抗原^[15]。近年来,虽然LMBV的灭活疫苗^[16],新型疫苗如DNA疫苗^[17,18]、亚单位疫苗^[19,20]和重组载体疫苗^[21]显示出较好的免疫保护率(Relative Percent Survival, RPS),但尚未获得商业化批准应用。此外,当前在对大口黑鲈蛙虹彩病毒疫苗免疫机制方面,多集中在疫苗研发后对鱼体的初步免疫效果验证^[19,22],但疫苗注射后宿主免疫机制的理解尚不充分,尤其是先天免疫和适应性免疫的相互作用等方面缺乏深入的研究。

在探讨大口黑鲈蛙虹彩病毒病的管理和预防策略时,理解宿主的免疫反应机制显得尤为关键。转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)是研究基因表达和互作机制的首选方法^[23]。在水产养殖中, RNA-seq在解析复杂的宿主-病原体相互作用中发挥了重要作用^[24]。已有研究利用转录组技术揭示了LMBV侵入后大口黑鲈的免疫应答影响,并鉴定出可能参与该病毒感染过程中鱼类免疫反应的关键基因^[25]。有研究对接种了灭活病毒性出血性败血症病毒(Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, VHSV)疫苗的大菱鲆肾脏组织进行RNA-seq分析^[23],揭示了RNA-seq在定位与先天免疫和适应性免疫相关的关键免疫信号通路激活方面发挥的重要作用,这些发现对于开发针对性的干预措施和理解水产养殖物种免疫的分子基础至关重要^[26]。然而,目前尚未有研究系统分析弱毒疫苗接种后大口黑鲈的全过程基因表达变化。

本实验室通过体外连续传代致弱的方法制备了大口黑鲈蛙虹彩病毒减毒株(LMBV-ZJDSS-F110),为进一步探究该疫苗对大口黑鲈的免疫作用,采集了免疫后1d、4d、7d和28d的样本并进行了组织病理学观察、病毒载量检测和转录组学分析。通过这些综合分析,我们期望能够揭示该减毒株对大口黑鲈免疫调控机制的影响,从而为宿主抵抗病毒病原体的免疫反应提供新的思路 and 科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

RNA store溶液、2×Flash SYBR MasterMix (Dye)、2×Flash Probe MasterMix (Dye; 北京康为世纪);核酸提取试剂盒(磁珠法; 洛阳爱森生物科技有限公司); TIANamp Bacteria DNA Kit试剂盒; 裂解液B; 4%多聚甲醛固定液(北京兰杰柯科技有限公司); RNAsimple Total RNA Kit试剂盒(北京天根生化科技有限公司); FastKing cDNA第一链合成试剂盒(北京天根生化科技有限公司); TRIzol试剂盒(美

国赛默飞世尔科技公司); FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit V2 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

1.2 实验动物与病毒

本研究所用大口黑鲈取自浙江省湖州市某水产养殖场,实验前经病毒检测和细菌分离确认无病原后,所有鱼置于循环水养殖系统暂养1周,随后挑选平均体重为(13.0±2.0) g的活力充沛的大口黑鲈360尾,随机分配到6个循环水桶中,每桶60尾,分别设置实验组和对照组,每组包含3个重复桶。每天定时投喂2次,水温控制在(26.5±0.5)℃。大口黑鲈蛙虹彩病毒弱毒株(LMBV-ZJDSS-F110)通过体外连续传代致弱获得^[27]。

1.3 免疫及样品采集

病毒滴度(TCID₅₀)通过Reed-Muench^[28]方法计算。在正式实验前,采用不同浓度的病毒液进行初步免疫实验。根据实验结果,选取能够兼顾安全性和免疫保护率的10^{8.0} TCID₅₀/mL作为最终免疫大口黑鲈的浓度。在正式实验中减毒株以10^{8.0} TCID₅₀/mL×0.1 mL的剂量免疫3组,每组60尾。同时设立腹腔注射等量0.65%无菌生理盐水的对照组3组。

1.4 样品采集

在1d、4d、7d和28d时,从每组中各随机抽取6尾鱼进行样本采集,包括肝脏、脾脏和头肾(图1A)。6尾鱼中的3尾鱼的肝脏、脾脏和头肾组织用4%多聚甲醛固定,用于组织学分析,其中同时取部分头肾组织浸泡于RNA store溶液中,用于转录组分析;其余3尾鱼的肝脏、脾脏和头肾组织在液氮中速冻后转移至-80℃进行长期保存,用于病毒载量检测。

1.5 病毒载量检测及组织病理学分析

将液氮速冻保存的样品取出后采用FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit V2试剂盒进行核酸提取,提取的DNA使用Nanodrop 2000测定其浓度和纯度,随后用LightCycler[®] 96系统对病毒载量进行qPCR检测^[12]。反应条件: 95℃预变性15min; 接着95℃变性3s, 60℃退火/延伸20s, 共40个循环,每个循环末检测荧光值。通过对比Ct值与标准曲线,计算病毒载量,结果以拷贝数/微克DNA (copies/μg DNA)表示。大口黑鲈的组织样本由杭州浩克生物科技有限公司(杭州)进行组织包埋切片和HE染色后,中性树胶封片,进行显微镜观察。

1.6 总RNA提取、文库构建和转录组测序

从大口黑鲈的头肾组织中使用TRIzol法提取总RNA。确认RNA样品质量后,使用Oligo (dT)磁珠富集mRNA。富集的mRNA随后被片段化并通过逆转录合成cDNA,这些cDNA样品用于构建RNA-Seq文库,使用Illumina HiSeq 4000平台进行测序。

此次文库构建和Illumina测序均由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.7 差异表达基因的筛选与功能富集分析

原始测序数据经过严格的质量控制后, 使用HISAT2^[29]比对到大口黑鲈参考基因组(GCF_014851395.1)。基因和转录本的表达水平通过RSEM (<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/323>)进行定量。每个样本的比对读数用StringTie (v1.3.1) 组装。差异表达基因通过DESeq2 (<http://bioconductor.org/packages/stats/bioc/DESeq2/>)进行分析。用Python ‘scipy’ 软件包(<https://scipy.org/install/>)进行KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)富集通路分析。富集分析的显著性通过Fisher精确检验计算, 并使用Benjamini-Hochberg (BH)方法校正多重假设检验^[30]。校正后 P 值<0.05的通路则被认为是病毒感染过程中显著富集的通路。利用在线网站STRING (<https://doi.org/string-db.org>), 用Cytoscape (V3.9.1)对筛选的DEGs进行可视化分析, 构建PPI网络, 并使用Cyto Hubba plugin筛选网络中的枢纽基因。利用RSEM软件对测序数据进行分析, 计算每个基因的表达量。将得到的表达量转换为TPM值, 随后使用这些标准化的TPM值进行热图分析, 以直观展示不同样本和基因之间的表达差异。

1.8 实时荧光定量PCR (RT-qPCR)验证

为了确保RNA-seq结果的准确性, 使用RT-qPCR验证了部分候选基因的mRNA水平。这些基因的特异性引物通过Prime Premier 5设计, 并通过FastKing cDNA第一链合成试剂盒从RNA样品合成cDNA。RT-qPCR实验使用2×Flash SYBR Master-Mix试剂盒在LightCycler[®] 96仪器上进行。热循环条件: 预变性95℃2min; 95℃变性5s, 60℃退火/延

伸15s, 40个循环。大口黑鲈的 β -actin基因用作内参基因, 目标基因的相对表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[31]。引物信息见表1。

2 结果

2.1 LMBV-ZJDSS-F110减毒株的病毒载量

弱毒株感染大口黑鲈后, 不同时间点组织病毒载量检测结果显示, 在1d和4d时, 3种组织中的病毒载量都较高。7d时, 脾病毒载量升高, 而肝和头肾的病毒载量略有下降。28d时, 脾中的病毒载量保持较高水平, 而肝和头肾的病毒载量显著下降。脾中病毒载量在不同时间点均高于肝和头肾(图1B)。

2.2 不同时间点组织病理学分析

为了从组织水平(病理变化)观察减毒株注射后不同时间对机体的影响, 在免疫后1d、4d、7d和28d对样本在40倍放大镜下进行了组织病理学分析(图2)。结果显示, 在肝脏组织中, 对照组的肝细胞结构完整, 肝板排列有序且富含脂质。减毒株免疫后1d, 肝组织出现肝细胞排列紊乱、肝细胞变性现象, 到4d, 坏死现象进一步加重, 但在7d时, 肝细胞结构显示出一定的恢复趋势, 至28d时接近对照组水平。在脾脏和头肾组织中, 对照组表现出正常的细胞形态和完整的组织结构。脾脏组织在免疫后1d起, 脾脏中出现凝固性坏死(星号所示), 并伴有炎症细胞浸润(箭头所示), 至28d, 脾脏结构逐步恢复, 接近对照组水平。在头肾组织中, 免疫后1d和4d出现细胞变性肿大(箭头所示)和细胞排列松散的现象, 到7d时, 细胞肿大有所缓解, 至28d时, 其结构接近对照组水平。总体而言, 肝脏、脾脏和头肾的组织学观察表明这些组织在免疫接种后最初出现变性和坏死, 但从7d开始有明显恢复迹象, 至28d时接

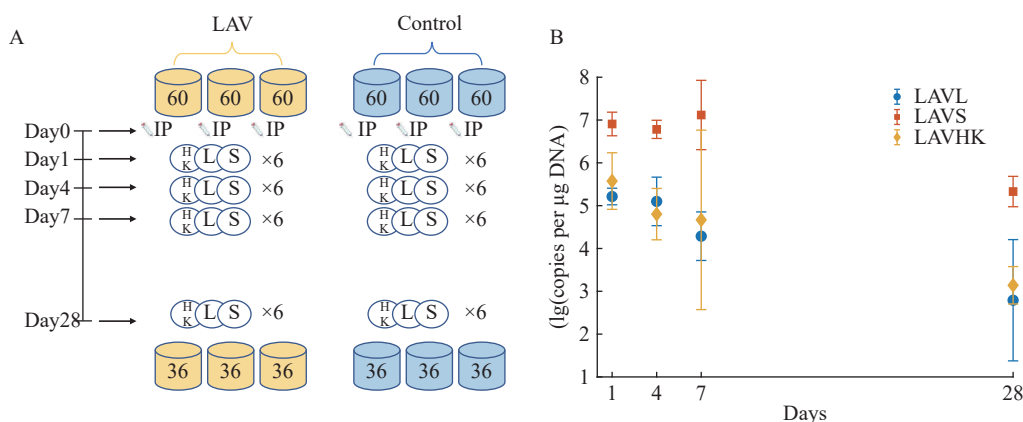


图1 实验设计示意图(A)和免疫不同天数后不同组织中的病毒载量(B)

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental design (A) and viral loads in different tissues at various days post-immunization (B)

HK表示头肾; L表示肝脏; S表示脾脏; IP表示腹腔注射

HK. head kidney; L. liver; S. spleen; IP. intraperitoneal injection

近对照组水平(图 2)。

2.3 RNA测序和差异表达基因分析

为进一步深入了解疫苗免疫后鱼体内免疫基因的表达情况,本研究采集了免疫组和对照组的大

表 1 RT-qPCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for RT-qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'—3')	产物 Product (bp)
LMBV-F	ACTGGCCACCACCTCTACTC	102 ^[14]
LMBV-R	AGACACGTTGATGCTTGCGT	
LMBV-P	ACGCCCTGAGCCTCAACGATCC	145
DHX58-F	GCACTATGTCAACGTCAATCCTG	
DHX58-R	CTCAAATCCCCATTCCTTGTTGC	110
C4-F	ATGACCTTGTTGCTCATACAGT	
C4-R	GCCAAGACTCCTTTTCCACTTTG	145
IRF3-F	TATTGAAGGGAAAGACTGCCCTC	
IRF3-R	AGCCATATTCTTCAGCAACTCCA	97
MX-F	ACACGACAGACAAAGACCCATAA	
MX-R	ATGATTTGAGGTGCAACATGAGC	154
NAMPT-F	CCTGTAAACACATCTGGGGAGAA	
NAMPT-R	TTCATCGAACAGCCAAAACAGTC	86
RSAD2-F	GACAGTTTGTATGAGGCAACCAA	
RSAD2-R	TTGCGAATCTTGTGAAGGTTGTC	117
SRC-F	TGGCAATAAAGACTCTGAAGCCT	
SRC-R	CGGATACCACAGCATAGAGTTGA	88
TMEM38-F	GCTCTTAATTTGGGCGAAT	
TMEM38-R	GGATGGACACGATGTAGTA	79
TRIM25-F	CCACTCATTTGTGTCCCTTTG	
TRIM25-R	CAAAGAAATGGAGGAGCCACTTG	

口黑鲈头肾样品,共构建了24个cDNA文库,测序结果显示, Q30碱基百分比均在95.1%以上,且不同样品测序数据与参考基因组的MAP率在82.1%—96.86% (表 2)。

通过主成分分析(PCA)探究了免疫组和对照组在不同时间点的基因表达差异,结果显示PC1解释了50.84%的总变异,而PC2解释了14.04%的总变异。免疫组在各个时间点的样本在PCA图上呈现明显分离的趋势,特别是1d、4d与7d、28d之间的差异较大,表明鱼体免疫后的早期和中后期有着明显差异。对照组在各时间点间的数据点分布相对较为集中,变化较小。在1d和4d免疫组与对照组相比,二者在PC1和PC2上的分布存在明显分离,而7d和28d和对照相比分离程度则相对较小(图 3A)。

利用差异表达分析,本研究发现了在不同时间点免疫组和对照组之间的差异。1d有4979个基因(2617个上调,2362个下调),4d有6891个基因(2666个上调,4225个下调),7d有1693个基因(635个上调,1058个下调),28d有1758个基因(828个上调,930个下调),其中1d和4d的差异基因数量高于7d和28d,这些结果展示了宿主的动态免疫响应(图 3B)。

2.4 差异表达基因的功能富集分析

为了深入分析参与免疫反应的关键基因及其调控通路,本文对免疫后1d、4d、7d和28d与对照组的差异基因进行了KEGG富集分析。如图 4所示,在免疫早期(1d和4d),先天免疫系统迅速响应,激活了多个与先天性免疫相关的通路。这些通路

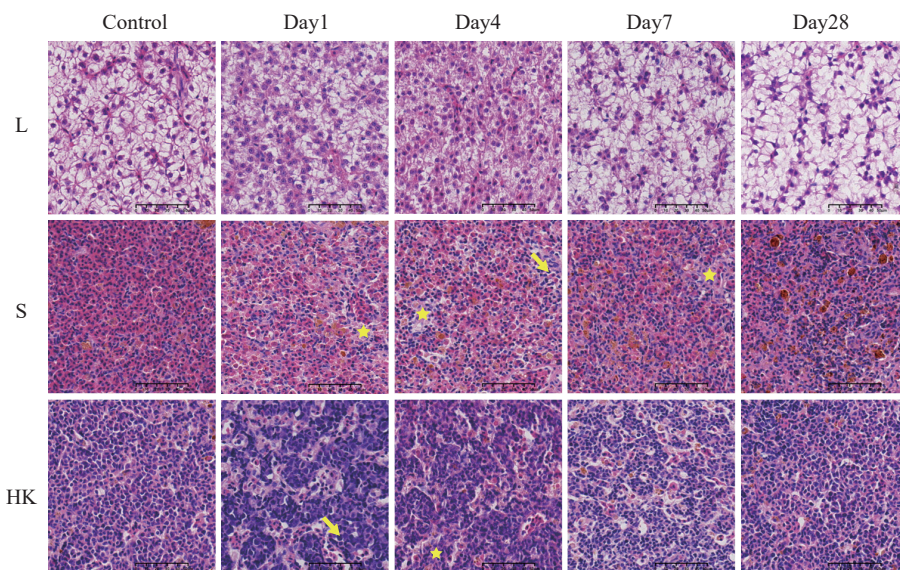


图 2 LAV免疫组与对照组的肝脏、脾脏和头肾的组织水平形态

Fig. 2 Histological morphologies of the liver, spleen, and head kidney of LAV groups, contrasted with the control group

箭头指示炎性细胞浸润区域,星号表示坏死部位;HK表示头肾;L表示肝脏;S表示脾脏;40×

Arrows highlight areas infiltrated by inflammatory cells, while asterisks denote sites of necrosis; HK. head kidney; L. liver; S. spleen; 40×

主要涉及炎症反应、细胞因子信号传导及免疫细胞的早期激活,具体包括细胞因子——细胞因子受体相互作用(Cytokine-cytokine receptor interaction)、胞质DNA感知通路(Cytosolic DNA-sensing pathway)、MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)。此外,代谢相关通路如谷胱甘肽代谢通路(Glutathione metabolism)被显著激活。同时,本文观察到与凋亡相关的通路(Human disease中包含)在免疫早期也显著

表 2 转录组测序数据结果

Tab. 2 RNA sequencing data

Sample	Clean reads	Clean bases	Q30 (%)	GC content (%)	Total mapped (%)	Multiple mapped (%)	Uniquely mapped (%)
d1_C1K	40542152	6.09E+09	96.69	48.86	96.80	9.50	87.29
d1_C2K	40609896	6.10E+09	96.65	48.35	96.71	9.20	87.52
d1_C3K	41011520	6.11E+09	96.16	49.07	96.86	9.20	87.65
d4_C1K	41126730	6.15E+09	96.04	48.24	96.50	7.52	88.99
d4_C2K	41888404	6.26E+09	96.03	47.66	96.18	8.07	88.11
d4_C3K	45719622	6.84E+09	96.07	48.27	95.63	9.08	86.56
d7_C1K	44564268	6.64E+09	96.21	51.57	96.59	10.09	86.50
d7_C2K	46646014	6.97E+09	96.17	47.77	96.11	8.29	87.81
d7_C3K	46287830	6.91E+09	96.24	48.93	96.37	8.86	87.50
d28_C1K	48486128	7.22E+09	96.06	46.86	82.10	6.46	75.64
d28_C2K	53547874	7.99E+09	96.16	47.57	89.27	6.99	82.27
d28_C3K	49556836	7.40E+09	96.22	46.73	88.16	7.06	81.10
d1_LAV 1K	54203692	8.03E+09	95.22	49.04	96.47	10.66	85.80
d1_LAV 2K	48716648	7.25E+09	95.18	49.83	96.17	13.65	82.52
d1_LAV 3K	55620178	8.19E+09	95.41	48.44	95.64	9.95	85.69
d4_LAV 1K	44371682	6.56E+09	95.21	50.63	96.15	8.94	87.21
d4_LAV 2K	49328124	7.25E+09	95.23	50.68	96.38	9.38	87.00
d4_LAV 3K	48250552	7.08E+09	95.24	50.60	96.11	8.81	87.30
d7_LAV 1K	42810504	6.33E+09	95.16	50.04	95.85	9.33	86.52
d7_LAV 2K	46816196	6.85E+09	95.31	49.41	95.71	9.06	86.65
d7_LAV 3K	53979630	7.91E+09	95.31	50.37	96.02	9.48	86.54
d28_LAV1K	43832762	6.45E+09	95.19	49.89	96.33	8.70	87.63
d28_LAV2K	53676150	7.99E+09	95.18	51.23	96.68	8.38	88.30
d28_LAV3K	52061430	7.69E+09	95.10	50.02	96.22	9.13	87.09

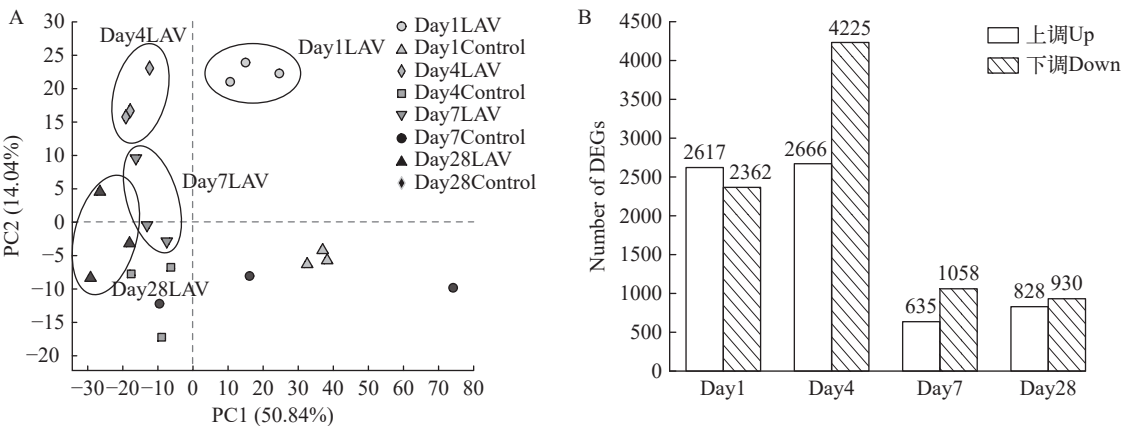


图 3 大口黑鲈免疫后头肾组织不同时间点的转录组分析

Fig. 3 RNA sequencing of head kidney tissues at different time points after immunization of largemouth bass

A. 不同样本组RNA-Seq数据的PCA分析; B. 免疫组与对照组在不同时间点的差异表达基因数量柱状图

A. PCA of the RNA-Seq data from different sample groups; B. Histogram of all DEGs in different times between LAV groups and control groups

富集,表明细胞凋亡在早期免疫反应中可能发挥了重要的调控作用。

在免疫后7d, 适应性免疫应答逐步达到高峰, 多个适应性免疫相关的通路显著激活, 例如B细胞受体信号通路(B cell receptor signaling pathway)。这一阶段, 先天性免疫通路的活跃程度有所下降, 适应性免疫逐渐占据主导地位。在免疫后期的28d, 适应性免疫反应依然保持活跃。例如, 肠道IgA生成的免疫网络(Intestinal immune network for IgA production)、B细胞受体信号通路(B cell receptor signaling pathway)及Fc gamma R介导的吞噬作用(Fc gamma R-mediated phagocytosis)等通路显著富集, 显示出持久的免疫效应。同时, 代谢相关通路如糖

酵解/糖异生通路(Glycolysis/Gluconeogenesis)在免疫中后期的富集程度依然显著。总体来看, 先天性免疫反应相关的通路主要集中在免疫早期, 表明在免疫早期先天免疫反应发挥主要作用, 适应性免疫相关的通路(红色加粗标注)在免疫中期和后期显著富集, 代谢相关通路(绿色标注)在时间推移中呈现出逐渐增加的富集, 在整个免疫时期中均有出现。

2.5 免疫和代谢相关通路中基因分析

为进一步分析免疫后在大口黑鲈先天性免疫应答相关信号通路中富集的差异表达基因, 本研究用热图展示了胞质DNA感知通路、细胞因子与细胞因子受体相互作用以及细胞凋亡(Apoptosis)通路中DEGs的表达变化(图5)。在免疫早期(1d和4d)凋亡

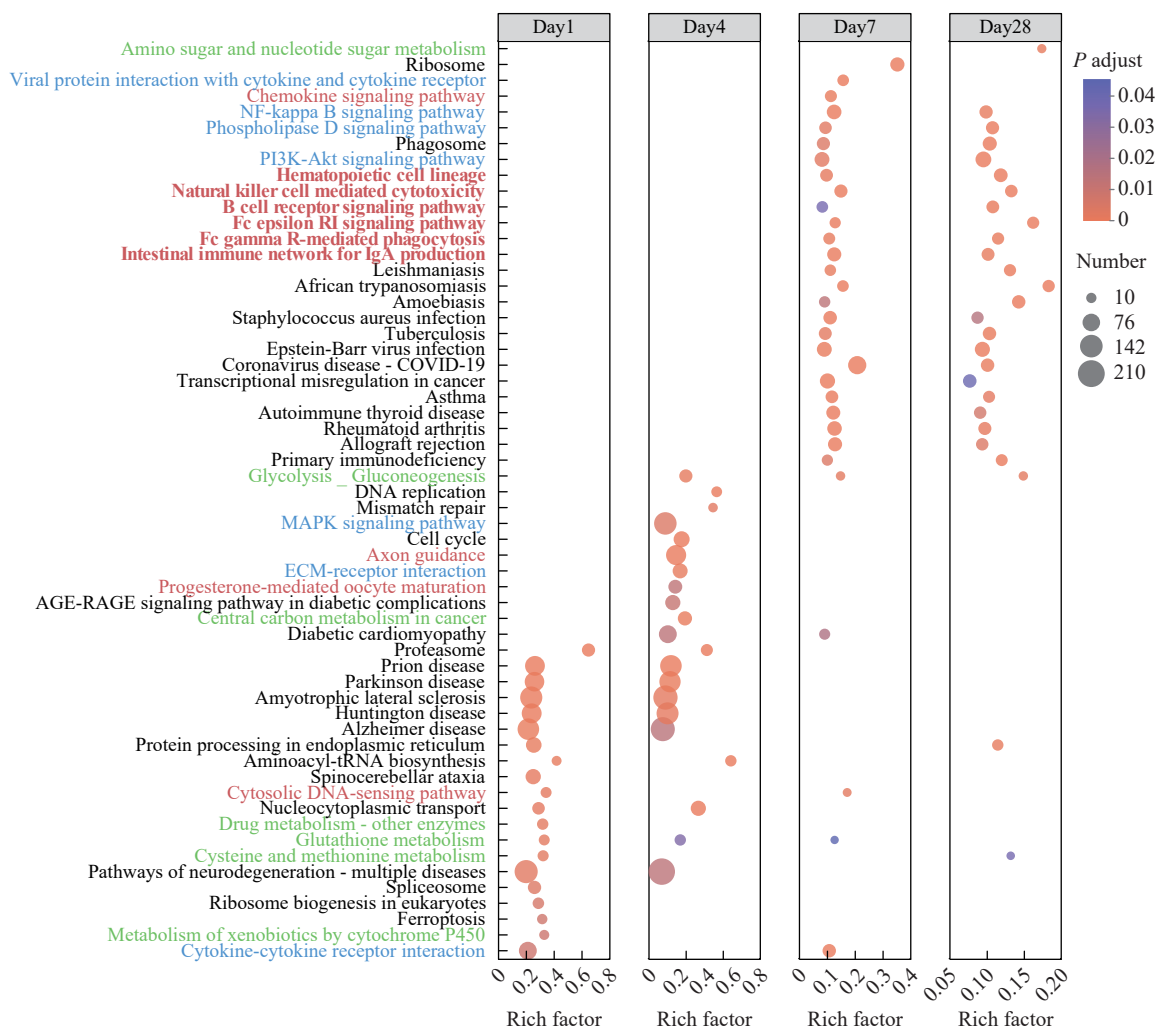


图4 各时间点显著富集的KEGG通路及其富集因子分布

Fig. 4 Enrichment of KEGG pathways and distribution of rich factors across different time points

不同标注颜色依据功能分类: 绿色表示代谢相关通路; 红色表示生物系统相关通路, 其中与适应性免疫相关的通路进行了加粗; 蓝色表示环境信息处理相关通路

The color annotation is based on the functional classification of enriched pathways: green represents metabolism pathways; red represents organismal systems pathways, with pathways relate to adaptive immunity highlight in bold; blue represents pathways involved in environmental information processing

通路中的*CYC*和*CASP3*、*CASP7*、*CASP8*、*CASP9*, 胞质DNA感知通路中的*IL1B*、*IRF3*和*STING*, 细胞因子和细胞因子受体相互作用中的*IL-6*、*TNFSF5*、*IFNAR2*和*IL10*等基因显著上调, 而*CXCL12*、*CCR2*、*TNFSF10*等基因显著下调。然而, 在免疫的中后期(7d和28d), 这些基因的表达与对照组相比没有显著差异。

与先天性免疫相关基因不同, 适应性免疫相关基因在免疫的中后期(7d和28d)表现出和对照的显著差异。在Fc epsilon RI信号通路和B细胞受体信号通路中*IGHV3_33*、*IGHV3_74*和*IGHV914*在7d开始显著上调, 并持续到28d, Th1和Th2细胞分化通路和T细胞受体信号通路的*TRAV*、*CD8A*等关键基因

在4d开始显著下调(图6)。

在糖酵解/糖异生通路中, *GAPDHS*、*LDH*、*PGK*等关键基因在免疫组的不同时间点均显示出上调趋势, 这表明免疫组中代谢活性增强。在谷胱甘肽代谢通路中, *GCLM*等基因在免疫早期(1d和4d)也表现出上调趋势。在半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路中, *CCBL*和*CTH*等基因在免疫早期(1d和4d)同样有所上调(图7)。

此外, 本研究将免疫后的4个时间点分为免疫早期(1d和4d)和免疫中后期(7d和28d), 将这两部分共同调控的差异基因和富集通路利用STRING进行PPI网络分析。通过CytoHubba degree选择排名前50的hub基因, 如图8所示, 免疫相关基因, 包括

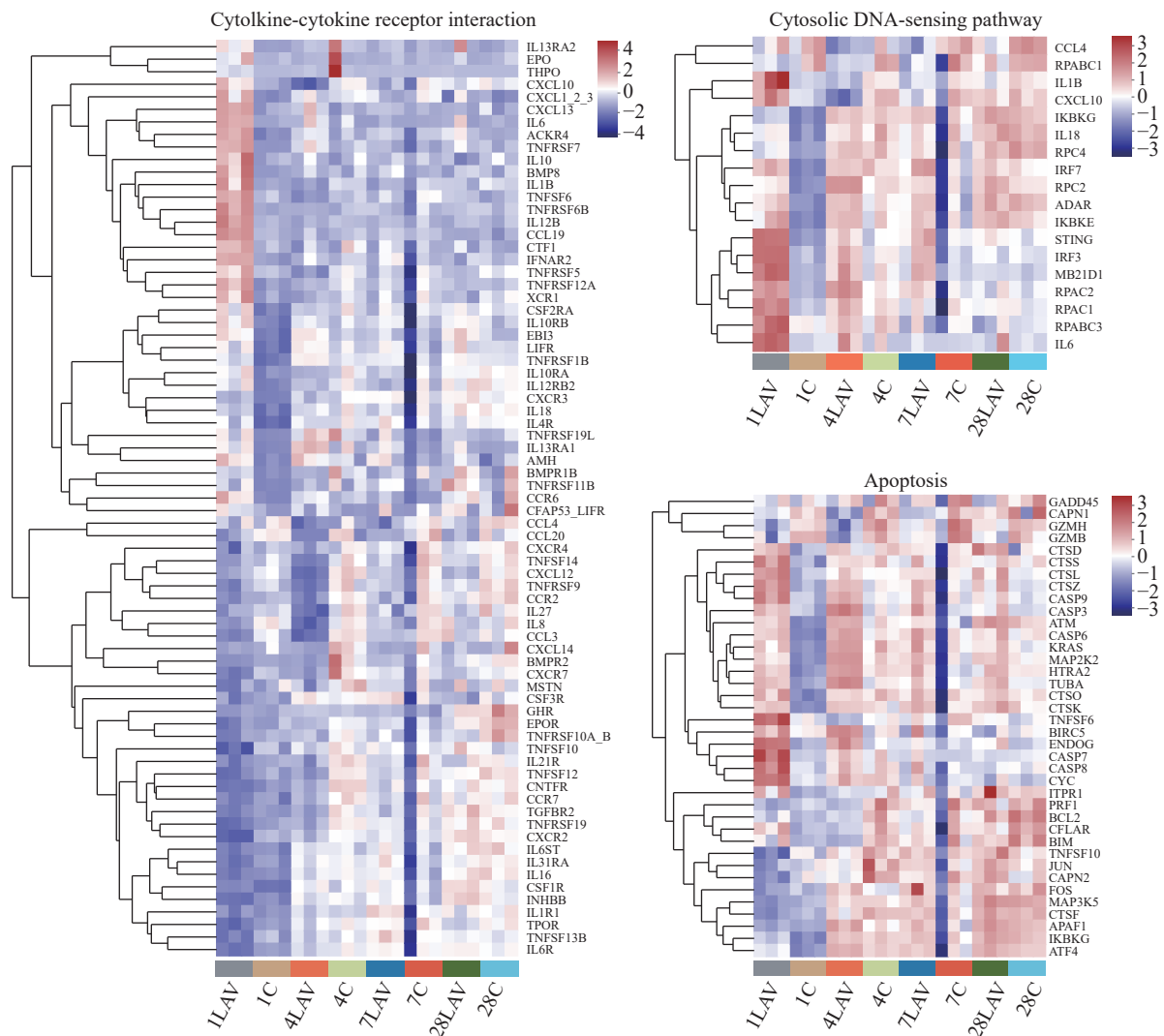


图5 先天性免疫相关通路(细胞因子-细胞因子受体相互作用、胞质DNA感知通路及凋亡通路在不同时间点的表达热图)

Fig. 5 Innate immunity pathways (such as cytokine-cytokine receptor interaction, cytosolic DNA-sensing pathway, and apoptosis pathway) expression heatmaps across different time points)

LAV. 免疫组; C.对照组; 红色表示高表达水平; 白色表示中等表达水平; 蓝色表示低表达水平; 下同

LAV. immune groups; C. control groups; red indicate a high expression level; white indicate a medium expression level; blue indicate a low expression level; the same applies below

HSP90A、*VCP*和*HSPA5*被确定为免疫早期DEGs的PPI网络中的前3个核心基因。*GAPDH*、*FN1*和*CXCL10*被确定为免疫中后期的前3个核心基因。

2.6 通过RT-qPCR验证转录组数据的可靠性

为进一步验证RNA-seq数据的可靠性,本研究筛选了*IRF3*、*MX*、*TRIM25*、*NAMPT*、*DHX58*、*SRC*、*RSAD2*、*TMEM38*和*C4*九个基因,利用RT-qPCR对这些基因在1d、4d、7d和28d的相对表达量进行了分析(图9)。通过将这些基因的相对表达水平与RNA-seq数据进行对比,结果显示RT-qPCR与RNA-seq之间趋势基本一致,验证了RNA-seq数据的可靠性。

3 讨论

3.1 减毒株LMBV-ZJDSS-F110对大口黑鲈的保护作用

近年来,LMBV对大口黑鲈养殖业造成了巨大的经济损失^[8]。尽管目前已有一些针对LMBV的疫

苗开发,但这些疫苗尚未商业化,且关于疫苗接种后鱼体免疫机制的研究相对有限。本实验室通过体外连续传代致弱获得减毒株LMBV-ZJDSS-F110,该毒株具有良好的安全性和免疫保护率。本研究采用该减毒株对大口黑鲈进行腹腔注射免疫,并在免疫后1d、4d、7d和28d检测病毒载量,同时通过组织病理学分析探讨减毒株免疫后对宿主的影响。病毒载量的变化趋势显示,而肝脏、脾脏和头肾的病毒载量在免疫后期下降,表明机体可能逐渐清除组织中的减毒活病毒。组织病理学分析显示,免疫后肝脏、脾脏和头肾的病理变化(如变性和坏死)在7d开始恢复,到28d时几乎接近对照组正常水平。本研究的组织病理逐渐恢复时间(7d)较以往文献中虹鳟感染IHNV的恢复时间(28d)显著缩短^[32]。此外,转录组PCA分析进一步验证了免疫反应的动态过程,研究发现免疫组样本在1d和4d与对照组相比差异显著,而7d和28d差异逐步降低,这与组织病理结果一致。以上发现均表明减毒株在免疫反应

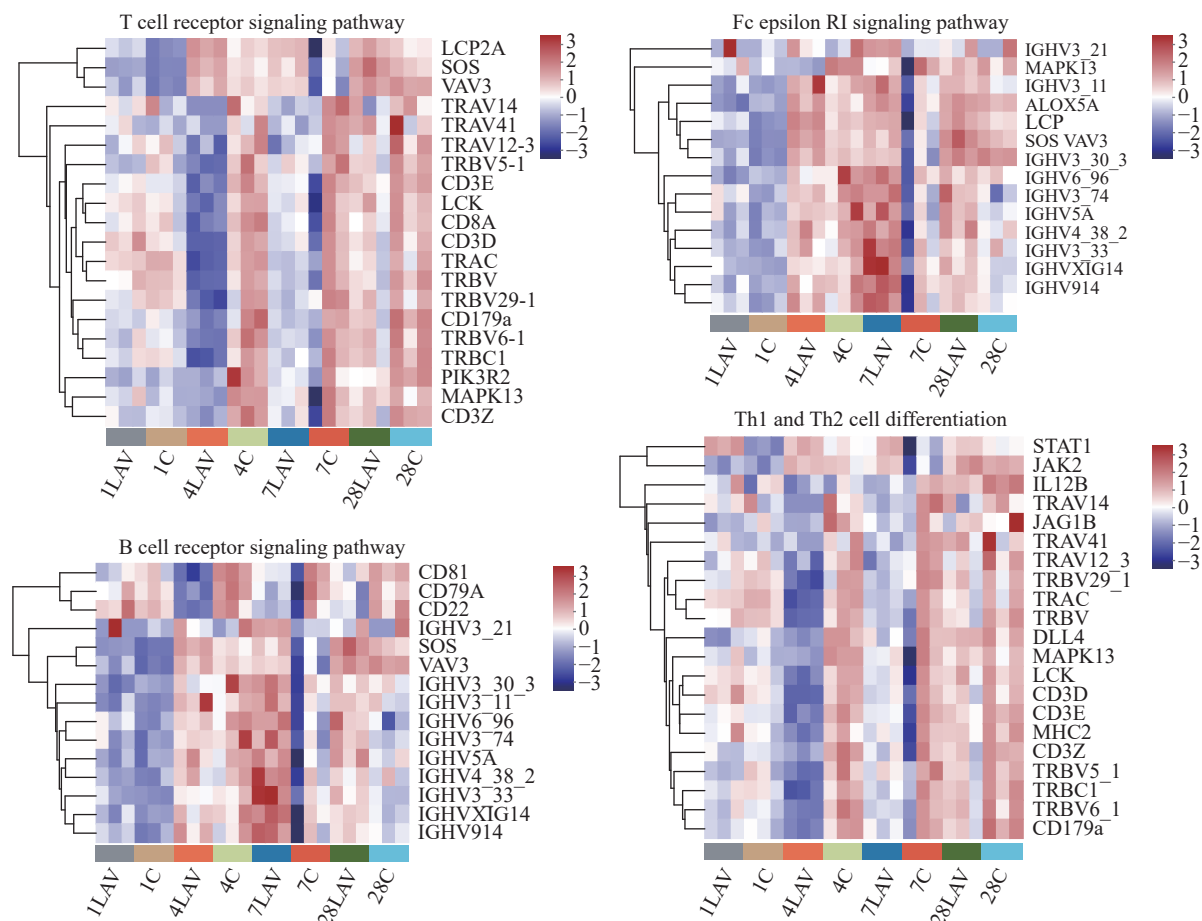


图6 T细胞受体信号通路、B细胞受体信号通路、Fc epsilon RI信号通路及Th1、Th2细胞分化在免疫组(LAV)和对照组(C)的基因表达热图

Fig. 6 Gene expression heatmaps of T cell receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, Fc epsilon RI signaling pathway, and Th1, Th2 cell differentiation in immune groups (LAV) and control groups (C)

逐步稳定后对组织的伤害较小, 显示出良好的安全性和组织耐受性。本研究首次为大口黑鲈对LMBV减毒株的免疫反应提供了全面的动态描述, 为LMBV疫苗的进一步开发和应用提供了重要的科

学依据。

3.2 转录组分析揭示减毒株对大口黑鲈先天性免疫的影响

疫苗的有效性主要体现在其抗原刺激宿主免

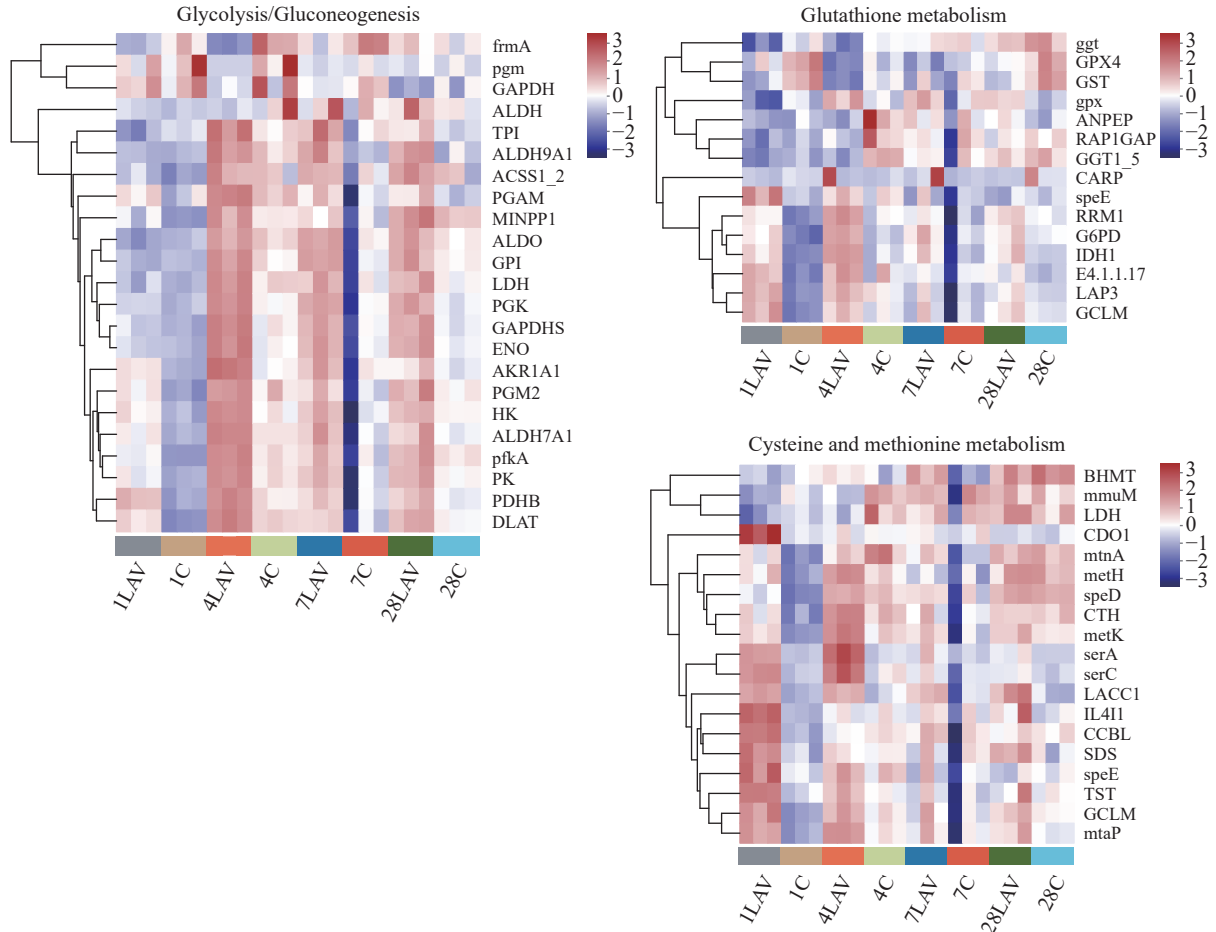


图7 糖酵解/糖异生通路、谷胱甘肽代谢通路及半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路在免疫组(LAV)和对照组(C)的不同时间基因表达热图
Fig. 7 Gene expression heatmaps of Glycolysis/Gluconeogenesis, Glutathione metabolism, and Cysteine and methionine metabolism pathways in immune groups (LAV) and control groups (C)

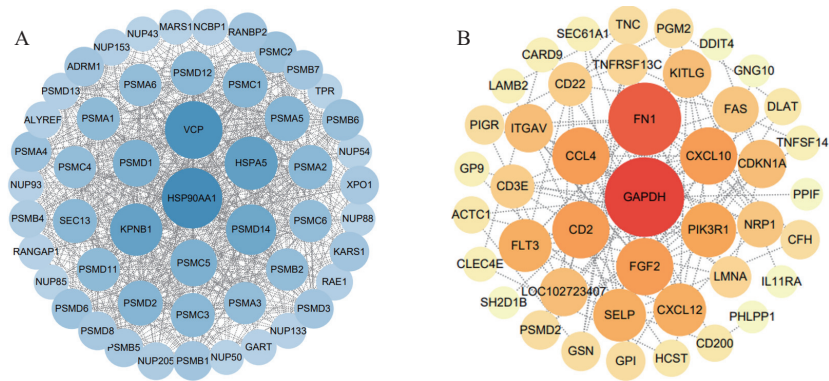


图8 LAV免疫早期与免疫中后期共调控DEGs的PPI分析

Fig. 8 PPI analysis of co-regulated DEGs in the early and mid-late stages of immunity after LAV vaccination

PPI网络中呈现免疫早期(A)和免疫中后期(B); 节点颜色代表 $\log_2(\text{fold change})$ 的值, 节点大小代表所使用的分值

The PPI network shows the early stage (A) and mid-late stage (B) of immunity. Node color represents the $\log_2(\text{fold change})$ value, and node size corresponds to the interaction score

疫反应的能力上^[31]。目前,关于LMBV疫苗免疫机制的研究相对较少。通过转录组分析,我们对不同时间点的DEGs进行了KEGG通路分析,发现免疫后先天性免疫相关通路中的DEGs在早期(1d和4d)显著上调。宿主启动有效免疫应答的第一步是及时识别病原体^[31]。cGAS-STING通路在识别胞质中病毒DNA并触发I型干扰素(IFN- I)反应中发挥了关键作用^[33]。在本研究中,该通路的相关基因(如*IL1B*、*IRF3*、*STING*)在免疫后1d、4d显著上调,在大口黑鲈中,*STING*同源蛋白已被证明能激活干扰素反应,从而增强对LMBV感染的防御能力^[34],cGAS-STING通路可能在减毒疫苗诱导的先天免疫中发挥核心作用。除了对病原体的识别,细胞因子(cytokines)在免疫反应的调控中起重要作用。*IL-6*是一种关键的细胞因子,既参与急性炎症反应,还与B细

胞分化为抗体分泌细胞有关^[35]。在鱼体中*IL-6*可促进IgM抗体产生,增强免疫保护作用^[36],还可调控氧化应激和组织修复来缓解损伤^[37]。本实验中观察到*IL-6*在免疫后1d和4d显著上调,可能表明其在大口黑鲈免疫应答中通过多种机制发挥重要作用。*TNFRSF5*又称*CD40*,与免疫反应调节相关^[38]。在本研究中,减毒活疫苗免疫后1d,*TNFRSF5*显著上调,这与嗜水气单胞菌疫苗免疫大西洋鲑^[39]和VHSV的DNA疫苗免疫牙鲈^[23]中观察到的结果一致,进一步表明其在调节免疫中的重要作用。同时,*IL-12*、*CCL19*、*IL-10*和*IFNAR2*等细胞因子的显著上调进一步表明减毒疫苗在免疫初期能够有效激活宿主的先天性免疫系统。而*CXCL12*、*CCR2*、*TNFSF10*显著下调,这与Xu等^[25]观察到的LMBV入侵机体后的免疫反应相一致,可能是宿主通过下调某些趋化

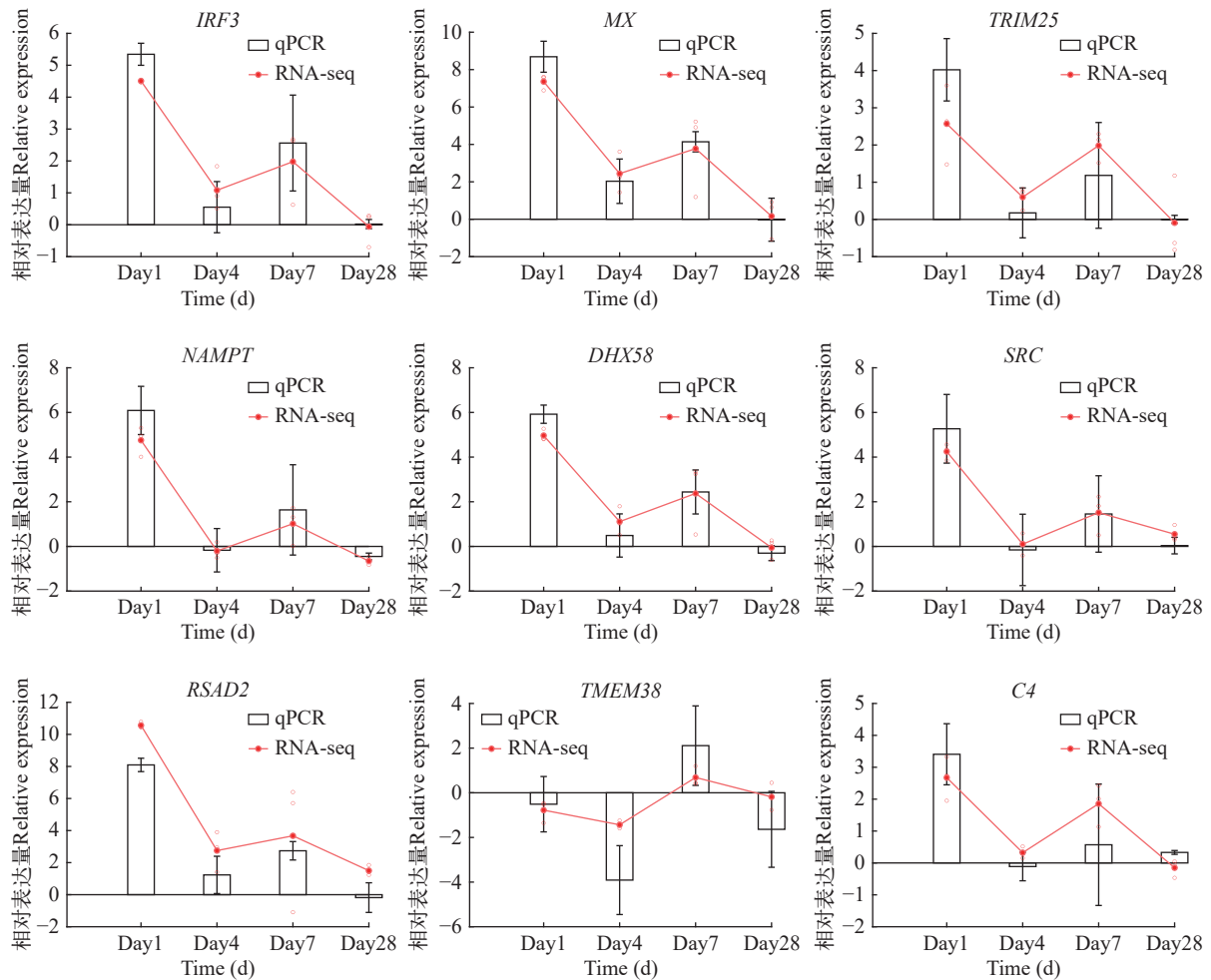


图9 RNA-seq数据的验证采用了RT-qPCR方法

Fig. 9 Validation of RNA-seq data using Real-time qPCR

柱状图表示RT-qPCR的结果,线条表示RNA-seq的数据;免疫后不同时间点(1d、4d、7d和28d) *IRF3*、*MX*、*TRIM25*、*NAMPT*、*DHX58*、*SRC*、*RSAD2*、*TMEM38*和*C4*基因的相对表达水平;误差线表示标准差

The bars represent Real-time qPCR results; The lines represent RNA-seq data. Gene relative expression levels are shown for *IRF3*, *MX*, *TRIM25*, *NAMPT*, *DHX58*, *SRC*, *RSAD2*, *TMEM38*, and *C4* across different time points after immunization (day1, day4, day7, and day28); Error bars indicate standard deviations

因子和凋亡信号来防止过度的炎症反应,可能反映了免疫系统对于早期先天性免疫的调节作用。到免疫后期,这些基因与对照组的差异逐渐减小。

在感染初期,细胞凋亡对阻止病毒复制、维持组织稳态及免疫应答具有重要作用^[40]。半胱天冬酶(Caspases, CASP)是一类在细胞凋亡中起着核心作用的蛋白酶,细胞色素c (Cytochrome c, CYC)通过激活半胱天冬酶,进而启动后续的凋亡程序,在宿主抗病毒过程中发挥着关键作用^[41]。LMBV感染宿主鳙条细胞系(MsF)后激活了CASP3和CASP8,但并未激活CASP9^[42]。在本研究中,鱼体免疫后1d和4d时,凋亡通路中的CYC、CASP3、CASP6、CASP7、CASP8、CASP9均显著上调,这与橄榄蝶^[23]和红色杂交罗非鱼^[43]在接种疫苗后观察到的现象一致,表明通过细胞凋亡清除受感染细胞是免疫反应中的关键过程^[43],宿主可能在免疫早期通过激活细胞凋亡途径启动免疫应答。

3.3 转录组分析揭示减毒株对大口黑鲈适应性免疫的影响

在硬骨鱼类中,适应性免疫系统主要依赖于B细胞和T细胞的功能^[44],本研究通过转录组分析发现,在免疫中后期(7d和28d),与Fc epsilon RI和B细胞受体信号通路、Th1/Th2细胞分化通路及T细胞受体通路相关的DEGs显著富集。然而, Th1/Th2细胞分化通路和T细胞受体通路中多个基因的表达水平下调,包括TRAV、TRBV、相关的CD分子(CD3、CD8A和CD179),类似的现象也在减毒爱德华氏菌疫苗免疫斑马鱼^[45]、三价灭活细菌疫苗免疫大黄鱼^[46]、大口黑鲈感染蛙虹彩病毒^[25]的研究中被发现。这表明TCR通路相关基因的表达量降低似乎是一种常见的免疫响应模式,但TCR通路在疫苗接种阶段被抑制的具体机制尚不清楚。免疫球蛋白(Ig)是抗病原体免疫应答的主要成分,它们通过多种机制发挥作用,包括促进吞噬细胞清除病原体、中和毒素和病毒及激活补体级联反应^[47]。在本研究中, Fc epsilon RI和B细胞受体信号通路中的IGH(免疫球蛋白重链相关基因)从4d开始显著上调,并在7d达到峰值。这一结果表明,大口黑鲈的体液免疫反应被有效激活,并可能通过诱导长效免疫记忆增强宿主的抵抗能力,这可能是大口黑鲈可以在后续攻毒时表现出较强抵抗能力的原因之一。

3.4 转录组分析揭示减毒株对大口黑鲈代谢通路的影响

糖酵解是一条关键的代谢途径^[48],它不仅能够为免疫细胞快速产生能量,还为维持其功能活性提供了重要的代谢支持,进而促进免疫细胞的活化和

增殖^[49]。在本研究中,糖酵解途径的关键基因(如TPI、GAPDHS、ENO、PK和LDH)在感染后4d、7d和28d均呈现上调趋势,表明糖酵解在机体应对活病毒感染的免疫反应中发挥了重要作用。谷胱甘肽代谢通路在抗氧化活性、细胞生长调节(如增殖与凋亡)及免疫反应中发挥着关键作用^[50]。在鱼类的研究中,谷胱甘肽代谢能够快速识别细菌病原体,并触发针对鳙鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)感染的免疫反应^[49]。在本研究中,谷胱甘肽代谢通路中的GCLM、G6PD等关键基因表达上调,这表明宿主可能通过该通路调控免疫应答,以有效应对病原体感染。蛋氨酸通过去甲基化过程促进cGAS-STING通路的激活,最终增强抗肿瘤免疫反应^[52]。在本研究中,半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路中的关键基因如CTH在免疫反应早期上调,表明其可能在早期的先天性免疫过程中发挥重要作用,具体机制仍需进一步实验验证。

4 结论

本研究深入分析了大口黑鲈蛙虹彩病毒减毒株(LMBV-ZJDSS-F110)对大口黑鲈免疫应答的影响。研究结果表明,该减毒株不仅能有效地提供免疫保护,而且对鱼体组织仅在免疫早期造成轻微损伤,并能快速恢复。通过转录组分析,本研究观察到在免疫应答的早期,先天性免疫途径被激活,随着时间推移免疫反应逐步转向适应性免疫。此外,在不同阶段,代谢途径的显著差异性富集,反映了鱼体在免疫过程中对能量和代谢调节的需求变化。减毒株免疫接种显著调控了涉及先天性免疫、适应性免疫及代谢途径的多个基因,这为探索大口黑鲈蛙虹彩病毒减毒株诱导的保护性机制提供了数据支持和新的科学见解。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Plumb J A, Zilberg D. Survival of largemouth bass iridovirus in frozen fish [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1999, 11(1): 94-96.
- [2] Luo X W, Shen J Y, Yang T, et al. Isolation and identification of largemouth bass ranavirus from Hubei Province [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(3): 494-502. [罗晓雯, 沈锦玉, 阳涛, 等. 一株湖北源大口黑鲈蛙病毒的分离鉴定 [J]. *中国水产科学*, 2022, 29(3): 494-502.]
- [3] Dong H X, Zeng W W. Research progress on largemouth bass ranavirus disease [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2022, 38(3): 746-756. [董寒旭, 曾伟伟. 大口黑鲈蛙虹彩病毒病研究进展 [J]. *病毒学报*, 2022, 38(3): 746-

- 756.]
- [4] Grizzle J M, Altinok I, Fraser W A, *et al.* First isolation of largemouth bass virus [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, **50**(3): 233-235.
 - [5] Mao J, Wang J, Chinchar G D, *et al.* Molecular characterization of a ranavirus isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1999, **37**(2): 107-114.
 - [6] Yang Z Z, Lin Q, Fu X Z, *et al.* Molecular epidemiology and histopathological analysis of largemouth bass ranavirus [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, **46**(6): 1063-1073. [杨展展, 林强, 付小哲, 等. 大口黑鲈蛙病毒分子流行病学及组织病理分析 [J]. 水产学报, 2022, **46**(6): 1063-1073.]
 - [7] Zeng K, He J G, Weng S P, *et al.* Transmission, host range, temperature sensibility of infectious spleen and kidney necrosis (ISKN) virus from *Siniperca chuatsi* [J]. *Virologica Sinica*, 1999, **14**(4): 353-357. [曾慷, 何建国, 翁少萍, 等. 传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)感染途径、宿主范围及对温度敏感性的研究 [J]. 中国病毒学, 1999, **14**(4): 353-357.]
 - [8] Liu X, Zhang Y, Zhang Z, *et al.* Isolation, identification and the pathogenicity characterization of a Santee-Cooper ranavirus and its activation on immune responses in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023(135): 108641.
 - [9] Fu X, Lin Q, Liu L, *et al.* The pathogenicity and biological features of Santee-Cooper Ranaviruses isolated from Chinese perch and snakehead fish [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017(112): 269-273.
 - [10] Xu F, Lu J F, Wei Y W, *et al.* Characterization of an iridovirus isolate from largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, **51**(1): 156-162. [许峰, 鲁建飞, 魏永伟, 等. 一株大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)虹彩病毒(Iridoviridae)的分离及鉴定 [J]. 海洋与湖泊, 2020, **51**(1): 156-162.]
 - [11] Zhao R, Geng Y, Qin Z, *et al.* A new ranavirus of the Santee-Cooper group invades largemouth bass (*Micropterus salmoides*) culture in southwest China [J]. *Aquaculture*, 2020(526): 735363.
 - [12] Gong J P, Pan X Y, Lin L Y, *et al.* Establishment and application of TaqMan qPCR method for largemouth bass ranavirus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, **44**(5): 508-513. [巩金鹏, 潘晓艺, 蔺凌云, 等. 大口黑鲈虹彩病毒TaqMan荧光定量PCR检测方法的建立与应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2022, **44**(5): 508-513.]
 - [13] Jiang N, Shen J, Zhou Y, *et al.* Development of a droplet digital PCR method for the sensitive detection and quantification of largemouth bass ranavirus [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2023, **46**(2): 91-98.
 - [14] Wang Q, Li K B, Zeng W W, *et al.* Progress on viral disease caused by largemouth bass ranavirus [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2011, **32**(2): 73-76. [王庆, 李凯彬, 曾伟伟, 等. 大口黑鲈虹彩病毒病研究进展 [J]. 动物医学进展, 2011, **32**(2): 73-76.]
 - [15] Ma D M, Deng G C, Bai J J, *et al.* Prokaryotic expression of MCP gene from largemouth bass ulcerative syndrome virus and the immune effect analysis of recombinant protein [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, **32**(8): 139-144. [马冬梅, 邓国成, 白俊杰, 等. 大口黑鲈溃疡综合征病毒MCP基因的原核表达及重组蛋白的免疫效果初步分析 [J]. 生物技术通报, 2016, **32**(8): 139-144.]
 - [16] Gong J P. Development and immune effect evaluation of largemouth bass ranavirus inactivated vaccine [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2022: 41-49. [巩金鹏. 大口黑鲈蛙虹彩病毒病灭活疫苗的研制及免疫效果评价 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022: 41-49.]
 - [17] Yi W, Zhang X, Zeng K, *et al.* Construction of a DNA vaccine and its protective effect on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) challenged with largemouth bass virus (LMBV) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(106): 103-109.
 - [18] Jia Y J, Guo Z R, Ma R, *et al.* Protective immunity of largemouth bass immunized with immersed DNA vaccine against largemouth bass ulcerative syndrome virus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(107): 269-276.
 - [19] Jia Y J, Xia J Y, Jiang F Y, *et al.* Antigenic epitope screening and functional modification of mannose enhance the efficacy of largemouth bass virus subunit vaccines [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2022, **45**(11): 1635-1643.
 - [20] Jia Y J, Guo Z R, Ma R, *et al.* Immune efficacy of carbon nanotubes recombinant subunit vaccine against largemouth bass ulcerative syndrome virus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(100): 317-323.
 - [21] Wang Q, Liang X, Ning Y, *et al.* Surface display of major capsid protein on *Bacillus subtilis* spores against largemouth bass virus (LMBV) for oral administration [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023(135): 108627.
 - [22] Yao J Y, Zhang C S, Yuan X M, *et al.* Oral vaccination with recombinant *Pichia pastoris* expressing iridovirus major capsid protein elicits protective immunity in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022(13): 852300.
 - [23] Hwang J Y, Kwon M G, Jung S H, *et al.* RNA-Seq transcriptome analysis of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) kidney response to vaccination with heat-inactivated viral hemorrhagic septicemia virus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(62): 221-226.
 - [24] Sudhagar A, Kumar G, El-Matbouli M. Transcriptome analysis based on RNA-seq in understanding pathogenic mechanisms of diseases and the immune system of fish: a comprehensive review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(1): 245.
 - [25] Xu W, Zhang Z, Lai F, *et al.* Transcriptome analysis

- reveals the host immune response upon LMBV infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, **137**: 108753.
- [26] Du X, Li Y, Li D, *et al.* Transcriptome profiling of spleen provides insights into the antiviral mechanism in *Schizothorax prenanti* after poly (I:C) challenge [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, **62**: 13-23.
- [27] Wang C X, Pan X Y, Zhou K X, *et al.* Effect of in vitro passage on virulence of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) ranavirus [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2023, **38**(4): 623-629. [王丛旭, 潘晓艺, 周可欣, 等. 体外传代对大口黑鲈蛙虹彩病毒毒株毒力的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2023, **38**(4): 623-629.]
- [28] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [J]. *The American Journal of Hygiene*, 1938, **27**(3): 493-497.
- [29] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nature Methods*, 2015, **12**(4): 357-360.
- [30] Chen S Y, Feng Z, Yi X. A general introduction to adjustment for multiple comparisons [J]. *Journal of Thoracic Disease*, 2017, **9**(6): 1725-1729.
- [31] Meng X, Chi H, Zhang Z, *et al.* Transcriptome analysis of peritoneal cells reveals the early immune response of flounder (*Paralichthys olivaceus*) to inactivated *Vibrio anguillarum* immunization [J]. *Vaccines*, 2023, **11**(10): 1603.
- [32] Kong W, Cheng G, Cao J, *et al.* Ocular mucosal homeostasis of teleost fish provides insight into the coevolution between microbiome and mucosal immunity [J]. *Microbiome*, 2024, **12**(1): 10.
- [33] Liu Z F, Ji J F, Jiang X F, *et al.* Characterization of cGAS homologs in innate and adaptive mucosal immunities in zebrafish gives evolutionary insights into cGAS-STING pathway [J]. *The FASEB Journal*, 2020, **34**(6): 7786-7809.
- [34] Yang X, Dong Y, Wang Y, *et al.* The antiviral role of largemouth bass STING against iridovirus infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(148): 109480.
- [35] Metcalfe R D, Putoczki T L, Griffin M D W. Structural understanding of interleukin 6 family cytokine signaling and targeted therapies: focus on interleukin 11 [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020(11): 1424.
- [36] Zhai W, Wang Z, Ye C, *et al.* IL-6 mutation attenuates liver injury caused by *Aeromonas hydrophila* infection by reducing oxidative stress in zebrafish [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**(24): 17215.
- [37] Wei X, Li B, Wu L, *et al.* Interleukin-6 gets involved in response to bacterial infection and promotes antibody production in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018(89): 141-151.
- [38] Cai J, Fan Y, Xia H, *et al.* Identification and characterization of CD40 from humphead snapper (*Lutjanus sanguineus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(70): 665-672.
- [39] Fu X, Luo M, Zheng G, *et al.* Determination and characterization of a novel birnavirus associated with massive mortality in largemouth bass [J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, **10**(2): e0171621.
- [40] Ke F, Zhang Q Y. Aquatic animal viruses mediated immune evasion in their host [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(86): 1096-1105.
- [41] dos Santos N M S, do Vale A, Reis M I R, *et al.* Fish and apoptosis: molecules and pathways [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2008, **14**(2): 148-169.
- [42] Yang J, Xu W, Wang W, *et al.* Largemouth bass virus infection induced non-apoptotic cell death in MsF cells [J]. *Viruses*, 2022, **14**(7): 1568.
- [43] Ali N S M, Ngalmat M S, Saad M Z, *et al.* Expression of immuno-transcriptome response in red hybrid *Tilapia* (*Oreochromis* sp.) hindgut following vaccination with feed-based bivalent vaccine [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2024, **47**(7): e13943.
- [44] Mokhtar D, Zacccone G, Alesci A, *et al.* Main components of fish immunity: an overview of the fish immune system [J]. *Fishes*, 2023, **8**(2): 93.
- [45] Yang D, Liu Q, Ni C, *et al.* Gene expression profiling in live attenuated *Edwardsiella tarda* vaccine immunized and challenged zebrafish: insights into the basic mechanisms of protection seen in immunized fish [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, **40**(2): 132-141.
- [46] Zhang J, Sun L. Transcriptome analysis reveals temperature-regulated antiviral response in turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(68): 359-367.
- [47] Zwollo P, Cole S, Bromage E, *et al.* B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney [J]. *The Journal of Immunology*, 2005, **174**(11): 6608-6616.
- [48] Liao X, Liu S, Chen S, *et al.* Transcriptomic analysis reveals the role of Glycolysis pathway in *Litopenaeus vannamei* during DIV1 infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023(141): 109036.
- [49] Dong F, Sun Y L, Qian Y X, *et al.* Integrated analysis of transcriptome and metabolome reveals the regulatory mechanism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in response to *Nocardia seriolae* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(145): 109322.
- [50] Wu G, Lupton J R, Turner N D, *et al.* Glutathione metabolism and its implications for health [J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, **134**(3): 489-492.
- [51] Kerstholt M, Vrijmoeth H, Lachmandas E, *et al.* Role of glutathione metabolism in host defense against *Borrelia burgdorferi* infection [J]. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America,
2018, **115**(10): E2320-E2328.

[52] Fang L, Hao Y, Yu H, *et al.* Methionine restriction

promotes cGAS activation and chromatin untethering
through demethylation to enhance antitumor immunity
[J]. *Cancer Cell*, 2023, **41**(6): 1118-1133.

THE IMMUNEREGULATORY MECHANISMS OF AN ATTENUATED LMBV IN *MICROPTERUS SALMOIDES* BASED ON TRANSCRIPTOME ANALYSIS

CHU Xin^{1,2}, CHEN Jing¹, GAO Ming-Yue^{1,3}, LIN Ling-Yun¹, YAO Jia-Yun¹, SHEN Jin-Yu^{1,2,3} and PAN Xiao-Yi¹

(1. Agriculture Ministry Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China)

Abstract: This study aimed to investigate the immunoregulatory effects and mechanisms of an attenuated LMBV strain (LMBV-ZJDSS-F110) developed through serial passage, which exhibited strong immunoprotective properties in *Micropterus salmoides*. Immune responses were evaluated at the tissue and molecular levels following immunization by sampling liver, spleen, and head kidney tissues at days 1, 4, 7, and 28 post-vaccination. Histopathological analysis demonstrated the minimal tissue damage, with observable recovery by day 7 and nearly normal tissue structure by day 28, suggesting mild effects on fish tissues by the attenuated strain. Viral load assessments showed a significant reduction over time across all examined tissues, indicating effective viral clearance. To further elucidate the immune regulatory mechanisms, transcriptome analysis of head kidney samples was performed. Early in the immune response (days 1 and 4), 4979 and 6891 differentially expressed genes (DEGs) were predominantly enriched in innate immune pathways, such as cytokine-cytokine receptor interaction, cytoplasmic DNA sensing, and apoptosis pathways. This early upregulation of innate immunity likely facilitated a rapid antiviral response. During the mid-to-late immune phases (days 7 and 28), 1693 and 1758 DEGs were enriched in adaptive immune pathways, including T-cell receptor, B-cell receptor, Fc epsilon RI signaling, and Th1/Th2 cell differentiation pathways, indicating a transition from innate to adaptive immunity. Additionally, metabolic pathways involving cysteine and methionine metabolism and glutathione metabolism were enriched during the early immune phase, while glycolysis/gluconeogenesis pathways were more prominent during the mid-to-late phase. This metabolic shift may support immune cell activation and function throughout the immune response. The reliability of RNA-Seq data was verified using RT-qPCR, which showed consistent results, further confirming the accuracy of the data. The findings highlight the dynamic progression from innate to adaptive immunity and the essential role of metabolic pathways in supporting immune activity.

Key words: Histopathology; RNA sequencing; Differentially expressed genes; Immune response; Largemouth bass ranavirus