

· 研究进展 ·

对虾先天免疫中宿主与病原互作的细胞与分子机理

王金星* 王显伟

(山东大学生命科学院 山东省动物细胞与发育生物学重点实验室
山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

[摘要] 在国家自然科学基金委重点项目资助下,王金星课题组针对对虾养殖业中病害防控的实际需求,围绕着对虾免疫系统与细菌和病毒性两类重要病原(鳃弧菌和白斑综合征病毒)之间的相互作用开展研究,取得了系列创新性成果:(1)揭示了对虾抵御病原入侵的细胞和分子机制。主要阐释了不同的模式识别受体识别和防御病原的机理,包括 FcLec4 通过行使调理素的功能促进对病原的吞噬、Leulectin 不同识别模块之间在抗细菌免疫中分工与协作的新机理、MjHeCL 感知血淋巴菌群及参与菌群动态平衡调控的机理以及清道夫受体参与的抗病毒免疫的新途径等;(2)发现了病原侵入机体后宿主细胞抵御病原的信号途径及效应机制。主要揭示了对虾 Toll 和 IMD 信号途径的特点、调控机理及下游的效应分子,阐释了 JAK/STAT 途径激活的特征及调控的下游效应分子,并发现 Toll 途径的激活机制不同于果蝇而与哺乳动物相似;(3)阐明了胞内病原逃逸宿主免疫的分子机制。阐释了白斑综合征病毒利用宿主的 C-型凝集素以胆固醇依赖的方式入侵宿主细胞的分子机理以及利用宿主的 SUMO 化系统促进自身复制的机理。该研究为对虾养殖的病害防治提供了新思路、新方法、新的候选药物以及对虾抗病品系培育的新靶标。

[关键词] 模式识别受体;免疫信号通路;白斑综合征病毒;鳃弧菌;免疫逃逸

对虾等甲壳动物养殖业是我国沿海地区重要的支柱性产业。作为世界上最大的对虾养殖国,中国对虾养殖产量达到世界产量的 40%,创造了巨大的经济效益^[1]。然而,自 1992 年爆发的白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)病给我国乃至世界的对虾养殖造成了严重的经济损失^[2]。在 2008 年农业部新修订的《一、二、三类动物疫病病种名录》中将 WSSV 导致的对虾白斑病列为一类疫病,是防控的重要病害。近年来由高致病力副溶血弧菌引起的早期死亡综合征(急性肝胰腺坏死病)也使对虾养殖业蒙受重大损失^[3]。因此,对虾养殖中亟需建立有效的病害防控技术。虽然在近十几年来对虾免疫研究取得了很大进展^[4],但是,一方面对虾是海水无脊椎动物,又是非模式生物,生长周期相对较长;另一方面,对虾基因组庞大且结构复杂,到目前为止尚未完成基因组测序工作;再次,对虾细胞系的建立也是一个国际性的难题,迄今尚无可用的细

胞系,使得在细胞水平上研究病毒感染及宿主抗病毒机理等无法进行。这些都增加了对虾免疫机理研究的难度,也严重制约了对虾病害防控新技术的发展。在国家自然科学基金重点项目“对虾抗病毒相关基因的功能与抗病毒机理分析”(31130056)和“对虾体内的微生物菌群及其动态平衡调控”(31630084)等的资助下,王金星教授课题组针对对虾养殖业中病害防控的实际需求,围绕细菌和病毒性两类重要病原(包括 WSSV 和鳃弧菌等)导致的病害,重点研究了对虾先天免疫中宿主与病原互作的细胞和分子机理,包括:对虾抵御病原入侵细胞的分子机制、病原入胞后宿主细胞抵御病原的信号途径及效应机制、以及胞内病原如何干扰和逃逸宿主免疫的分子机制。通过这些研究,一方面可以阐明对虾免疫中宿主与病原互作的机理,另一方面为对虾养殖病害防治提供新思路、新方法、新的候选药物以及对虾抗病品系培育的新靶标。

收稿日期:2018-01-31;修回日期:2018-04-20

* 通讯作者,Email: jxwang@sdu.edu.cn

1 对虾抵御病原入侵宿主细胞的分子机制

无脊椎动物(包括对虾)只存在先天性免疫,缺乏脊椎动物中主要依赖抗体的获得性免疫。病原感染宿主首先要突破先天免疫防御中被识别和阻止其入胞的第一道防线。无脊椎动物主要通过一类被称为模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)的免疫识别分子识别入侵病原,进而启动细胞免疫和体液免疫抵抗或清除病原。课题组在对虾体内鉴定了十几类模式识别受体:包括C-型凝集素^[5]、L-型凝集素^[6]、P-型凝集素^[7]、半乳凝素^[8]、 β -1,3葡聚糖酶相关蛋白(又称革兰氏阴性菌结合蛋白)^[9]、钙联蛋白/钙网蛋白^[10]、纤维蛋白原相关蛋白^[11, 12]、清道夫受体^[13]、围食膜蛋白^[14]、含Ig结构域的细胞粘附分子和Toll样受体^[15]等,深入研究了它们的性质和功能,初步阐明了对虾抵御和阻止病原入侵的机理。

1.1 C-型凝集素识别和阻止病原入侵的机理

对虾体内存在几十种钙依赖性凝集素(简称C-型凝集素,CTL),主要分为3种类型:含单一C-型凝集素结构域(亦称糖识别结构域)的CTL、含有两个或以上糖识别结构域的CTL,以及除了糖识别结构域之外还具有其他结构域(如Ig结构域、LRR结构域等)的CTL^[5]。本文中重点介绍如下几种CTL的功能及作用机理。

(1) C-型凝集素FcLec4行使调理素功能的机理。发现对虾的一种含单一结构域的可溶性C-型凝集素(命名为FcLec4)通过识别细菌表面的多糖结合多种细菌,并像高等动物的调理素一样具有促进血细胞吞噬的作用。利用T7噬菌体展示文库淘选技术,发现了FcLec4的互作分子为 β -整联蛋白。进一步研究发现FcLec4的C端糖识别结构域可以识别并结合病原菌,N端区段与细胞膜上的整联蛋白相互作用,这种相互作用可以诱导胞内细胞骨架的重排,进而诱导吞噬体的形成,内吞入侵的病原菌并将其清除(图1-①)。研究还证明这种机制在不同种属的对虾中是保守的,是一种全新的基于C-型凝集素与整联蛋白互作的吞噬入侵病原的机制,被认为是“在生化、功能及体内遗传操作等多方面整合研究无脊椎动物C-型凝集素功能的第一个例子^[16]”。

(2) 富含亮氨酸重复基序的C-型凝集素抗细菌的机理。从日本囊对虾中发现了一种具有富含亮氨酸重复基序(LRR)的新型C-型凝集素,命名为

Leulectin,作为模式识别受体,这种凝集素在对虾中可以抵抗弧菌的感染。为了揭示其抵抗弧菌感染的机理,筛选了其可能结合的病原相关分子模式,发现Leulectin具有结合细菌鞭毛蛋白和脂多糖(LPS)的功能。进一步研究发现Leulectin的第四个LRR基序与鞭毛蛋白结合有关,而Leulectin的C-型凝集素结构域(CTLD)的长环区与病原的脂多糖(LPS)的结合有关。通过结合细菌的鞭毛蛋白,LRR基序可以阻止细菌粘附对虾细胞,从而阻止弧菌定植;通过识别细菌的LPS,CTLD可以凝集细菌并促进血细胞的吞噬功能^[17]。该研究揭示了PRR的不同识别模块之间在抗细菌免疫中分工与协作的新机理(图1-②)。

(3) C-型凝集素MjHeCL调控对虾血淋巴菌群稳态的机制。与高等动物不同,在一些健康对虾的循环血淋巴中,存在稳定的细菌群落^[18]。该菌群稳态的调节机制仍然是未知的。通过对多种C-型凝集素的组织分布与表达模式的分析研究,发现了一种在血细胞和血浆中组成型高表达的C-型凝集素(MjHeCL),该分子具有广谱的病原细菌识别能力。病原菌感染对MjHeCL的表达水平没有影响,但通过RNA干扰沉默其表达,能引起对虾血淋巴中细菌增殖失控,最终导致对虾死亡。过表达MjHeCL可以使这种现象得以缓解,使MjHeCL沉默的对虾恢复到健康状态。进一步研究发现,MjHeCL本身不具有杀灭细菌和抑制细菌生长的能力,而是通过某种信号途径调控几种主要抗菌肽如抗脂多糖因子和对虾素等分子的高水平表达,来抑制对虾血淋巴中细菌的增殖(图1-③)。因此血淋巴中的菌群增多时,MjHeCL通过识别这些菌群激活抗菌肽的表达,杀灭细菌而保持对虾血淋巴菌群的稳态,从而维持对虾的健康状态^[19]。本研究在国内外首次阐明了血淋巴菌群稳态的调控机制。为此,Mol Immunol杂志副主编Victor Mulero教授邀请课题组撰写了关于血淋巴菌群及其动态平衡调控的综述^[18]。

1.2 清道夫受体C介导对虾的抗病毒和抗细菌免疫的机理

清道夫受体(Scavenger Receptor,SR)通过识别病原相关分子模式(PAMPs)参与先天性免疫。虽然在脊椎动物中对清道夫受体有比较多的研究,但其在无脊椎动物先天免疫中的作用报道较少。我们从日本囊对虾中鉴定出了清道夫受体C型亚家族的一个成员,命名为MjSRC。当对虾受到WSSV感染后,MjSRC在血细胞中明显上调表达。通过RNA干扰和过表达实验分别敲低和提高对虾体内MjS-

RC的水平,再以 WSSV 感染对虾,发现 MjSRC 干扰组的病毒含量明显高于对照组,而过表达 MjSRC 后对虾体内病毒含量明显减少,说明 MjSRC 可以有效地抑制对虾体内 WSSV 的复制。进一步研究发现 MjSRC 可引起对虾血细胞吞噬 WSSV,这种吞噬作用的实现首先是 MjSRC 与病毒的囊膜蛋白 VP19 结合,然后 MjSRC 的胞内域与其接头蛋白 beta-抑制蛋白 2(β -arrestin2)相互作用,使受体内化,并与网格蛋白(clathrin)相互作用完成内吞,形成的吞噬小体与溶酶体融合,从而清除病毒,有效限制对虾中 WSSV 的复制和扩散(图 1-④)。该研究首次发现了 SRC-Arrestin2-Clathrin 通路参与了对虾的抗病毒反应,相关论文在 PLoS Pathogens 杂志发表^[20]。另外还发现 SRC 在对虾抗细菌免疫中也发挥重要作用^[21]。

1.3 抑制素 1(PHB1)抑制 WSSV 病毒感染的分子机理

抑制素(prohibitin, PHB)是一类在真核生物中广泛表达且具有很高保守性的蛋白质。发现 PHB1 在 WSSV 感染后表达明显上调,通过 RNA 干扰技术沉默该基因显示 PHB1 可以抑制 WSSV 复制和感染。进一步研究发现 PHB1 可与病毒的主要囊膜蛋白 VP24, VP26 和 VP28 相互作用。已知 VP28 与病毒入侵宿主细胞有关,VP26 在病毒装配过程中发挥重要作用,而 VP24 在病毒感染的早期发挥作用。因此,PHB1 通过与病毒囊膜蛋白 VP28, VP26 和 VP24 的相互作用,抑制病毒对宿主细胞的侵染和病毒的组装(图 1-⑤)。这是关于甲壳动物 PHB 参与抗病毒免疫的首次报道^[22]。

另外,发现两种含有低密度脂蛋白受体家族 A 结构域的 C 型凝集素(LdlrLec1 和 LdlrLec2)可以结合 WSSV 的囊膜蛋白 VP28,从而抑制 WSSV 在对虾体内的侵染和复制,在对虾的抗病毒免疫中发挥功能^[23]。研究了含 Ig 结构域的 C-型凝集素清除细菌的机理^[24]。有的 C-型凝集素参与了酚氧化酶原激活系统^[25]。还阐释了 L-型凝集素(MjLTL1)促进血细胞吞噬病原菌的机理,弧菌感染后可以使 MjLTL1 从细胞质转移到细胞膜上,而解聚素和金属蛋白酶样蛋白(MjADAM)可以把细胞膜上的 MjLTL1 切下从而释放出游离端,结合细菌促进细菌凝集和血细胞对细菌的吞噬^[6]。发现半乳凝素(MjGal)具有促进血细胞吞噬的作用等^[8]。由于在对虾模式识别受体方面的系统工作,课题组受邀分别撰写发表了关于“对虾 C-型凝集素”^[5]和“对虾模式识别受体”^[15]方面的综述。上述研究发现的 PRRs 所识别的细菌表面的多糖类分子及病毒表面蛋白均可作为增强对虾免疫力的候选刺激剂,为病害防治提供了新思路和新方法。例如课题组构建了含 WSSV 囊膜蛋白 VP28 基因的表达载体(pBlueT/iev28),将含有该质粒的大肠杆菌作为饲料饲喂对虾,显示出明显的抗病毒效果,可以作为一种新的防治白斑病毒病的方法^[26]。

2 病原侵入机体后宿主细胞抵御病原的信号途径及效应机制

病原突破宿主细胞膜进入细胞后,对虾启动何种信号途径和免疫防御反应了解相对较少。课题组在这方面做了大量的工作,取得如下成果。

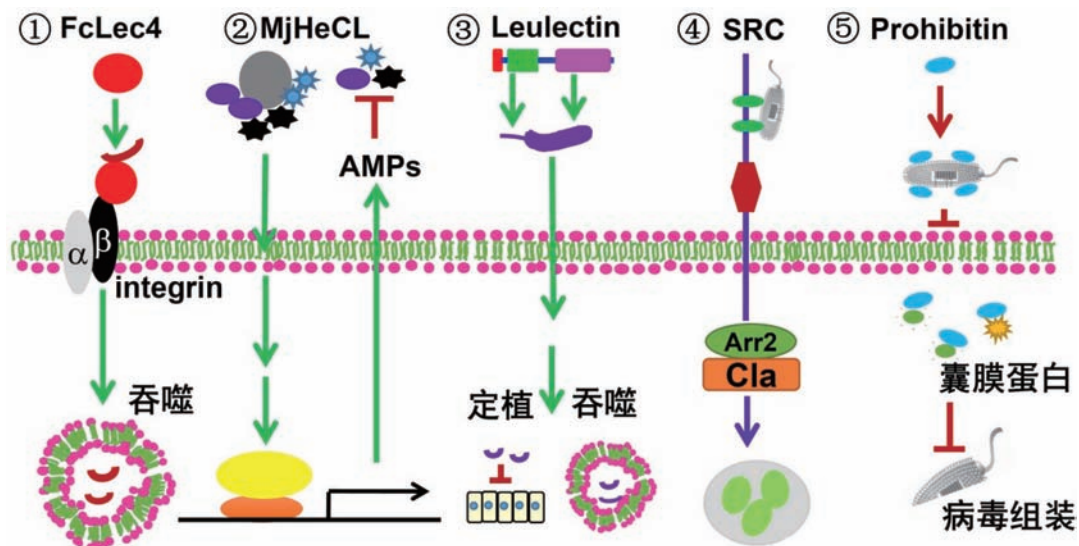


图 1 对虾抵御病原入侵宿主细胞的机制

2.1 宿主细胞抵御病原的信号途径及其调控

病原感染后启动多种信号途径，产生效应反应或效应分子，从而清除病原。并且这些信号途径在对虾体内受到精细调控。

(1) Toll 途径及其调控。在日本囊对虾中鉴定了 Toll 途径的关键分子如 Toll 受体, MyD88, Dorsal, Cactus 等以及参与 Toll 信号途径调控的分子如 β -抑制蛋白 1 和 2。对虾中的 Toll 受体可直接与 PAMPs 结合而激活 Toll 途径, 调控抗脂多糖因子 ALF-C2 和甲壳肽 CruI-1 的表达, 这与果蝇中 Toll 途径只能被间接激活的机制是不同的; 另外, 果蝇中只有真菌和革兰氏阳性菌可以激活 Toll 途径, 而在对虾中, 革兰氏阳性菌和阴性菌均可以激活 Toll 途径^[27]。此外还发现另一种调控分子 β -抑制蛋白通过与 Cactus 的结合以及与 ERK(extracellular regulated protein kinases) 的结合, 抑制 Cactus 降解和 Dorsal 的磷酸化, 从而阻止 Dorsal 入核, 负调控 Toll 信号途径(图 2A)^[28]。

(2) 免疫缺陷(IMD)信号通路及其调控。对虾的免疫缺陷 (Immune deficiency, IMD) 信号通路在调控对虾免疫系统抵御外来微生物的感染中起到关键作用。在对虾中发现了 Imd 途径的关键分子, 如 Imd, Relish, TAK1 和 Ikk 等^[29]。研究发现在革兰氏阴性菌刺激后, Akirin 作为一种新的 Imd 信号通路转录辅助因子, 与 Relish 相互作用, 并且与 Braham (SWI/SNF) ATP-依赖的染色质重塑复合物中的 Bap60 亚基相互作用, 正调控抗菌肽 alf-b1, alf-

c1, alf-c2, alf-d2 和对虾素 Pen2 的表达。另外, Akirin 可以与 14-3-3, 和 Relish 相互作用, 负调控 IMD 信号通路(图 2B)^[30]。

(3) JAK/STAT 信号途径介导的对虾抗细菌免疫及其调控: 发现了一种含有卷曲螺旋结构域的 C-型凝集素 (称为 MjCC-CL) 在病原感染时可以作为配体与 JAK/STAT 信号通路的受体结合, 直接激活该途径。MjCC-CL 有两个结构域, 其 CTLD 可以识别病原菌, 行使模式识别受体的功能; 其卷曲螺旋结构域 (CCD) 与 JAK/STAT 通路的受体 (Domeless) 结合, 作为配体行使激活 JAK/STAT 途径的功能。病原菌感染后, MjCC-CL 的 CTLD 感知病原入侵, 其 CCD 结合 Domeless 从而激活 JAK/STAT 途径, 使 STAT 磷酸化并形成二聚体入核, 调控抗脂多糖因子等多种抗菌肽的表达, 从而清除体内的病原(图 2C)。该研究首次发现 C-型凝集素可以行使类细胞因子的功能; 对虾中的 JAK/STAT 途径可以被病原感染直接激活, 不同于哺乳动物动物中的间接激活; 并证明该途径可以直接调控多种抗菌肽的表达。该研究发表在 PLoS Pathogens 上^[31]。

此外, JAK/STAT 途径受多种因子的调控: β -Arrestin1 在血细胞核中招募酪氨酸磷酸酶 TC45 到 STAT 上, 形成 β -arrestin1-TC45-STAT 复合体, 使 STAT 有效、快速地去磷酸化, 降低 STAT 活性, 负调控 JAK/STAT 通路^[32]。还发现 SOCS2 (Suppressor of cytokine signaling 2) 能够通过抑制 STAT 的转录活性负调控 JAK/STAT 途径^[33]。

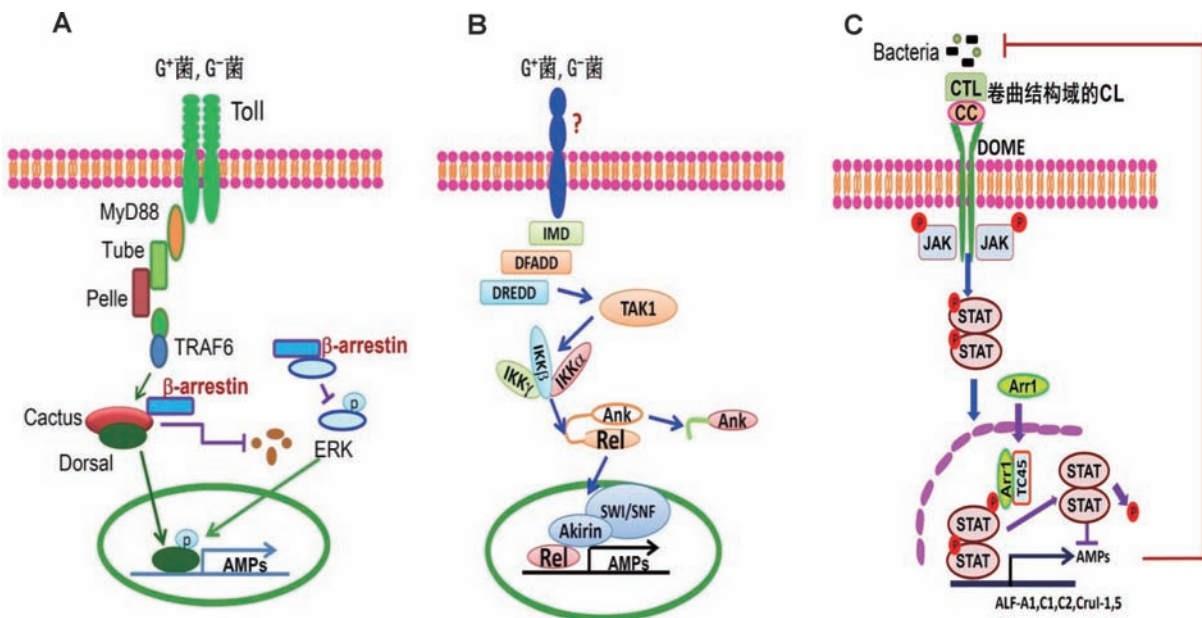


图 2 对虾体内 Toll、IMD 和 JAK/STAT 信号途径及调控: A. Toll 途径, B. IMD 途径, C. JAK/STAT 途径

(4) RNA 干扰途径在对虾抗病毒免疫中的功能:RNA 干扰途径参与对虾的抗病毒免疫反应,但对虾中具体参与该途径的成员及抗病毒机制还不清楚。课题组首先发现了参与 RNA 干扰的关键分子—转录激活反应 RNA 结合蛋白(TRBP)在病毒刺激后上调表达,然后利用 T7 噬菌体展示文库筛选到与 TRBP 相互作用的蛋白—真核翻译起始因子 6(eIF6)^[34]。利用重组表达的两种蛋白进行 Pull-down 分析,发现在 TRBP 的 3 个双链 RNA 结合结构域(A, B 和 C)中,B 和 C 介导了其真核翻译起始因子 6(eIF6)的互作,共同参与沉默复合体的组成。采用 Gel-shift 分析,发现 TRBP 的结构域 A 可以结合 dsRNA,将双链 RNA 带到沉默复合体,过表达 TRBP 蛋白可抑制 WSSV 在对虾体内的复制;利用 RNA 干扰技术敲降 TRBP 和 eIF6 的表达,均能促进对虾体内 WSSV 的增殖。上述结果表明,作为对虾 RNA 干扰途径的关键成员,TRBP 和 eIF6 两种蛋白协作,共同参与 dsRNA 介导的 RNA 干扰抗病毒途径,发挥抗病毒功能^[35]。这是对对虾 RNA 干扰抗病毒途径机理的首次阐释。加拿大麦吉尔大学微生物和免疫学教授、TRBP 的克隆者 Anne Gagnon 认为 TRBP 的功能“在对虾中得到了很好的研究^[36]”。

(5) 对虾泛素化途径抑制病毒复制的机理:泛素化途径通过对靶蛋白进行特异修饰参与对生命活动的调控。研究发现泛素化结合酶 E2 (FcUbc) 可被 WSSV 感染显著诱导表达,而过表达 FcUbc 可以明显抑制 WSSV 的复制。机制研究发现 FcUbc 能够结合病毒的 4 个含有 RING 结构域的蛋白(分别命名为 WSD1-4),但 FcUbc 的突变体不能与 WSD1-4 结合,并且注射重组的 FcUbc 突变体,不能抑制对虾体内 WSSV 的复制,说明两者的相互作用对 FcUbc 发挥抗病毒功能是必须的。进一步通过体外泛素化实验和果蝇 S2 细胞系上的实验,证实这种相互作用可导致病毒的 2 种蛋白(WSD2 和 WSD3)的泛素化和降解,从而抑制病毒的复制^[37]。该研究首次发现宿主泛素化途径通过直接泛素化病毒的功能蛋白而抑制病毒复制,也证实了双翅目昆虫果蝇 S2 细胞系不但支持病毒基因的复制,也能支持病毒某些蛋白的表达,可以部分弥补对虾与病原互作研究中缺乏对虾细胞系的不足。

(6) Rho GTP 酶家族成员 Cdc42 抑制 WSSV 的感染机理:研究发现日本囊对虾中 MjCdc42 在 WSSV 感染后会显著上调表达,在敲降 MjCdc42 表

达或使用其抑制剂时,会促进 WSSV 病毒在对虾体内的扩增,说明 MjCdc42 参与抗病毒免疫反应。为了研究 MjCdc42 的抗病毒机制,通过 Pull-down 和质谱分析鉴定到 MjCdc42 的互作蛋白即精氨酸激酶(MjAK)。通过 RNA 干扰、过表达和注射精氨酸激酶抑制剂等方法,证明 MjAK 具有促进病毒复制的功能。MjAK 可以与病毒的囊膜蛋白 VP26 相互作用,并为病毒复制提供能量。而 MjCdc42 抑制病毒复制的能力依赖于与 MjAK 的相互作用,即 MjCdc42 通过与 MjAK 酶活性位点相互作用、抑制其酶活性从而抑制病毒复制。本研究在日本囊对虾中阐明了抑制病毒复制的 MjCdc42-MjAK-VP26 途径。这是首次发现 Rho GTPase 家族成员 Cdc42 可以通过抑制精氨酸激酶活性而发挥抗病毒作用的新功能。该工作发表在 Journal of Virology 上^[38],并被杂志编辑选为当期的 Spotlight 论文,以“小 GTP 酶 Cdc42 抗 WSSV 的新机理”为题介绍了该文的新发现及意义。

2.2 宿主细胞抵御病原的效应分子

抗菌肽是生物体产生的一类小分子多肽,可以抑制或者杀灭细菌、真菌甚至病毒等病原微生物,作为免疫系统的效应分子起着重要的作用。从对虾中获得了 4 大类 20 多种具有显著抗菌活性的抗菌肽类分子,包括对虾素(Pen I 和 II)^[39]、抗脂多糖因子(ALF-A, B, C, D and E)^[40, 41]、甲壳肽(Crus-I, II 和 III)^[42, 43]和溶菌酶^[44]等二十多种抗菌活性物质,并研究了多种抗菌肽重组蛋白的抗菌活性和抗菌谱,对某些抗菌肽进行了初步应用研究。还发现有的抗菌肽不仅本身具有抗菌活性,还能调控血细胞的吞噬作用^[45]。

上述研究所揭示的信号途径的关键分子可以作为抗病品系培育的新靶标,抗菌肽等效应分子可以作为对虾养殖的饲料添加剂,用于对虾的病害防治。

3 胞内病原逃逸宿主免疫的分子机制

在宿主和病原的长期共同进化过程中,宿主产生了多样化的抵御病原的机制,同时病原也进化出了多种可逃逸宿主免疫系统的策略,因此宿主与病原之间始终存在着持续的“军备竞赛”,两者的博弈决定了宿主免疫和病原感染的胜负。课题组在研究中也发现了对虾病原 WSSV 的多种逃逸机制。

3.1 WSSV 利用 C-型凝集素 MjstvCL 感染宿主细胞的新机制

研究中模拟 WSSV 天然感染方式(经口感染病

毒),对对虾胃中的14种C-型凝集素在WSSV感染后的表达模式进行分析,发现一种与病毒感染相关且结构特殊的C-型凝集素分子Mj_{sv}CL。当病毒感染时,Mj_{sv}CL在胃中显著上调表达;敲降Mj_{sv}CL的表达,对虾体内病毒的复制受到抑制;过表达Mj_{sv}CL则促进病毒在对虾体内的复制,说明WSSV可以利用Mj_{sv}CL促进其在对虾体内的复制。进一步研究发现,Mj_{sv}CL可以与病毒的囊膜蛋白VP28等相互作用,通过Pull down技术和质谱鉴定,发现Mj_{sv}CL还可以与细胞表面的钙网蛋白(CRT)相互作用,促进病毒的感染与复制;而利用甲基-β-环糊精(可以去除细胞膜脂筏中的胆固醇)处理血细胞,Mj_{sv}CL促进病毒感染的作用就会减弱。因此,作为病毒粒子与细胞表面钙网蛋白CRT之间的桥梁,Mj_{sv}CL可被WSSV利用,并被细胞膜脂筏区域的CRT捕获。三者形成复合体后,使得病毒以一种胆固醇依赖的方式内吞入胞,从而促进病毒感染^[46]。该研究展示了一种WSSV劫持宿主分子入侵宿主细胞的新方式(图3-①)。本发现可以为抗病毒对虾品种的培育提供育种的靶标。Verbruggen et al.在综述中评价该工作时认为,与其他C-型凝集素的抗病毒感染不同,Mj_{sv}CL可以促进WSSV感染,凝集素的这种双重作用象征着病毒和宿主免疫系统之间的军备竞赛,这种现象在人类的多种病毒中也有发现^[2]。

3.2 SUMO化途径有利于病毒复制的机理

课题组的研究鉴定了螯虾SUMO化系统的两个重要组分,UBC9和SUMO。它们受WSSV刺激后上调表达。过表达UBC9或SUMO可以增强WSSV的基因复制,而RNA干扰UBC9或SUMO,可抑制病毒极早期基因和晚期基因的表达,再过表达UBC9或SUMO则解除这种抑制,使WSSV基因表达恢复正常。发现UBC9蛋白可以结合WSSV的极早期蛋白并使其发生SUMO化修饰,说明对虾体内的SUMO化途径可以被WSSV所“绑架”而用来修饰自身的极早期(IE)蛋白,而SUMO化修饰的IE蛋白可以作为转录因子/转录激活子,促进病毒基因的转录,从而促进病毒复制(图3-②)^[47]。本研究发现了一种全新的WSSV利用宿主SUMO化途径逃逸宿主免疫系统的机制。

上述病毒侵染所劫持的宿主分子可作为抗性品系培育的靶标分子,后续研究可利用CRISPR等基因编辑技术敲除该基因,培育抗特定病原的对虾品系。

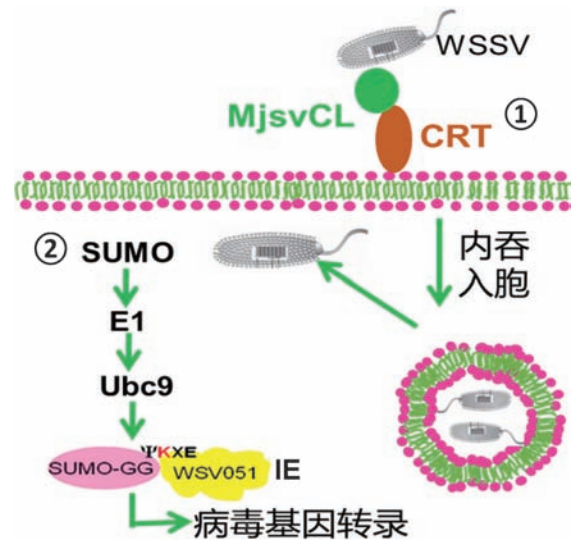


图3 病原逃逸宿主免疫的分子机制

4 总结与展望

在国家自然科学基金面上和重点项目的资助下,课题组围绕着对虾免疫系统与病原微生物之间的相互作用开展研究,取得了3方面的创新性成果。1. 揭示了对虾抵御病原入侵的细胞和分子机制,主要阐释了不同的模式识别受体的识别和防御病原的机理。2. 发现了病原侵入机体后宿主细胞抵御病原的信号途径及效应机制。主要揭示了对虾Toll和IMD和JAK/STAT途径的功能、特异性及调控机理。3. 阐明了胞内病原逃逸宿主免疫的分子机制。阐释了WSSV劫持宿主分子帮助自身入侵细胞和胞内复制的机理。相关研究分别发表在PLoS Pathogens(2篇)、Journal of Immunology(3篇)、Journal of Virology(4篇)和Journal of Biological Chemistry(3篇)等杂志,并在其他无脊椎动物免疫学主流刊物上有系列文章发表,在国内外产生了一定的影响。

虽然我国在对虾先天性免疫的理论研究上取得了较大进展,在对虾病害防控中也发展出了一些有效预防病害的养殖模式和方法,在一些方面处在国际领先地位,但对虾养殖中总是不断出现新的病害,所以还有很多问题值得进一步深入研究。

(1) 对虾的“免疫”治疗的理论基础研究及免疫刺激剂的开发。免疫治疗在脊椎动物疾病防控中是一种非常有效的方法,但对虾缺少抗体驱动的获得性免疫,在病害防控中能否实施免疫防控一直存在争论。有很多报道利用灭活的病原菌或病毒刺激对虾可以提高对虾抗该种病原的能力,或者用免疫刺激剂进行免疫致敏也可以对对虾具有保护作用,

Chang 等对前期相关研究进行了详细综述^[48]。但这种免疫保护的具体作用机理还不清楚。所以需要开展免疫致敏(也叫做训练免疫)及免疫记忆的机理研究,可以为对虾免疫防控提供指导。

(2) 对虾免疫系统功能的多样性和特殊性研究。对虾先天免疫系统与果蝇等昆虫的免疫系统有一定的相似性,但也存在不小的差异,例如在昆虫中,肽聚糖识别蛋白是一类主要的模式识别受体,在免疫防御中发挥重要功能。例如肽聚糖识别蛋白 LC 是果蝇 IMD 途径的受体。但在对虾等甲壳动物中,包括在已经基因组测序的端足类甲壳动物 *Parhyale hawaiiensis* 中均没有发现肽聚糖识别蛋白^[49]。因此由哪些模式识别受体行使肽聚糖识别蛋白的功能? 对虾中存在的 IMD 信号途径如何被激活,该途径的受体是什么等等,这些都值得进一步研究。

(3) 甲壳类实验动物品系的建立。虽然对虾作为先天免疫的材料具有本身的优势,研究成果可以直接应用于养殖实践。但对虾作为实验动物,也有其本身的缺点:生长周期较长;在实验室内长期保持不同的实验品系,实验成本非常大;对养殖及繁殖条件要求相对较高,实验室内也很难进行基因编辑方面的遗传操作。因此需要开发与养殖对虾亲缘关系较近的、生长周期较短、易于实验室内繁殖、养殖成本经济的小型甲壳类作为模式动物。

在加强基础研究的同时,力争将基础研究成果尽快转化到对虾养殖的实践中。还需要积极吸纳和利用新的生物技术,结合基础研究的成果,培育抗病对虾新品种。我国有一支活跃的对虾等无脊椎动物免疫研究队伍,研究工作的进展和不断深入将对虾养殖中的病害防控提供强大支撑,并推动对虾养殖业的健康发展。

致谢 本文工作得到国家自然科学基金重点项目(项目批准号:31130056,31630084)等资助。对课题组全体老师和本实验室的所有研究生的努力工作表示感谢!感谢国家自然科学基金委员会胡景杰教授对本文写作的建议和修改。

参 考 文 献

[1] Bondad-Reantaso MG, Subasinghe RP, Josupeit H, et al. The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: past, present and future. *J Invertebr Pathol*, 2012, 110:158—165.

[2] Verbruggen B, Bickley LK, van Aerle R, et al. Molecular Mechanisms of White Spot Syndrome Virus Infection and Perspectives on Treatments. *Viruses*, 2016, 8: pii: v8010023.

[3] Tran L, Nunan L, Redman RM, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ*, 2013, 105:45—55.

[4] Li F, Xiang J. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Dev Comp Immunol*, 2013, 39:11—26.

[5] Wang XW, Wang JX. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Dev Comp Immunol*, 2013, 39: 27—38.

[6] Xu S, Wang L, Wang XW, et al. L-Type lectin from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev Comp Immunol*, 2014, 44:397—405.

[7] Wang XW, Wang JX. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34:981—989.

[8] Shi XZ, Wang L, Xu S, et al. A galectin from the kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) functions as an opsonin and promotes bacterial clearance from hemolymph. *PLoS One*, 2014, 9:e91794.

[9] Du XJ, Zhao XF, Wang JX. Molecular cloning and characterization of a lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mol Immunol*, 2007, 44:1085—1094.

[10] Zhang Q, Wang XQ, Jiang HS, et al. Calnexin functions in antibacterial immunity of *Marsupenaeus japonicus*. *Dev Comp Immunol*, 2014, 46:356—363.

[11] Chai YM, Zhu Q, Yu SS, et al. A novel protein with a fibrinogen-like domain involved in the innate immune response of *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 32:307—315.

[12] Sun JJ, Lan JF, Shi XZ, et al. A fibrinogen-related protein (FREP) is involved in the antibacterial immunity of *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 39:296—304.

[13] Bi WJ, Li DX, Xu YH, et al. Scavenger receptor B protects shrimp from bacteria by enhancing phagocytosis and regulating expression of antimicrobial peptides. *Dev Comp Immunol*, 2015, 51:10—21.

[14] Du XJ, Wang JX, Liu N, et al. Identification and molecular characterization of a peritrophin-like protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mol Immunol*, 2006, 43:1633—1644.

[15] Wang XW, Wang JX. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34:981—989.

[16] Pees B, Yang W, Zarate-Potes A, et al. High Innate Immune Specificity through Diversified C-Type Lectin-Like Domain Proteins in Invertebrates. *J Innate Immun*, 2016, 8: 129—142.

- [17] Wang XW, Gao J, Xu YH, et al. Novel Pattern Recognition Receptor Protects Shrimp by Preventing Bacterial Colonization and Promoting Phagocytosis. *J Immunol*, 2017, 198: 3045—3057.
- [18] Wang XW, Wang JX. Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. *Mol Immunol*, 2015, 68:404—411.
- [19] Wang XW, Xu JD, Zhao XF, et al. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. *J Biol Chem*, 2014, 289:11779—11790.
- [20] Yang MC, Shi XZ, Yang HT, et al. Scavenger Receptor C Mediates Phagocytosis of White Spot Syndrome Virus and Restricts Virus Proliferation in Shrimp. *PLoS Pathog*, 2016, 12:e1006127.
- [21] Yang MC, Yang HT, Li J, et al. Scavenger receptor C promotes bacterial clearance in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* by enhancing hemocyte phagocytosis and AMP expression. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 67:254—262.
- [22] Lan JF, Li XC, Sun JJ, et al. Prohibitin Interacts with envelope proteins of white spot syndrome virus and prevents infection in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *J Virol*, 2013, 87:12756—12765.
- [23] Xu YH, Bi WJ, Wang XW, et al. Two novel C-type lectins with a low-density lipoprotein receptor class A domain have antiviral function in the shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Dev Comp Immunol*, 2014, 42:323—332.
- [24] Zhang XW, Wang Y, Wang XW, et al. A C-type lectin with an immunoglobulin-like domain promotes phagocytosis of hemocytes in crayfish *Procambarus clarkii*. *Sci Rep*, 2016, 6:29924.
- [25] Wang XW, Zhang HW, Li X, et al. Characterization of a C-type lectin (PcLec2) as an upstream detector in the phenoloxidase activating system of red swamp crayfish. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 30:241—247.
- [26] Mu Y, Lan JF, Zhang XW, et al. A vector that expresses VP28 of WSSV can protect red swamp crayfish from white spot disease. *Dev Comp Immunol*. 2012, 36:442—449.
- [27] Sun JJ, Xu S, He ZH, et al. Activation of Toll Pathway Is Different between Kuruma Shrimp and *Drosophila*. *Front Immunol*, 2017, 8:1151.
- [28] Sun JJ, Lan JF, Shi XZ, et al. beta-Arrestins Negatively Regulate the Toll Pathway in Shrimp by Preventing Dorsal Translocation and Inhibiting Dorsal Transcriptional Activity. *J Biol Chem*, 2016, 291:7488—7504.
- [29] Lan JF, Zhou J, Zhang XW, et al. Characterization of an immune deficiency homolog (IMD) in shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) and crayfish (*Procambarus clarkii*). *Dev Comp Immunol*. 2013, 41:608—617.
- [30] Liu N, Wang XW, Sun JJ, et al. Akirin interacts with Bap60 and 14-3-3 proteins to regulate the expression of antimicrobial peptides in the kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Dev Comp Immunol*. 2016, 55:80—89.
- [31] Sun JJ, Lan JF, Zhao XF, et al. Binding of a C-type lectin's coiled-coil domain to the Domeless receptor directly activates the JAK/STAT pathway in the shrimp immune response to bacterial infection. *PLoS Pathog*, 2017, 13:e1006626.
- [32] Sun JJ, Yang HT, Niu GJ, et al. beta-Arrestin 1's Interaction with TC45 Attenuates Stat signaling by dephosphorylating Stat to inhibit antimicrobial peptide expression. *Sci Rep*, 2016, 6:35808.
- [33] Sun JJ, Lan JF, Xu JD, et al. Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) negatively regulates the expression of antimicrobial peptides by affecting the Stat transcriptional activity in shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 56:473—482.
- [34] Wang S, Liu N, Chen AJ, et al. TRBP homolog interacts with eukaryotic initiation factor 6 (eIF6) in *Fenneropenaeus chinensis*. *J Immunol*, 2009, 182:5250—5258.
- [35] Wang S, Chen AJ, Shi LJ, et al. TRBP and eIF6 homologue in *Marsupenaeus japonicus* play crucial roles in antiviral response. *PLoS One*, 2012, 7:e30057.
- [36] Daniels SM, Gatignol A. The multiple functions of TRBP, at the hub of cell responses to viruses, stress, and cancer. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76:652—666.
- [37] Chen AJ, Wang S, Zhao XF, et al. Enzyme E2 from Chinese white shrimp inhibits replication of white spot syndrome virus and ubiquitinates its RING domain proteins. *J Virol*, 2011, 85:8069—8079.
- [38] Xu JD, Jiang HS, Wei TD, et al. Interaction of the Small GTPase Cdc42 with Arginine Kinase Restricts White Spot Syndrome Virus in Shrimp. *J Virol*, 2017, 91:e01916—16.
- [39] An MY, Gao J, Zhao XF, et al. A new subfamily of penaeidin with an additional serine-rich region from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) contributes to antimicrobial and phagocytic activities. *Dev Comp Immunol*, 2016, 59: 186—198.
- [40] Jiang HS, Zhang Q, Zhao YR, et al. A new group of anti-lipopopolysaccharide factors from *Marsupenaeus japonicus* functions in antibacterial response. *Dev Comp Immunol*, 2015, 48:33—42.
- [41] Sun C, Xu WT, Zhang HW, et al. An anti-lipopopolysaccharide factor from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, exhibited antimicrobial activities in vitro and in vivo. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 30:295—303.
- [42] Jiang HS, Jia WM, Zhao XF, et al. Four crustins involved in antibacterial responses in *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*. 2015 43:387—395.
- [43] Jiang HS, Sun C, Wang T, et al. A single whey acidic protein domain containing protein (SWD) inhibits bacteria invasion and dissemination in shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 35:310—318.
- [44] Zhang HW, Sun C, Sun SS, et al. Functional analysis of two invertebrate-type lysozymes from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29: 1066—1072.
- [45] Liu N, Lan JF, Sun JJ, et al. A novel crustin from *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev Comp Immunol*, 2015, 49:313—22.
- [46] Wang XW, Xu YH, Xu JD, et al. Collaboration between a soluble C-type lectin and calreticulin facilitates white spot syndrome virus infection in shrimp. *J Immunol*, 2014, 193: 2106—2117.
- [47] Chen AJ, Gao L, Wang XW, et al. SUMO-conjugating enzyme E2 UBC9 mediates viral immediate-early protein SUMOylation in crayfish to facilitate reproduction of white spot syndrome virus. *J Virol*, 2013, 87:636—647.

[48] Chang YH, Kumar R, Ng TH, et al. What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish. *Dev Comp Immunol*, 2018, 80:53—66.

[49] Kao D, Lai AG, Stamatakis E, et al. The genome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion. *Elife*. 2016, 5.

Cellular and molecular mechanisms of host and pathogen interactions in shrimp innate immunity

Wang Jinxing Wang Xianwei

(*Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Cells and Developmental Biology, School of Life Sciences; State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100*)

Abstract Shrimp aquaculture creates tens billion US dollars per year in the world. However, the outbreak of diseases often causes huge economic losses to the shrimp farming. For disease control in prawn breeding and the requirements of the shrimp aquaculture, Dr. Wang and his colleagues investigated the shrimp immune defense and the interaction between the shrimp and pathogen under the funding of NSFC key and general programs. Their studies focus on the interactions of host and pathogens in shrimp innate immunity and revealed multiple mechanisms how shrimp resist the extracellular pathogens invasion, the host immune signaling pathways, such as Toll, IMD and JAK/STAT pathways and effectors regulated by the pathways against pathogens after pathogen entry, and the mechanisms how pathogens (such as WSSV) escape from the surveillance of host immunity via C-type lectin and cholesterol dependent manner for its entry and iel sumoylation for viral replication. This research has significance in disease control and breeding of shrimp aquaculture.

Key words pattern recognition receptors; immune related signal pathways; white spot syndrome virus; *Vibrio*; immunologic escape