

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2025.01.001

· 基础研究 ·

藻毒素对虹彩病毒感染虾类的影响研究*

李秋萌¹ 吴佳俊² 刘晓湾² 陈荔² 唐思¹ 周进^{1Δ}

(1 清华大学深圳国际研究生院 海洋工程研究院 广东 深圳 518055;

2 香港城市大学海洋污染全国重点实验室 香港 999077)

摘要目的:探讨藻类毒素对水产病毒的抑制作用及宿主保护作用。**方法:**采用毛细管挑取法分离了亚历山大藻(*Alexandrium sp.*)和刚比甲藻(*Gambierdisc sp.*)两种典型的产毒甲藻,高效液相色谱法(HPLC)测定显示前者具有产水溶性毒素-麻痹性贝类毒素(PST)的能力;后者具有产脂溶性毒素-雪卡毒素(CXT)的能力。将两种藻类毒素与南美白对虾进行低剂量(nM级别)暴露后,进行虹彩病毒感染,测定了感染率和相关基因表达的情况,分析了免疫刺激效果和分子应答机制。**结果:**经过 PST 和 CXT 藻毒素暴露的对虾,感染虹彩病毒的几率下降了 30.83%和 65.84%。RT-PCR 结果表明藻毒素暴露激活了宿主的免疫系统,一些涉及免疫防御基因(Lv β -catenin 家族成员、Hsp70、lectin、 β -GBP-HDL、Dscam),抗应激响应基因(SOD、CAT、ACP、AKP、PO)以及细胞凋亡基因(Bantam)的表达上调了 2 倍以上。**结论:**低剂量的藻毒素表现出瞬时毒物兴奋效应,增强了机体对外源病毒的抵抗能力。

关键词:藻毒素;虹彩病毒;对虾;免疫兴奋效应;抗病毒效果

中图分类号: N91 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2025)01-1-10

The Influence of Algal Toxins on Iridovirus-infected *Penaeus Vannamei**LI Qiu-meng¹, WU Jia-jun², LIU Xiao-wan², CHEN Li (Leo Chan)², TANG Si¹, ZHOU Jin^{1Δ}

(1 Institute for Ocean Engineering, Shenzhen International Graduate School, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518055, China;

2 State Key Laboratory in Marine Pollution, City University of Hong Kong, Hong Kong, 999077, China)

ABSTRACT Objective: Exploring the inhibitory role of algal toxins on aquatic viruses. **Methods:** Two typical toxin-producing algae (*Alexandrium sp.* and *Gambierdisc sp.*) were isolated by capillary picking. After detected by HPLC (high performance liquid chromatography) method, we found that the former (*Alexandrium sp.*) had the ability to produce the water-soluble toxin (paralytic shellfish toxin, PST), and the latter (*Gambierdisc sp.*) had the ability to produce the fat-soluble toxin (ciguatoxin, CXT). During the animal experiment, the shrimp (*Penaeus vannamei*) was exposed by two algal toxins at low-dose concentration (nM level). Then, the shrimp were infected by the iridovirus. The infection rate and shrimp related functional genes expression were determined. Meanwhile, the immunostimulatory effects and molecular response mechanisms were also analyzed. **Results:** Compared with the

* 基金项目:深圳市科技创新局可持续发展专项(KCXFZ20230731093402005);

深港科技计划 C 类专项(SGD20220530111204028)

作者简介:李秋萌(2002-),硕士研究生,从事海洋生态学研究,E-mail: qm-li24@mails.tsinghua.edu.cn

Δ 通讯作者:周进,E-mail: zhou.jin@sz.tsinghua.edu.cn

(收稿日期: 2024-08-28)

control group, the infection rate was decreased by 30.83% and 65.84% in PSTs and CXTs experimental groups. The RT-PCR results indicated that algal toxin exposure activated the host immune system, and the expression of genes involved in immunoprevention (Lv β -catenin family members, Hsp70, lectin, β -GBP-HDL, Dscam), anti-stress response genes (SOD, CAT, ACP, PO, AKP), and apoptosis genes (Bantam) were up-regulated more than 2-fold in experimental groups. **Conclusions:** This work confirmed that low doses of algal toxin exposure enhanced the animal's resistance to exogenous viruses. The possible protective mechanism is toxins activate the shrimp's immune function and enhanced their defence ability to viruses. This study improves our understanding of the "fighting poison with poison" effect of algal toxins. The immune-enhancing effect induced by low-dose algal toxins can be used as a potential strategy for aquatic animals' protection.

Key words: Algae toxins; Iridovirus; *Penaeus vannamei*; Immunoexcitatory effects; Anti-viral ability

Chinese Library Classification(CLC): N91 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2025)01-1-10

前言

近年来对虾养殖面临困扰,除了种质及环境因素外,病毒性疾病成为导致对虾减产的重要原因之一。在我国,病毒性疾病会导致40-100%的虾类死亡^[1]。包括新西兰、澳大利亚等欧洲国家及韩国也经历了大规模的对虾死亡事件,这些事件大多与对虾虹彩病毒有关^[2]。目前防控虹彩病毒的方法主要包括疫苗的开发、干扰素的使用、抗病毒肽的研制等;这些方法虽有一定的效果,但存在研发成本高、周期长等不足的弊端^[3]。近期,有学者提出提高抗病毒效果最有效的方式依然是提升机体的免疫力,除了营养改善、免疫制剂的使用外^[3];也涌现出一些新思路,即利用毒物的瞬时或低剂量刺激,激活免疫功能,帮助机体过渡易感期或易感环境^[4]。例如,使用藻类毒素提高鱼类的抗氧化能力,帮助动物抵御不良环境;同时一些藻类毒素还被用于激活细胞免疫,抑制肿瘤细胞的增殖^[5]。

近年的研究发现,在养殖环境中经常有一些有毒甲藻,如亚历山大藻(*Alexandrium sp.*),裸甲藻(*Gymnodinium sp.*)以及底栖刚比甲藻(*Gambierdisc sp.*)的暴发,这些藻类能产生麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish poisoning toxins, PST)或雪卡毒素(ciguatoxins, CTX)^[6,7]。而实际的育苗环境中,如果含有低剂量藻细胞 10^2 - 10^3 cells mL⁻¹)其育苗存活率更高。因此推测虾类可能受低剂量藻毒素刺激,激发了免疫系统,降低了病原生物体的感染。事实上,前期也有一些类似的报道称,da Silva等人发现马尼拉蛤接触有毒甲藻 *Karenia selliformis* 的毒素两周后,感染

Perkinsus olseni 的强度降低,这是因为藻类对 *Perkinsus olseni* 有直接抗性或者其藻毒素间接激活了宿主的防御系统^[8]。随后,有学者从免疫角度证实藻类毒素会改变贝类对病原体的易感性^[9]。He' garet等人认为藻毒素暴露会影响宿主的生理或免疫状态,从而改变宿主与病原体之间的相互作用^[10]。这些结果一定程度上支持了我们的假设,然而,其实际的科学证据和背后机理仍需要验证,尤其是藻毒素对虾类病毒病的保护上尚未被报道。

本研究以南美白对虾(*Penaeus vannamei*)为受试生物,以甲藻为评估目标,考察了主要甲藻的产毒能力,纯化了水溶性 PST 和脂溶性 CTX 毒素,并进行了低剂量的暴露,分析了免疫刺激效果和分子应答机制。该工作旨在明确藻毒素低剂量激发效应,以期为虾类的病毒防控探寻新的思路。

1 材料和方法

1.1 藻类培养及优选

甲藻源自深圳市周边海域,采用浮游植物网收集自然海水样本,带回实验室后采用毛细管挑取法分离藻类^[11],借助形态鉴别法对藻类进行初步鉴定。藻细胞形态和密度通过光学显微镜完成。甲藻通用培养基及条件为:培养液采用 f/2 培养基,温度为 22 ± 1 °C,光照强度 $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$,光暗比 12 h : 12 h。藻类培养所用的海水经 $0.22 \mu\text{m}$ 纤维滤膜过滤做除菌处理^[12],分离培养过程中选择生长良好的藻株用于后续实验。本次实验中我们筛选了两种甲藻用于后续实验,亚历山大藻 *Alexandrium sp.* 和刚

比甲藻 *Gambierdiscus sp.*。

1.2 藻毒素的检测与制备

1.2.1 麻痹性贝类毒素 (PST) 取平台期的亚历山大藻 500 mL, 藻密度 1.0×10^4 cells/mL, 冷冻离心后体积为 8 mL, 然后在离心管中加入 0.05 mol/L 乙酸溶液 6 mL, 在冰浴中超声破碎 (15 s/次、间隔 10 s、处理时间 10 min), 高速冷冻离心后取其上清液使用 0.45 μm 纤维滤膜过滤, 滤液 -20°C 保存用于后续的毒素分析。

毒素采用高效液相色谱法 (HPLC) 进行测定^[13], 实验所用的麻痹性贝类毒素 (PST) 为 GTX1 标准品 (浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$)。HPLC 组件包括: Waters 600A 高压泵用于输送洗脱液; WISP 自动进样器进样; Waters Nova-Pak C18 反相柱 (3.9 \times 150 mm, 60 A, 4 μm) 用于毒素分离, 柱后衍生应用 Waters 双头泵分别输送氧化剂和酸化剂, 用 Waters 温度控制装置进行温度控制, 衍生温度为 80°C 。应用 Waters 474 荧光检测器 (Fluorescence Detection, FD) 检测毒素, 激发波长为 330 nm, 发射波长为 390 nm, 采用 Waters 2010 Millennium 管理软件进行处理。分析过程采用等梯度洗脱, 洗脱液为含有 3 mmol/L 庚基磺酸盐离子对的 10 mmol/L 磷酸铵缓冲液, pH 为 7.0; 洗脱液的流速为 0.5 mL/min。分析过程采用的溶剂均为色谱纯, 其它化学试剂为分析纯, 使用前先经过 0.45 μm 纤维滤膜过滤。液相色谱用水是由 Millipore 纯水仪制备的超纯水。

麻痹性贝类毒素 GTX1 的制备, 采用制备型色谱柱进行分离纯化, 条件如下: 色谱柱: XB-C18 柱 (21.2 \times 250 mm, 10 μm); 柱温: 室温; 流动相 A: 水, 流动相 B: 乙腈; 流速: 15 mL/min; 进样量: 10 mL; 馏分收集器: 3 min/管; 梯度: 0~40 min, B: 20%~80%; 40~45 min, B: 80%~100%; 45~60 min, B: 100%。

1.2.2 雪卡毒素 CTX 刚比甲藻在 K 培养基中培养到平台期, 取藻液 300 mL, 藻密度 1.0×10^3 cells/mL, 在 4°C 条件下离心, 去上清取沉淀, 在冰浴中超声破碎 (15 s/次, 间隔 10 s, 处理时间 10 min), 高速冷冻离心后取其上清液使用 0.45 μm 纤维滤膜过滤, 滤液 -20°C 保存。

雪卡毒素标准品 P-CTX-1 由香港城市大学海洋污染国家重点实验室制备。毒素的检测采用色谱-质谱联用技术进行^[14]。色谱条件如下:

C18 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); A 相: 水 + 2 mmol/L 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸); B 相: 95% 乙腈 + 2 mmol/L 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸)。流速为 200 $\mu\text{L/min}$, 柱温为 30°C , 进样体积为 10 μL 。线性梯度进行洗脱^[11]; 质谱条件为: 正离子模式 (ESI+) 下喷雾电压为 5500 V, 雾化气压力 207 kPa (GS1, 30 psi), 去溶剂气压力为 276 kPa (GS2, 40 psi), 碰撞气压力为 62.1 kPa (CAD, 9psi), 离子源温度为 400°C 。

1.3 无特定病原体 (SPF) 对虾

本研究中使用的南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 来自单一群体, 由珠江水产研究所李宁求教授团队惠赠。其虹彩病毒的携带筛查通过 qPCR 进行分析。在虾苗幼体阶段和 3 个月龄期各测量一次; 该群组的结果均为阴性 (由 IDHESA 进行分析)。实验开始时, 对虾 4 月龄, 长度为 23.1 ± 0.2 毫米, 重量为 1.45 ± 0.3 克。实验期间, 连续充气, 水温控制在 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。每天投喂 3 次, 日投喂量约为对虾体重的 5%。实验周期中 24 h 换水 1 次, 换水量为养殖水体的 1/3。

1.4 藻毒素的暴露

SPF 对虾幼体在实验开始前, 先在水族箱中 (40 L) 暂养三天, 水族箱中装有开放式系统过滤海水, 经紫外线处理, 温度为 23°C 。暂养后将实验共分 4 组: 空白组 (120 只 SPF 虾 + 海水), 对照组 (120 只 SPF 虾 + 甲醇溶剂对照), GTX 暴露组 (120 只 SPF 虾 + 1nM 的 GTX 毒素), CTX 暴露组 (120 只 SPF 虾 + 1nM 的 CTX 毒素, 用甲醇做溶剂), 甲醇在养殖体系中的终浓度为 0.001% (v/v)。暴露周期 4 天, 4 天后每组取 20 只收集肝胰腺进行 RNA 提取, 剩余的 100 只用于虹彩病毒感染实验。

1.5 RNA 的提取

采用 RNA 提取试剂盒 (MiniBEST Universal RNA Extraction Kit, TaKaRa) 提取虾组织中的 RNA。使用 NanoDrop1 ND-1000 紫外分光光度计在 260 nm 处测量核酸浓度, 并使用 260/230 nm 和 260/280 nm 检查纯度后调整至 3 ng/mL。用反转录试剂盒 (PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time Kit, TaKaRa) 制备 cDNA, 反应体系 10 μL , 于 -20°C 下保存。使用逆转录实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法测定肝胰腺免疫基因表达水平。借助 TaKaRa 公司的 TB Green

Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒,以内参基因(β -actin)为参比,测定样品的热休克蛋白 70 基因(*Hsp70*)、凝集素基因(*lectin*)、 β -1,3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白基因(β -1,3-*GBP-HDL*)、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、抗氧化酶等(*SOD*、*POD*、*CAT*、*ACP/AKP*)的表达水平,引物参照文献的方法^[15-18],统计于表 1,具体操作方法参照试剂盒说明书。

PCR 反应总体积为 25 μ L, 包括 2 \times TB Green PremixEx Taq II 12.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L (10 μ mol/L), DEPC 处理水 9.5 μ L。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C, 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。

1.6 对虾感染实验

人工感染实验所用毒种为患虹彩病毒的病虾,由珠江水产研究所鱼类疾病实验室提供,经 PCR 检测呈强阳性。取病虾头胸部去除肝胰腺后,捣碎、混合作为感染实验用对虾病料,分成小份,-80 $^{\circ}$ C 保存备用;待感染时拌入虾类饵料中进行投喂感染^[15],统计 10 天内的死亡率。

1.7 数据统计

实验数据采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,每个实验处理重复 3 次(n=3),不同实验组的数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),通过软件 SPSS17.0 进行数据统计分析, $P<0.05$ 即表示具有显著差异。对肝胰腺免疫基因表达水平的 RT-qPCR 实验结果,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析^[18],同样以 $P<0.05$ 表示为差异显著。

2 结果

2.1 甲藻的筛选

本次野外样本的采集中共镜检出形态可辨的藻种 21 种,于 24 孔板中能生长的藻种有 10 种,主要包括亚历山大藻 *Alexandrium sp.*, 刚比甲藻 *Gambierdiscus sp.*, 微拟球藻 *Nannochloris sp.*, 海链藻 *Thalassiosira sp.*, 蛎甲藻 *Ostreopsis sp.* 以及裸甲藻 *Gymnodinium sp.* 等,具体类别和形态统计于表 2。在这些藻种中,通过文献查阅^[11],具有产毒潜力且能生长较好的藻种为亚历山大藻 *Alexandrium sp.* 和刚比甲藻 *Gambierdiscus sp.*。

2.2 甲藻的生长及产毒特性

亚历山大藻 *Alexandrium sp.* 在 f/2 培养基中的生长周期大约为 22 天,第 5 天进入对数生长

期,15 天左右到达细胞密度峰值,为 7.5×10^3 cells/mL (图 1A); 相比之下刚比甲藻 *Gambierdiscus sp.* 在 K 培养基下的生长速度偏慢,整个生活周期 35 天,培养至 20 天达到峰值 (4.2×10^3 cells/mL)(图 1A)。对于其产藻毒素而言,经 HPLC 及 MS 数据解析及整理,PST 毒素和 CTX 毒素在藻类生长的不同阶段有不同的积累,其中共同的特征是在生长旺盛的平台期毒素积累量最多,且胞内比胞外更明显(图 1BC)。

2.3 虹彩病毒感染率

用毒素低剂量暴露对虾 4 天后,使用含虹彩病毒的对虾病料对各实验组进行人工感染。感染后第 2 天,对照组和空白组对虾即开始出现死亡,死亡率为 15.83%; 而 PSTs 暴露组无死亡情况、CTXs 暴露组对虾仅有少量死亡,死亡率为 4.16%。监测至第 7 天,对照组和空白组对虾几乎全部死亡,死亡率为 95.0%。而此时,PSTs 暴露组和 CTXs 暴露组累积死亡率分别为 29.16% 和 64.17%,均显著低于对照组($P<0.05$)(图 2)。同步对死亡对虾进行虹彩病毒 qPCR 检测,发现结果均呈强阳性,这表明攻毒实验起到了病毒感染作用。显然,经过藻毒素低剂量暴露后能够在一定程度上改变疾病的感染几率,延迟对虾的发病和死亡时间,提高对虾抗虹彩病毒感染的能力。

2.4 对虾免疫相关功能基因的表达

经藻毒素低剂量暴露 4 天后,检测了各组对虾肝胰腺免疫基因表达水平。抗氧化相关基因表达情况如图 3A 所示,对照组与空白组间无显著差异,PSTs 和 CTXs 在各组中的表达水平显著高于对照组和空白组。除此之外,PSTs 和 CTXs 暴露组 *Hsp70* 表达水平均显著高于对照组($P<0.05$),且 PSTs 添加组显著高于 CTXs 组($P<0.05$)(图 3B)。PST 暴露组 *lectin* 表达水平均显著高于对照组($P<0.05$)(图 3B)。PST 和 CTXs 暴露组 β -*GBP-HDL* 表达水平均显著低于对照组($P<0.05$),且 PSTs 暴露组的降幅更低(图 3A)($P<0.05$)。其它免疫相关功能基因的表达详见表 3,各类基因的表达水平具有 2 倍以上的差异;这些结果表明低剂量藻毒素的暴露具有瞬时激活对虾免疫功能的作用。

3 讨论

有毒微藻在我国海域广泛分布，本实验分离到多种产毒微藻，这些属于我国常见藻类名录，与文献报道的一致^[19]。对于藻毒素的提取

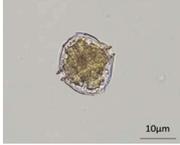
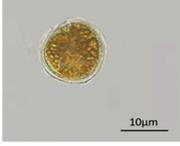
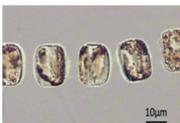
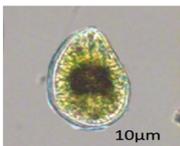
中，传统的藻毒素测定方法是生物小鼠法，根据不同的死亡时间，对照标准毒性表判断毒性的大小。生物小鼠法费时且需要消耗大量的实验

表 1 基因克隆及荧光定量引物序列

Table 1 The primer sequences of gene cloning and Real-time PCR

Gene names	Primer Sequence (5'-3')	Gene function
<i>Superoxide dismutase (SOD)</i>	F: TGGAAGCTCGCCTCGCTAAC R: TCTCCTGCTCTGCCTCACT	Free radical scavenging, antioxidant
<i>Phenoloxidase (PO)</i>	F: GACACCTTCCTCCTCACCAT R: CTTCGCCATTACGGTAACATA	Promoting oxidation reactions
<i>Acid phosphatase (ACP)</i>	F: TATACGCTAGTGGAGCTGGAA R: GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	Catalyzes the hydrolysis of phosphate monoesters under acidic conditions
<i>Alkaline phosphatase (AKP)</i>	F: CCACGAGACCACCTACAAC R: AGCGAGGGCAGTGATTTTC	Hydrolysis of phosphate esters to produce phosphoric acid
<i>Catalase (CAT)</i>	F: TCCAGTCAACCACCACCAATA R: CTCGTCGCTCACCATCCTTA	Catalyzed decomposition of hydrogen peroxide
<i>Heat Shock Proteins70 (Hsp70)</i>	F: CTCCAGGACTTCTTCAACG R: GGTCACGTCCAACAGCAAC	Aiding physiological folding and stretching of newly synthesised polypeptide bonds
<i>lectin</i>	F: TCAGAACTGCCTTGCATCAC R: CACGCCATTTGCTCATCCA	Promote cellular agglutination
<i>β-GBP-HDL</i>	F: ACGAGAACGGACAAGAAGTG R: TTCAGCATAGAAGCCATCAGG	Involved in lipid transport and immune response.
<i>miRNA gene: bantam</i>	F: TGAGATCATTGTGAAAGCTGATT R: TGATGATGTCAGCGAACAAAG	Cell differentiation and tissue development
<i>Dscam</i>	F: TCCAGTCAACCACCACCAATA R: CTCGTCGCTCACCATCCTTA	Participate in specific immune processes
<i>LOC113806982</i>	F: TGGCTGAAGTTCTGGAAACGA R: TCAGGGCTGCGGAAAGG	Immune-related genes
<i>LOC113825583</i>	F: CGCAGGATTCCAAGATG R: TCACGACCCTTGTGGC	Immune-related genes
<i>LOC113830596</i>	F: ATTACCCAACGAAGCCATTT R: ATTCTGCAAGATTTCCCTGA	Immune-related genes
<i>LOC113810905</i>	F: TAGGACTCGGAGGATCTGG R: GCGGGTTGGGTGTTGTAG	Immune-related genes
<i>LOC113829222</i>	F: TCACCTGCCTCAGAATCAA R: GTGGGCGACACTATCAACG	Immune-related genes
<i>LOC113807934</i>	F: TTATGAATCCTTTCGTCGTG R: GCGGTGTAAAGAATGGGTC	Immune-related genes
<i>LOC113818022</i>	F: CGAAATACGACGAGAACGG R: TGGTGGATACGCCAGGGT	Immune-related genes
<i>LOC113828784</i>	F: GACGGGCTTACAGGAATGGC R: CAGGTGGTGCAGATGGCTC	Immune-related genes
<i>LOC113829995</i>	F: CGCCGAAGACTTGCTGA R: CTGGTTCCGTCCGTGAT	Immune-related genes
<i>LOC113804143</i>	F: ACGGAACCCGACTCTACGC R: CCCTGTTTGGTGCATCTCA	Immune-related genes
<i>β-actin</i>	F: CCACGAGACCACCTACAAC R: AGCGAGGGCAGTGATTT	Major components of the cytoskeleton

表 2 分离得到的主要藻类及显微形态
Table 2 The isolated algae and their microscopic morphology

Number	Name	Algal toxins	Microscopic morphology
1	<i>Alexandrium sp.</i>	Paralytic shellfish poisoning (PSP)	
2	<i>Gambierdiscus sp.</i>	Ciguatoxin (CTX)	
3	<i>Nannochloris sp.</i>	/	
4	<i>Thalassiosira sp.</i>	/	
5	<i>Ostreopsis sp.</i>	Palytoxin (PTX)	
6	<i>Gymnodinium sp.</i>	neurotoxic shellfish poison (NSP)	
7	<i>Skeletonema sp.</i>	/	
8	<i>Noctiluca sp.</i>	/	
9	<i>Chaetoceros sp.</i>	/	
10	<i>Prorocentrum sp.</i>	Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)	

动物。近年来得到快速发展的高效液相色谱结合串联质谱(HPLC-MS/MS)技术方法,具有灵敏度高,准确性好,只需很少的样品量,特别是能够分析鉴定具有微小结构差别的毒素成分,以

及新的结构组分的优点^[20]。本文使用HPLC-MS/MS方法,分析了筛选微藻的水溶性和脂溶性藻毒素,进一步证实它是一种高效、快捷、准确的方法。

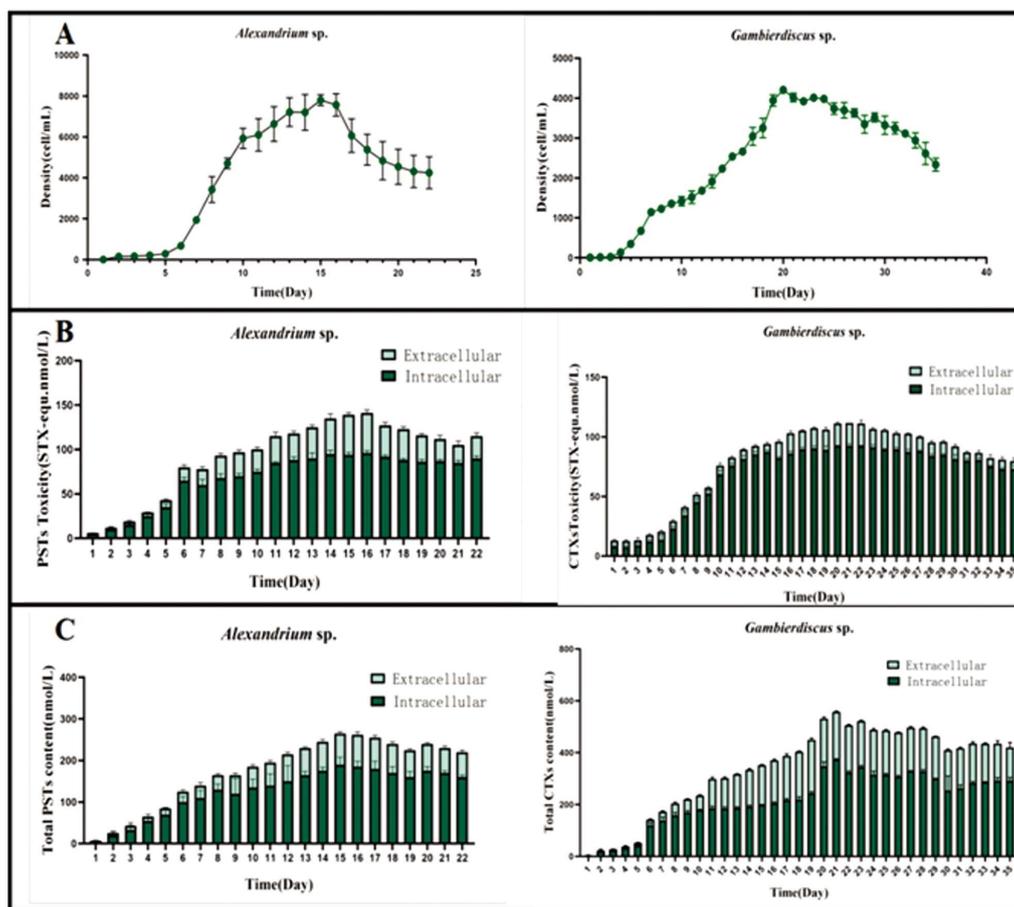


图 1 两种甲藻的生长曲线及产毒情况

Fig.1 Growth curves and toxicity production of two species of methanogens

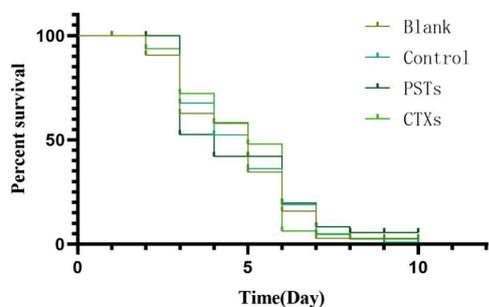


图 2 虹彩病毒投喂感染后各组对虾的存活率

Fig.2 Survival rate of shrimp in each group after iridovirus feeding infection

部分微藻可产生毒素，目前已发现的藻毒素及其衍生物多达 300 种^[21]。最初按照中毒症状被分为麻痹性贝类毒素 (paralytic shellfish poisoning toxins, PSTs)、腹泻性贝类毒素 (diarrhetic shellfish toxins, DSTs)、神经性贝类毒素 (neurotoxic shellfish toxins, NSTs)、记忆缺失性贝类毒素 (amnesic shellfish toxins, ASP)、雪卡毒素 (ciguatera fish toxins, CFTs) 和溶血性毒素 (haemolytic toxins, HTs) 等^[21]。后来根据化学结构将其分为八类，包括大田软海绵酸毒素

(okadaic acids, OAs)、蛤毒素 (pectenotoxins, PTXs)、氮杂螺环酸 (azaspiracids, AZAs)、短裸甲藻毒素 (brevetoxins, BTXs)、环亚胺类毒素 (cyclic imines, CIs)、虾夷扇贝毒素 (yessotoxins, YTXs)、软骨藻酸 (domoic acids, DAs) 和石房蛤毒素 (saxitoxins, STXs)^[22]。这些藻毒素常常在贝类体内积累，因此也常被称为“贝类毒素”。

近年来，对于藻毒素的研究不仅局限于灾害防控 (例如确保水源地饮用水安全)，在其应用方面也广受关注 (例如开发新药物)^[5]。藻毒素生物活性物质相关研究是海洋药物研究的重要方向。美国国家癌症研究院 (NIC) 对海洋赤海藻等生物进行了广泛研究，从中分离和鉴定出了多种天然活性物质，它们的特异化学结构与陆生天然活性物质有较大差异，其中许多具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗凝血等药理作用，成为研制新药的基础^[23]，如利用麻痹性贝毒素可制成高效麻痹剂、利用腹泻性贝毒素来改善人体蛋白酶活力。另外，刚比甲藻 (*Gambierdiscus toxicus*) 产生的雪卡毒素 CTX 具有强心功效；分

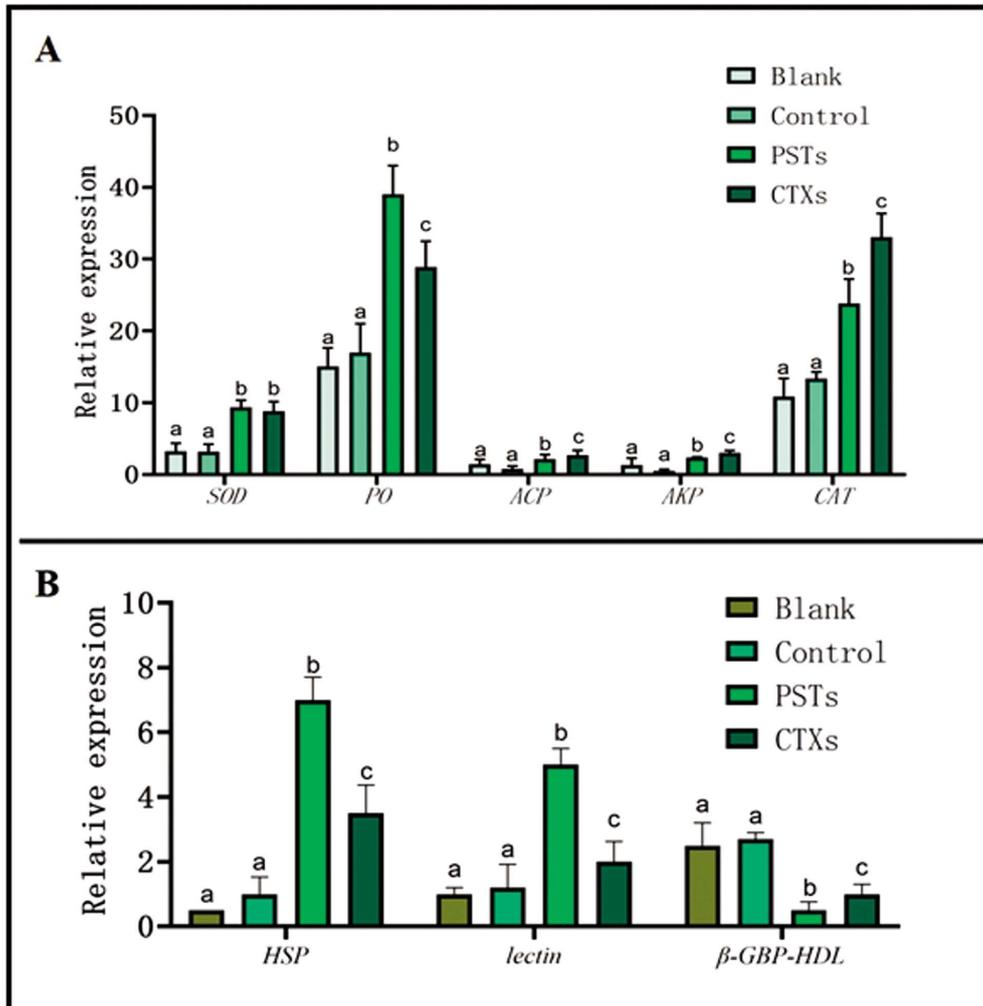


图 3 相关基因表达情况

Fig.3 Expression of related genes

表 3 其它免疫相关功能基因的表达情况

Table 3 RT-PCR express of other immunity related genes

	Blank	Control	PSTs	CTXs
miRNA gene: bantam	1 ± 0.14 ^a	1 ± 0.05 ^a	2.90 ± 0.82 ^b	2.77 ± 0.22 ^b
Dscam	1 ± 0.15 ^a	1 ± 0.12 ^a	2.94 ± 1.43 ^b	2.29 ± 0.98 ^b
LOC113806982	1 ± 1.75 ^a	1 ± 0.23 ^a	2.43 ± 0.6 ^b	2.33 ± 4.75 ^b
LOC113825583	1 ± 0.29 ^a	1 ± 0.6 ^a	17.30 ± 0.7 ^b	5.09 ± 0.56 ^c
LOC113830596	1 ± 0.55 ^a	1 ± 0.15 ^a	2.69 ± 0.62 ^b	2.70 ± 0.77 ^b
LOC113810905	1 ± 0.22 ^a	1 ± 0.04 ^a	2.01 ± 0.48 ^b	3.81 ± 0.42 ^c
LOC113829222	1 ± 0.32 ^a	1 ± 0.2 ^a	5.09 ± 1.21 ^b	2.17 ± 2.31 ^c
LOC113807934	1 ± 0.73 ^a	1 ± 0.65 ^a	2.95 ± 1.02 ^b	2.13 ± 3.77 ^b
LOC113818022	1 ± 0.44 ^a	1 ± 0.22 ^a	3.84 ± 0.98 ^b	2.13 ± 2.50 ^b
LOC113828784	1 ± 0.21 ^a	1 ± 0.7 ^a	4.81 ± 1.10 ^b	2.39 ± 4.26 ^b
LOC113829995	1 ± 0.52 ^a	1 ± 0.25 ^a	3.74 ± 1.01 ^b	2.12 ± 3.53 ^c
LOC113804143	1 ± 0.71 ^a	1 ± 0.88 ^a	2.38 ± 0.73 ^b	4.16 ± 2.12 ^c

Note: a, b, c president the significance ($P < 0.05$ level).

离的聚醚大环内酯化合物 goniodonin A 有抗真菌活性^[24];链膝沟藻(*Gonyaulax catenella*)产生的石房哈毒素(STX)具有降压作用^[25];从海蛤 *Cyclina sinensis* 提取的蛤素(mercenene)有很好的抗癌作用^[26];利马原甲藻 *Prorocentrum lima* 的次级分泌物大田软海绵酸(OA),对 KB 细胞有很强的抑制作用,也是一种肿瘤促进剂^[27]。

本实验证实接触藻毒素可以减少对虾的虹彩病毒感染,表明藻毒素除了具备上述功能,也具有免疫激发作用。这可能是毒物带来的兴奋效应,改变了生物体对病毒的免疫反应。攻毒实验中我们观察到暴露于藻毒素以后,虹彩病毒的患病率从 95% 显著降低至 29.16% 和 64.17%。在实验前我们也无意中发现:暴露于天然亚历山大藻水华的对虾中,感染虹彩病毒的几率降低。这些结果表明藻毒素通过调节对虾免疫反应,影响了病毒的增殖和毒力。Lassudrie 等^[28]研究发现双壳类动物接触亚历山大藻后会出现炎症反应,循环血细胞浓度增加,血细胞浸润和扩张,尤其是在消化腺。这可能会导致更快、更有效的防御,并加速虹彩病毒的清除、释放体液免疫因子,例如, $\alpha 2$ -巨球蛋白分子,它是血细胞中表达的蛋白酶抑制剂,在免疫防御中发挥作用^[29]。本次实验中,我们发现多种免疫相关因子如热休克蛋白 70 基因(*Hsp70*)、凝集素基因(*lectin*)和 β -1,3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白基因(β -1,3-*GBP-HDL*),都有显著的变化,进一步表明低剂量藻毒素的暴露激活了对虾的免疫系统,增强了对虹彩病毒的抵御能力,展示出类似于毒物兴奋效应的效果(Hormesis)^[30]。且热休克蛋白和凝集素在对虾抵御细菌和病毒感染方面发挥着重要作用,是对虾抗病毒和细菌感染的潜在生物标志物^[15]。

暴露于藻毒素还可以增加双壳类动物的氧化应激,从而改变病毒颗粒的含脂质包膜的完整性。已有研究表明暴露于藻毒素会调节对虾的抗氧化机制(酶活性或基因表达)^[28],而病毒包膜的氧化可能会降低病毒的生存能力,或者会改变病毒进入宿主的机制以及干扰病毒复制^[31]。我们的实验中发现一些主要的抗氧化蛋白,酚氧化酶基因 PO,超氧化物歧化酶基因 SOD,水解化合物基因 CAT,酸性/碱性磷酸酶基因 ACP/AKP 等都有上调表达,证实藻毒素的

暴露提高了对虾的氧化应激能力。我们推测藻毒素对病毒颗粒的毒性作用可能通过病毒含脂质包膜的裂解或氧化而发生,并影响其在水体中的传播过程。事实上,前人一些工作佐证了我们的推测,即 Paul-Pont 等人和 Evans 等人的实验,他们发现携带病毒的浮游细胞通过破坏病毒颗粒包膜,减少活病毒颗粒负载,从而降低了进入宿主的活病毒数量^[32,33]。

综上所述,本研究表明,低剂量毒素暴露激活了对虾的免疫防御功能,降低了虹彩病毒的感染几率,可能的机理在于微量毒素或许存在毒物兴奋效应,刺激了宿主的免疫系统,增强了对虾应对病原环境的能力。

参 考 文 献(References)

- [1] Lee D, Yu YB, Choi JH, et al. Viral Shrimp Diseases Listed by the OIE: A Review [J]. *Viruses*, 2022, 14(3): 585.
- [2] Arulmoorthy MP, Vijayan R, Sinduja K, et al. Infection with Decapod iridescent virus 1: an emerging disease in shrimp culture [J]. *Arch Microbiol*, 2022, 204(11): 685.
- [3] Wang PH, Huang T, Zhang X, et al. Antiviral defense in shrimp: from innate immunity to viral infection[J]. *Antiviral Res*, 2014, 108: 129-141.
- [4] 余梓荧, 曹程, 周进. 生物毒素抗病毒作用的研究进展[J]. *生命科学*, 2024, 36(7): 1-10.
- [5] 李秋萌, 曹程, 蔡中华, 等. 海洋藻类活性代谢产物的药用潜力[J]. *应用与环境生物学报*, 2024, 30(6): 1-11.
- [6] 李东岳, 邱江兵, 李爱峰, 等. 台湾海峡不同环境介质中藻毒素的污染现状分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2024, 37(1): 1-14
- [7] 于仁成, 吕颂辉, 齐雨藻, 等. 中国近海有害藻华研究现状与展望 [J]. *海洋与湖沼*, 2020, 51(7): 768-788.
- [8] da Silva, PM, Hé garet H, et al. Immunological responses of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a longterm exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions [J]. *Toxicon*, 2008, 51: 563-573.
- [9] Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, et al. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters *Crassostrea gigas*. *Aquat*[J]. *Toxicol*, 2010, 97

- (2): 96-108.
- [10] Hé garet, H Smolowitz, RM, et al. Combined effects of a parasite, QPX, and the harmful-alga *Prorocentrum minimum* on northern quahogs, *Mercenaria mercenaria* [J]. *Mar Environ Res*, 2010, 69: 337-344.
- [11] 张敏, 孔凡洲, 杨锐, 等. 2019-2021 年中国近海有毒有害微藻和藻毒素分布数据集 [J]. *中国科学数据(中英文网络版)*, 2024, 9(1): 222-234.
- [12] 宫于琛, 屈佩, 刘瑞娟, 等. 环境 CO₂ 浓度升高对海洋有毒微藻生长及产毒的影响研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 2023, 18(2): 141-151.
- [13] 李静, 晏萌, 沈金灿, 等. UPLC-MS/MS 测定海水、悬浮颗粒物及沉积物中 18 种藻毒素[J]. *分析测试学报*, 2023, 42(2): 81-188.
- [14] 刘仁沿, 梁玉波, 刘磊, 等. 液相色谱结合串联质谱方法研究中国沿海贝类中脂溶性藻毒素的种类结构和分布规律[J]. *生态环境学报*, 2014, 23(8): 1320-1326.
- [15] 王仁宝, 王一婷, 张惠芬, 等. 口服特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的免疫保护效果 [J]. *渔业科学进展*, 2022, 43(4): 226-233.
- [16] 杨忠明, 伍文豪, 施泓, 等. 凡纳滨对虾敲降 β -catenin 后感染白斑综合症病毒的转录组分析 [J]. *应用海洋学学报*, 2024, 35: 1-15.
- [17] 李旭鹏, 孔杰, 孟宪红, 等. WSSV 感染对中国明对虾 *bantam* 及其候选靶基因的影响 [J]. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 106-113.
- [18] 曹家旺, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国明对虾 *Dscam* 基因的克隆及其在免疫致敏(类免疫)诱导反应中的表达分析 [J]. *水产学报*, 2018, 42(5): 633-645.
- [19] 梁玉波, 李冬梅, 姚敬元, 等. 中国近海藻毒素及有毒微藻产毒原因种调查研究进展 [J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(3): 511-524.
- [20] 庞敏, 马新, 吴忠迅, 等. 海洋脂溶性藻毒素虾夷扇贝毒素产毒来源、毒性效应和检测技术研究进展 [J]. *海洋湖沼通报*, 2022, 44(06): 192-200.
- [21] Pires E, Lana PDC, Mafra LL. Phycotoxins and marine annelids - A global review [J]. *Harmful Algae*, 2023, 122: 102373.
- [22] Oh JW, Pushparaj SSC, Muthu M, et al. Review of harmful algal blooms (HABs) causing marine fish kills: toxicity and mitigation [J]. *Plants (Basel)*, 2023, 12(23): 3936.
- [23] Sharma PC, Sharma D, Sharma A, et al. Recent advances in microbial toxin-related strategies to combat cancer [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2022, 86(Pt 3): 753-768.
- [24] Harris CM, Krock B, Tillmann U, et al. Alkali metal- and acid-catalyzed interconversion of goniodomin a with congeners B and C [J]. *J Nat Prod*, 2021, 84(9): 2554-2567.
- [25] Dorantes-Aranda JJ, Seger A, Mardones JJ, et al. Progress in understanding algal bloom-mediated fish kills: the role of superoxide radicals, phycotoxins and fatty acids [J]. *PloS One*, 2015, 10(7): e0133549.
- [26] Yu F, Zhang Y, Ye L, et al. A novel anti-proliferative pentapeptide (ILYMP) isolated from *Cyclina sinensis* protein hydrolysate induces apoptosis of DU-145 prostate cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(1): 771-778.
- [27] Gu S, Xiao SW, Zheng JW, et al. ABC transporters in *prorocentrum lima* and their expression under different environmental conditions including okadaic acid production [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(5): 259.
- [28] Lassudrie M, Soudant P, Henry N, et al. Physiological responses of Manila clams *Venerupis (=Ruditapes) philippinarum* with varying parasite *Perkinsus olseni* burden to toxic algal *Alexandrium ostenfeldii* exposure [J]. *Aquat Toxicol*, 2014, 154: 27-38.
- [29] Jouaux A, Lafont M, Blin JL, et al. Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 590.
- [30] Csaba G. Hormesis and immunity: a review [J]. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 2019, 66(2): 155-168.
- [31] Lorizate M, Kräusslich HG. Role of lipids in virus replication [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3: a004820.
- [32] Paul-Pont I, Dhand NK, Whittington RJ. Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1 transmission [J]. *Dis. Aquat. Organ*, 2013, 105: 127-138.
- [33] Evans O, Paul-Pont I, Hick P, et al. A simple centrifugation method for improving the detection of ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in natural seawater samples with an assessment of the potential for particulate attachment [J]. *J Virol Methods*, 2014, 210: 59-66.