

[引用格式]任静,李泽宇,赵振业,等,大黄鱼和黄姑鱼对变形假单胞菌感染的抗病力差异及皮肤转录组分析[J].集美大学学报(自然科学版),2026,31(3):274-288. DOI:10.19715/j.jmuzr.2026.03.03

大黄鱼和黄姑鱼对变形假单胞菌感染的抗病力差异及皮肤转录组分析

任 静^{1,2}, 李泽宇^{1,2}, 赵振业^{1,2}, 金禹含^{1,2}, 韩 芳^{1,2}, 王志勇^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为了探究大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 和黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 对变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 感染的抗病力差异, 以及两种鱼皮肤在感染过程中的免疫应答差异, 采用浸泡和注射2种攻毒方式, 并在浸泡攻毒3、24、48 h后分别采集皮肤组织进行转录组测序分析。结果显示, 黄姑鱼发病率和死亡率显著低于大黄鱼, 说明黄姑鱼具有更强的抗感染能力; 浸泡攻毒第3天, 大黄鱼就开始出现染病死亡, 到第7天, 染病率和死亡率分别达到65.3%、37.5%, 而黄姑鱼则完全未出现死亡或染病现象; 注射攻毒第7天, 大黄鱼染病率和死亡率分别达到96.5%、68.3%, 而黄姑鱼的染病率和死亡率却只有55.5%、38.3%; 大黄鱼在感染初期(攻毒3 h后)皮肤中即激活大量差异表达基因, 主要富集于炎症反应、细胞因子-受体相互作用、IL-17和NF- κ B等通路, 此后一直维持高水平免疫激活, 而黄姑鱼则呈现出较温和、可调节的免疫应答, 其免疫相关通路激活程度较低, 并在24 h后逐渐转向神经调节与代谢稳态维持相关通路。

[关键词] 大黄鱼; 黄姑鱼; 变形假单胞菌; 抗病力差异; 皮肤; 转录组

[中图分类号] S 917.4 [文章编号] 1007-7405(2026)03-0274-15 DOI:10.19715/j.jmuzr.2026.03.03

Comparative Analysis of Disease Resistance and Skin Transcriptomic Responses to *Pseudomonas plecoglossicida* Infection in *Larimichthys crocea* and *Nibea albiflora*

REN Jing^{1,2}, LI Zeyu^{1,2}, ZHAO Zhenye^{1,2}, JIN Yuhan^{1,2}, HAN Fang^{1,2}, WANG Zhiyong^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea of Ministry Agriculture and Rural Affairs, Xiamen 361021, China)

Abstract: To investigate the differences in disease resistance between *Larimichthys crocea* and *Nibea albiflora* against *Pseudomonas plecoglossicida* infection, as well as the immune response dynamics of their skin during the infection process, both immersion and intraperitoneal injection methods were used to challenge the fish. Skin tissues were collected at 3, 24, and 48 h after immersion challenge for transcriptome sequencing analysis. The results showed that *N. albiflora* exhibited significantly lower morbidity and mortality than *L. crocea*, indica-

[收稿日期] 2025-07-13

[基金项目] 宁波市科技计划项目(2021Z002); 海水鱼产业技术体系项目(CARS-47-G04)

[通信作者] 王志勇, 博士, 教授, 博导, 从事水产动物遗传育种和分子生物学研究, E-mail:zywang@jmu.edu.cn

ting a stronger resistance to infection. Following immersion challenge, *L. crocea* began to show disease symptoms and mortality by the third day, with a morbidity rate of 65.3% and mortality rate of 37.5% by the seventh day, respectively, whereas *N. albiflora* showed no signs of disease or death. After injection challenge, the morbidity and mortality rates of *L. crocea* reached 96.5% and 68.3% by the seventh day, respectively, while those of *N. albiflora* were significantly lower at 55.5% and 38.3%, respectively. In *L. crocea*, a strong immune activation was observed as early as 3 h post-infection, with a large number of differentially expressed genes enriched in inflammatory response pathways such as cytokine-cytokine receptor interaction, IL-17 signaling, and NF- κ B signaling, and this high level of immune activation was maintained throughout the infection period. In contrast, *N. albiflora* exhibited a milder and more regulated immune response, with lower activation of immune-related pathways and a transition toward neuro-regulation and metabolic homeostasis pathways after 24 h.

Keywords: *Larimichthys crocea*; *Nibea albiflora*; *Pseudomonas plecoglossicida*; difference in disease resistance; skin; transcriptome

0 引言

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国沿海重要的海洋经济鱼类, 属于鲈形目石首鱼科黄鱼属 (*Larimichthys*), 俗称黄花鱼、黄瓜鱼、大黄花等。大黄鱼体呈黄褐色, 腹部呈金黄色, 主要栖息于山东半岛以南至雷州半岛以东水深 60 m 以内的近海水域, 为暖温性集群洄游鱼类^[1-2]。大黄鱼肉质鲜美细嫩, 富含优质蛋白质和不饱和脂肪酸, 营养价值高, 广受市场欢迎。随着人工养殖技术的日益成熟和进步, 大黄鱼已成为我国海水网箱养殖中单种产量最高的鱼类^[3-4]。

然而, 随之而来大黄鱼面临的病害问题日益突出, 成为其产业可持续发展的关键瓶颈。其中, 由变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 感染引起的内脏白点病尤为突出。该病原菌为革兰氏阴性杆菌, 具有较强的致病性, 可引起鱼类肝、脾、肾等内脏器官出现白色结节, 致使鱼体出现死亡。尤其在春季 16 ~ 22 ℃ 的水温条件下, 变形假单胞菌的传播速度快、致死率高, 这给大黄鱼养殖业带来重大经济损失^[5-11]。由于该病外观症状不明显, 常需解剖才能发现, 再加上目前缺乏有效的防控手段, 使得该病的预警与干预面临巨大挑战^[12]。

黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 俗称春仔 (鱼)、黄婆鸡, 属于石首鱼科, 是我国另一个重要的海水养殖鱼类。它广泛分布于中国东南沿海及日本、朝鲜等西太平洋海域, 与大黄鱼在生态习性和养殖环境上高度相似, 在福建、浙江等主产区常常与大黄鱼共处同一养殖海区^[13]。但是, 在长期养殖实践中发现, 尽管黄姑鱼和大黄鱼养殖条件相似, 且面临相同病原暴露风险, 但黄姑鱼却未曾发生过内脏白点病暴发。这种现象提示其可能具有较强的天然抗病能力, 尤其在对抗变形假单胞菌方面可能具有潜在的生理或免疫机制优势。

为深入比较大黄鱼和黄姑鱼对变形假单胞菌感染的抗性差异, 并探讨其体表组织在免疫应答中的作用, 本研究采用浸泡与注射 2 种攻毒方式, 在相同实验条件下对大黄鱼和黄姑鱼进行感染实验。在此基础上, 采集感染后不同时间点 (0、3、24、48 h) 2 种鱼的皮肤组织, 利用高通量 RNA 测序技术进行转录组分析, 并通过差异表达分析、GO 与 KEGG 功能富集、Mfuzz 时间序列聚类等手段, 揭示其免疫应答差异, 为理解大黄鱼

对内脏白点病的易感机制、探索更为有效的防控策略提供理论依据,同时也为发掘黄姑鱼作为抗病育种资源的潜力提供科学支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1) 实验用鱼。实验于 2023 年 6 月在浙江省海洋水产养殖研究所的洞头基地进行,所有实验鱼都由该基地提供,动物实验操作均按照集美大学水产学院动物伦理委员会的要求进行。

实验分为浸泡攻毒实验和注射攻毒实验。浸泡实验组所用大黄鱼、黄姑鱼各 120 尾,大黄鱼平均体长为 (25.1 ± 1.7) cm、体质量为 (252.7 ± 2.4) g;黄姑鱼平均体长为 (22.9 ± 1.4) cm,体质量为 (245.6 ± 2.2) g。注射实验组所用大黄鱼、黄姑鱼各 120 尾,大黄鱼平均体长为 (24.6 ± 1.4) cm,体质量为 (243.1 ± 2.5) g;黄姑鱼平均体长为 (23.4 ± 1.3) cm,体质量为 (252.4 ± 2.9) g。

2) 实验菌株。本研究所用变形假单胞菌菌株由集美大学水产学院鄢庆枇教授惠赠,已经验证是引起大黄鱼内脏白点病的病原菌^[6],具有正常毒力。

1.2 实验方法

1.2.1 浸泡攻毒实验

大黄鱼和黄姑鱼 2 种实验鱼都在水温为 18 ℃、盐度为 25 左右的条件下驯养 7 d,并饥饿 1 d 后再进行攻毒实验。实验前将保存在 -80 ℃超低温冰箱的变形假单胞菌进行复苏,用 LB 培养基于 18 ℃、220 r/min 条件下振荡培养 12 h,使用紫外分光光度计测量吸光度值,使得最终的 $A(600) = 1.0$ (1.0×10^9 CFU/mL)。

实验时,参照本实验室前期建立的方法^[14],分别将大黄鱼、黄姑鱼移入一个放有 600 L 过滤海水的塑料圆桶中,各加入 600 mL 菌液,使海水桶中菌液的最终浓度为 1.0×10^6 CFU/mL。在充气条件下浸泡 3 h,然后将鱼捞出分别分配至 3 个装有洁净海水的同样规格塑料桶中,另有一些大黄鱼和黄姑鱼以不加入菌液浸泡作为对照组。维持驯养时的水温和盐度,并用市售饲料正常投喂。攻毒开始后,每天观察记录实验鱼的活动与死亡情况。

1.2.2 注射攻毒实验

实验鱼在注射攻毒前同样经节 1.2.1 的方法进行驯养,在注射攻毒时,用丁香酚适度麻醉实验鱼,参照 Mao 等^[5]和文献 [15] 对每尾大黄鱼和黄姑鱼注射 0.2 mL 浓度为 1.0×10^5 CFU/mL 的变形假单胞菌菌液,从胸鳍基部注射到鱼的胸腔中,然后将鱼分别分配至 3 个装有洁净海水的同样规格塑料桶中;对照个体 (0 h) 每尾注射 0.2 mL PBS 缓冲液。实验期间水温维持在 18 ℃,盐度维持在 25 左右,正常投饵、换水、充气饲养 6 d。每天观察记录鱼的活动与死亡情况。

1.2.3 皮肤组织采样与 RNA 提取

在攻毒后 0、3、24、48 h 各取 9 尾鱼,迅速测量体质量和体长,然后立即解剖并取部分背部皮肤组织,置于 RNA 保护液中,随后保存于 -80 ℃超低温冰箱备用。

皮肤组织总 RNA 提取严格按照全式金生物技术有限公司的 TransZol Up Plus RNA Kit 试剂盒说明书进行操作。经质检确认 RNA 样品合格后,各取部分送至安诺优达基因科技(北京)有限公司进行 RNA-seq 文库构建和高通量测序,剩余部分采用 Promega 公司的 GoScript™ 逆转录试剂盒,按照说明书将其逆转录为 cDNA,用于后续的 qRT-PCR 分析。

1.2.4 转录组测序与分析

在测序文库制备过程中,大黄鱼、黄姑鱼在每个时间点分别构建 3 个独立文库,每个文库由 3 尾鱼的皮肤组织 RNA 混合构建而成。使用超微量分光光度计(IMPLEN, CA, USA)检测 RNA 样品的纯度;使用 Agilent 4200 型生物分析仪和 Agilent RNA 6000 Nano 试剂盒检查样品的完整性和浓度。使用 VAHTS Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina 进行转录组文库构建,在 Illumina HiSeq X (Illumina, USA) 上进行双端测序。

测序结束后,将得到的原始测序数据(raw reads)使用 FASTQC 软件^[16]进行质量控制,再使用 MultiQC^[17]对质控的结果进行汇总,获得高质量的有效数据(clean reads),用于后续的分析。先建立索引,再通过 STAR 软件将 clean reads 比对到大黄鱼的参考基因组上^[18],获得比对结果 sam 文件;接着利用 SAMTOOLS 软件^[19]对 sam 文件进行相关的转换、排序,从而得到最终的比对结果文件 bam 文件。使用 StringTie (版本 2.1.4)^[20]进行转录本组装,并通过使用 subread (版本 1.6.1)^[21]默认设置进行基因表达定量分析,统计样本的 count 数和基因表达量矩阵(TPM)。

1.2.5 差异表达基因的 GO 和 KEGG 分析

本研究利用 DESeq R 包 (1.40.2)^[22]分析对照组(0 h)和 3、24、48 h 组之间基因表达的变化。具有 $|\log_2(\text{FoldChange})| > 2$ 、 $p_{\text{adj}} < 0.01$ 的基因被定义为差异表达基因。使用 eggNOG-mapper (版本 1.0.3)^[23]在 eggNOG 数据库进行功能注释,得到基因对应的 GO、KEGG、COG 的描述并构建 Org.db 包,构建完成之后用 clusterProfiler (版本 4.8.3)^[24]对 DEG 进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。

1.3 时序分析

使用 Mfuzz 软件进行时序分析,按照时间进程对差异表达基因进行聚类分析。首先,对差异表达基因矩阵进行 FPKM 归一化处理,剔除 FPKM 为 0 的数据,具体计算公式^[25]为

$$F = \frac{N \times 10^9}{T \times L}。$$

其中: F 表示 FPKM; N 表示比对到某个外显子上的片段数; T 表示所有比对上的片段总数; L 表示该外显子的长度,单位通常是 kbp。

其次,选择聚类数量,基于模糊 C 均值进行聚类,分析具有时间序列特征的转录组数据中基因表达的时间趋势,并将具有相似表达模式的基因划分聚类到一起,以了解这些生物学分子的动态模式以及与其相关功能的关系^[26]。

最后,筛选出重要的或者与免疫相关基因的时间表达特征聚类集合,提取聚类集合中的基因信息,分析聚类基因的功能及相关性,并进行富集分析,找出相关的通路。

2 结果与分析

2.1 大黄鱼与黄姑鱼对变形假单胞菌感染的抗病力差异

浸泡与注射攻毒实验结果见表 1 ~ 表 2。可见，在浸泡攻毒实验中，大黄鱼在浸泡攻毒 72 h 后出现 2 尾死亡和 3 尾濒死（腹部朝上或侧翻于水面，行动缓慢或基本不动、触碰之后才缓慢游动）个体。解剖结果显示，这些个体的脾脏（见图 1）和肾脏均出现白色结节。随着时间的推移，发病和死亡的个体逐渐增加，到浸泡攻毒 144 h 后，死亡个体增加到 37 尾，另有 8 尾处于濒死状态。从外观正常的剩余个体中随机选取 9 尾进行解剖观察，发现其中有 4 尾（44.4%）内脏出现白点病症状，综合死亡和濒死个体，总体染病率达 65.3%，144 h 累计死亡率为 37.5%（含濒死个体）。相比之下，黄姑鱼在整个实验期间均未出现死亡或内脏生长白色结节的个体，其死亡率和发病率均为 0（见表 1）。

表 1 变形假单胞菌攻毒后大黄鱼、黄姑鱼每日死亡情况

Tab. 1 Daily mortality of *L. crocea* and *N. albiflora* following challenge with *P. plecoglossicida*

攻毒时间/h	死亡数/尾			
	浸泡攻毒		注射攻毒	
	大黄鱼	黄姑鱼	大黄鱼	黄姑鱼
0	0	0	0	0
24	0	0	0	0
48	0	0	0	0
72	2 + 3	0	9 + 7	3 + 3
96	6 + 5	0	13 + 9	8 + 4
120	11 + 7	0	21 + 11	11 + 6
144	18 + 8	0	29 + 10	17 + 7
合计	37 + 8	0	72 + 10	39 + 7
死亡率/%	37.5	0	68.3	38.3

注：表中濒死的鱼也于当日捞出，计入次日的死亡个体数中（+号后的数值），在计算总体死亡率时将第 7 天濒死的鱼也计算在内。

表 2 攻毒 144 h 后存活大黄鱼和黄姑鱼内脏白点情况统计结果

Tab. 2 Statistical results of visceral white spot condition at 144 h for *L. crocea* and *N. albiflora*

项目	攻毒方式			
	浸泡攻毒		注射攻毒	
	大黄鱼	黄姑鱼	大黄鱼	黄姑鱼
解剖鱼数/尾	9	9	9	9
内脏白点个体/尾	4	0	8	5
染病率/%	44.4	0	88.9	55.5

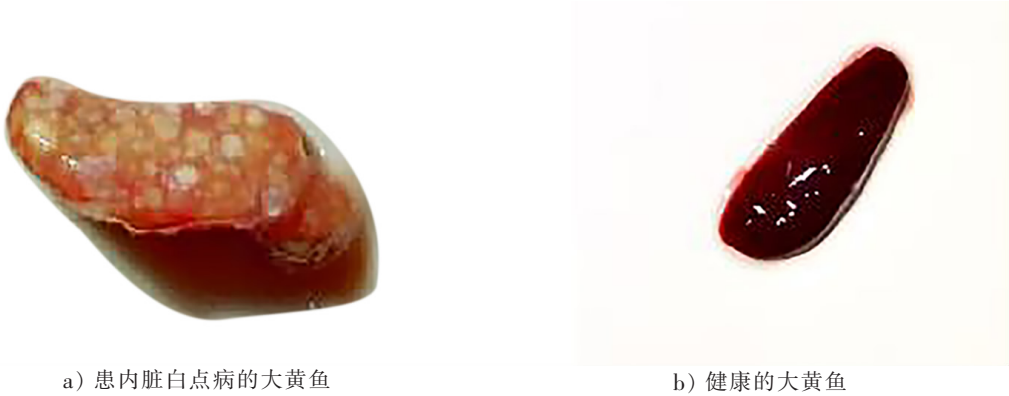


图 1 患内脏白点病的大黄鱼与健康的大黄鱼脾脏

Fig.1 The spleen of *L. crocea* suffering from visceral white spot disease and healthy *L. crocea*

在注射攻毒实验中，大黄鱼在注射变形假单胞菌 48 h 后就有部分个体开始发病，72 h 已有 9 尾死亡、7 尾处于濒死状态，96 h 后死亡个体增加到 22 尾，另有 9 尾濒死，144 h 累计死亡 72 尾，另有 10 尾濒死。从存活个体中随机选取 9 尾进行解剖观察，发现其中 8 尾的脾脏、肾脏和肝脏均出现白色结节，总体死亡率达 68.3%，总体染病率达 96.5%。黄姑鱼在注射变形假单胞菌后，第 3 天开始也出现染病个体，症状与大黄鱼相似，72 h 后观察到 3 尾死亡和 3 尾濒死个体，至 144 h 累计死亡 39 尾、濒死 7 尾，总体死亡率为 38.3%。随机解剖 9 尾存活个体，其中有 5 尾内脏中有白色结节（见图 2），据此推算总体染病率为 55.5%（见表 2）。

基于上述结果，本研究选取浸泡感染后 0、3、24、48 h 等 4 个时间点采集皮肤组织样本，通过转录组测序分析，比较不同感染阶段的免疫应答特征。



图 2 患内脏白点病的黄姑鱼与健康的黄姑鱼脾脏

Fig.2 The spleen of *N. albiflora* suffering from visceral white spot disease and healthy *N. albiflora*

2.2 不同时间点皮肤组织转录组测序结果

本研究对大黄鱼、黄姑鱼分别取 12 个皮肤组织样本（每个时间点 3 个生物重复）。提取的 RNA 质量浓度均大于 200 μg/L，A(260/280) 约为 2.0，RNA 完整性值 >7.5。结果表明，RNA 纯度、浓度和 RNA 量均满足 RNA 数据库建设要求（见表 3）。

表 3 大黄鱼和黄姑鱼原始测序数据质量情况汇总

Tab.3 Summary of quality assessment of raw sequencing data for *L. crocea* and *N. albiflora*

样品名	原始数据量	有效数据量	有效碱基数/Gbp	N 碱基比例/%	Q30 比例/%	GC 含量/%
LS0-1-1	49 045 242	47 138 376	6.59	0.01	96.48	50.97
LS0-2-1	48 545 362	47 936 458	6.70	0.01	96.36	49.57
LS0-3-1	47 561 400	46 897 436	6.55	0.01	96.51	50.48
LS3-1-1	48 342 814	47 694 960	6.66	0.01	96.64	49.88
LS3-2-1	44 836 854	44 185 112	6.17	0.01	96.45	50.26
LS3-3-1	47 455 406	46 549 014	6.50	0.01	96.79	50.39
LS24-1-1	46 500 306	44 428 218	6.21	0.01	96.54	51.07
LS24-2-1	48 666 584	47 080 706	6.58	0.01	96.65	50.92
LS24-3-1	45 590 930	44 847 622	6.27	0.01	96.90	50.58
LS48-1-1	48 281 626	47 625 152	6.65	0.01	96.40	49.45
LS48-2-1	47 245 930	46 471 570	6.49	0.01	96.45	49.9
LS48-3-1	47 811 762	47 008 000	6.57	0.01	96.59	49.91
YS0-1-1	46 735 164	45 928 002	6.42	0.01	96.64	49.94
YS0-2-1	44 414 726	43 763 892	6.11	0.01	96.38	49.84
YS0-3-1	45 079 308	44 411 268	6.20	0.01	96.34	50.39
YS3-1-1	48 827 548	47 882 256	6.69	0.01	96.72	50.97
YS3-2-1	48 975 052	47 919 766	6.69	0.01	96.70	51.15
YS3-3-1	47 242 520	46 222 100	6.46	0.01	96.71	51.15
YS24-1-1	44 780 158	44 001 214	6.15	0.01	96.26	51.67
YS24-2-1	45 473 822	44 512 288	6.22	0.01	96.75	49.08
YS24-3-1	46 730 570	45 826 800	6.40	0.01	96.61	50.31
YS48-1-1	47 829 978	44 024 302	6.15	0.01	96.73	51.88
YS48-2-1	47 584 842	45 212 000	6.32	0.01	96.83	51.25
YS48-3-1	51 192 314	46 337 474	6.47	0.01	96.47	52.26

2.3 差异表达基因分析与功能富集结果

差异表达分析结果显示，大黄鱼皮肤组织在攻毒 3 h 后即发生显著的转录响应，共检测到 204 个差异表达基因（DEGs），其中上调表达基因 66 个，下调表达基因 138 个。至攻毒 24 h 后，DEGs 数量增至 444 个，包括 214 个上调表达基因和 230 个下调表达基因；攻毒 48 h 后，共检测到 436 个 DEGs，包括 233 个上调表达基因和 203 个下调表达基因。上述基因中有 30 个在攻毒 3 ~ 48 h 后与对照组间始终呈差异表达（见图 3a）。相比之下，黄姑鱼皮肤组织的转录响应较为温和，在 3、24、48 h 分别检测到 10、30 和 48 个 DEGs。其中，3 h 时有 8 个上调表达基因、2 个下调表达基因；24 h 时有 21 个上调表达基因、9 个下调表达基因；48 h 时上调表达基因与下调表达基因各有 24 个，其中的 10 个基因在攻毒 24 h 后就呈差异表达。未发现攻毒 3 ~ 48 h 后一直呈差异表达的基因（见图 3b）。

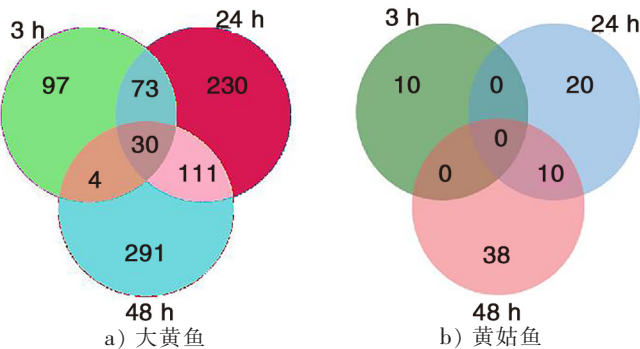


图 3 大黄鱼和黄姑鱼攻毒后各时间点 DEGs 韦恩图

Fig.3 Venn diagrams of DEGs at each time point after infection in *L. crocea* and *N. albiflora*

为进一步分析感染变形假单胞菌后大黄鱼与黄姑鱼皮肤组织差异表达基因的功能特征, 对各时间点的差异表达基因进行了 Gene Ontology (GO) 富集分析, 结果 DEGs 涵盖生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 大类。

大黄鱼在感染 3 h 后即启动强烈的免疫相关、趋化与器官发育相关程序, 而黄姑鱼富集在细胞结构、吞噬相关的通路, 体现出应激模式的差异; 感染 24 h 后, 大黄鱼的 DEGs 仍大量富集于炎症相关功能, 而黄姑鱼的 DEGs 则富集于细胞迁移及基底膜等通路; 感染 48 h 后, 大黄鱼的 DEGs 依旧集中在炎症反应调节、免疫系统过程、细胞死亡和应激应答上, 而黄姑鱼则过渡到神经系统过程、激素介导等信号通路 (见图 4 ~ 图 5)。

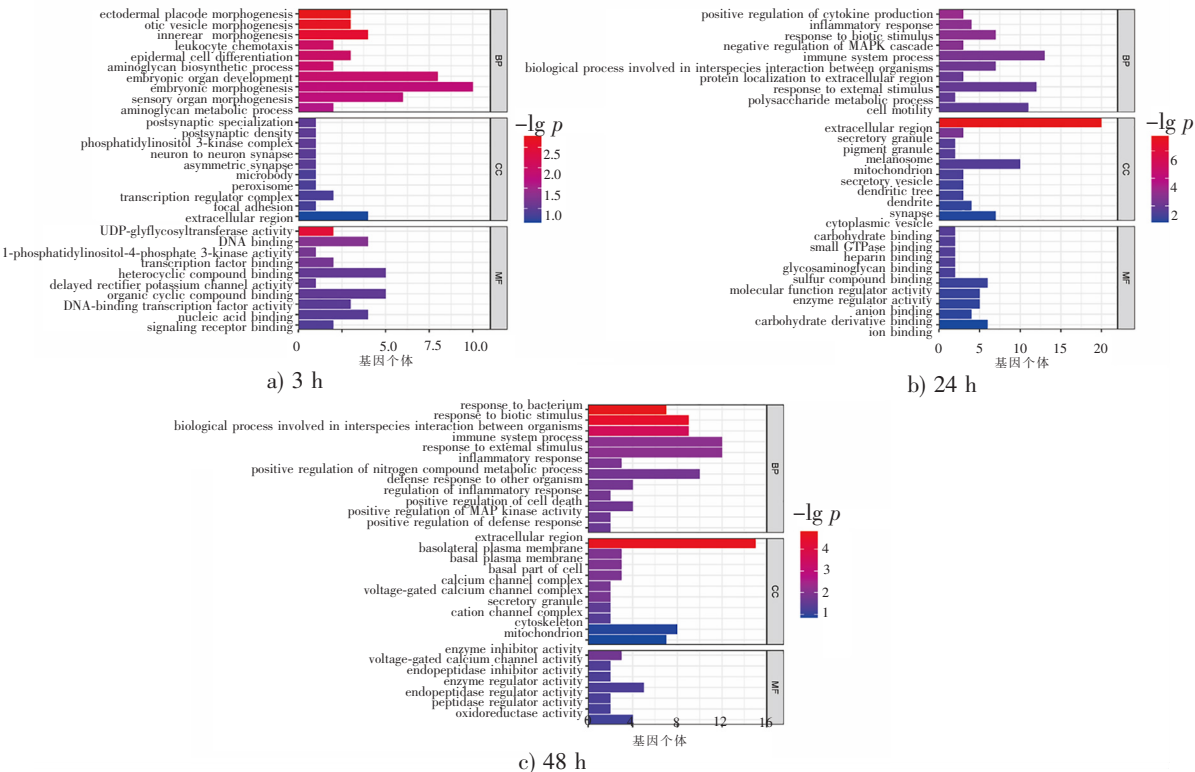


图 4 变形假单胞菌攻毒 3、24、48 h 后大黄鱼皮肤差异表达基因的 GO 功能富集分析

Fig.4 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in the skin of *L. crocea* at 3,24,48 h after *P. plecoglossicida* infection

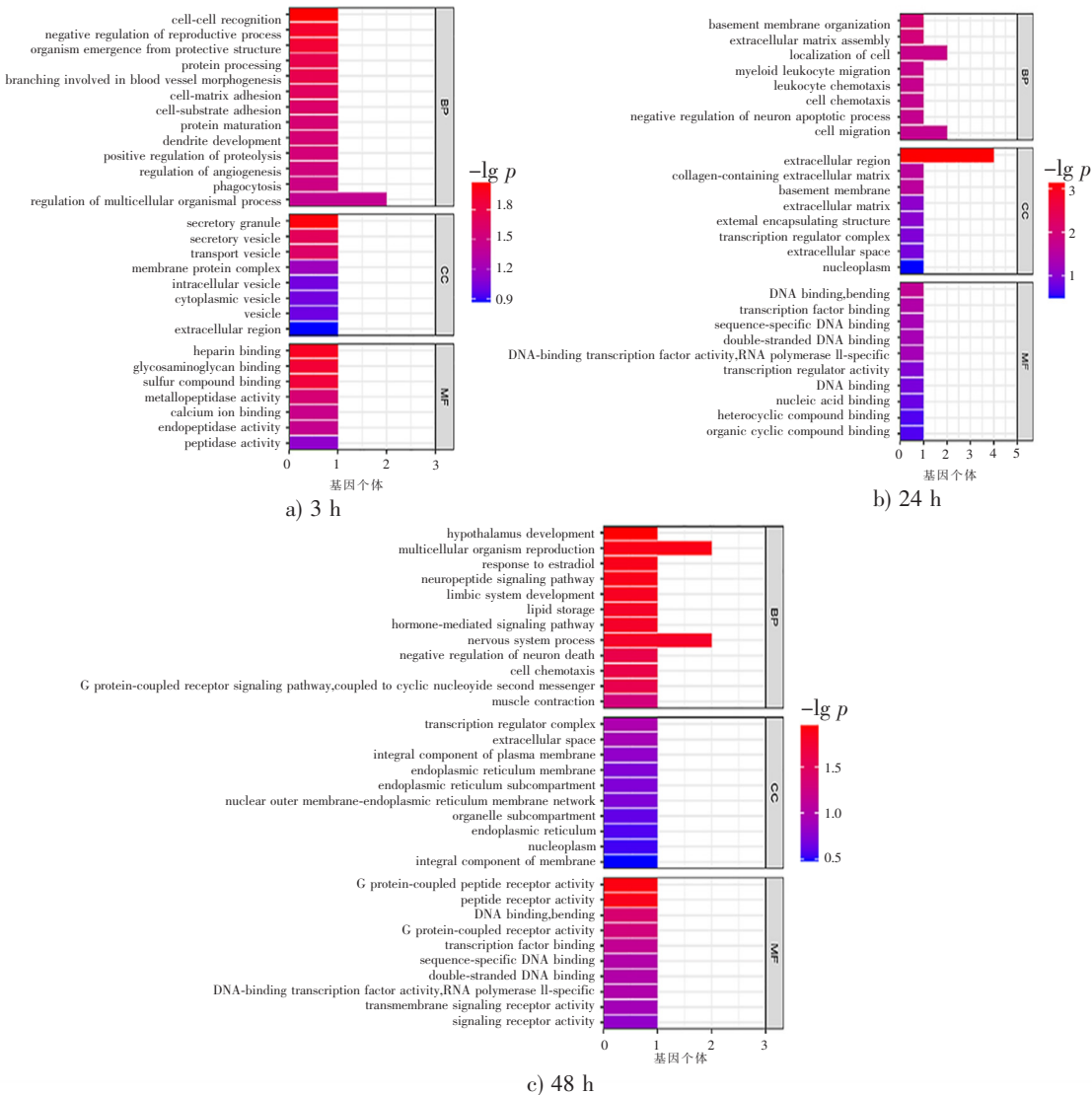
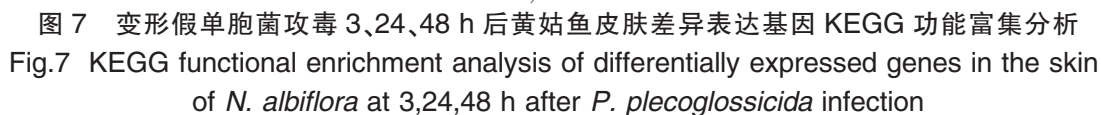


图 5 变形假单胞菌攻毒 3、24、48 h 后黄姑鱼皮肤差异表达基因的 GO 功能富集分析
Fig.5 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in the skin of *N. albiflora* at 3,24 ,48 h after *P. plecoglossicida* infection

对大黄鱼与黄姑鱼在感染变形假单胞菌后不同时间点的 DEGs 进行 KEGG 富集分析，发现 2 种鱼在富集通路类型及富集时间上均存在明显差异（见图 6 ~ 图 7）。可见，在攻毒 3 h 后，大黄鱼的差异表达基因主要富集于免疫识别相关通路，如细胞因子-受体相互作用、趋化因子信号和细胞质 DNA 识别，同时伴随炎症和内分泌调控通路的激活；黄姑鱼则富集于细胞外基质、吞噬体、白细胞迁移等与细胞结构和吞噬功能相关的通路，炎症通路尚不明显。攻毒 24 h 后，大黄鱼的 DEGs 富集多条炎症和免疫调控通路，如 IL-17、TNF、NF- κ B 等，同时涉及免疫系统结构的相关通路；黄姑鱼在该阶段也出现 Toll 样受体、JAK-STAT、Th17 分化等免疫通路富集，通路数量增加。攻毒 48 h 后，大黄鱼的 DEGs 仍维持高水平免疫通路富集，并涉及代谢与细胞骨架等功能；而黄姑鱼则呈现免疫与代谢通路共同富集的特点，代谢调节通路更加突出。综上，大黄鱼以持续强免疫响应为主，黄姑鱼则表现为先应激、后免疫、再转向代谢稳态的阶段变化。



图 6 变形假单胞菌攻毒 3、24、48 h 后大黄鱼皮肤差异表达基因 KEGG 功能富集分析
Fig.6 KEGG functional enrichment analysis of differentially expressed genes in the skin of *L. crocea* at 3,24,48 h after *P. plecoglossicida* infection



2.4 时间序列聚类分析结果

为探究大黄鱼与黄姑鱼在变形假单胞菌感染过程中的基因表达动态变化规律, 对大黄鱼、黄姑鱼的差异表达基因进行了 Mfuzz 时间序列聚类分析。结果显示, 攻毒后不同时间点的 DEGs 在感染后表达水平可分为持续上升、持续下降、先升后降和先降后升 4 类表达模式。

大黄鱼皮肤第 1 类 DEGs 主要富集到类固醇的生物合成、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、模式识别受体和 NOD 样受体信号通路; 第 2 类主要富集到运动蛋白、细胞骨架蛋白和心肌细胞中的肾上腺素能信号传导; 第 3 类主要富集到 IL-17 信号通路、NF-κB 信号通路; 第 4 类主要富集到细胞黏附分子、炎症介质对 TRP 通道的调控 (见图 8a)。

黄姑鱼皮肤的第 1 类 DEGs 主要富集类固醇的生物合成、磷酸戊糖途径、细胞色素 P450、花生四烯酸代谢; 第 2 类主要富集在牛磺酸和低牛磺酸代谢、苯丙氨酸代谢、酪氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢; 第 3 类主要富集在心肌细胞中的肾上腺素能信号传导、糖胺聚糖结合蛋白、细胞骨架蛋白、运动蛋白; 第 4 类主要富集在细胞因子和生长因子、IL-17 信号通路、造血细胞系、NF-κB 信号通路 (见图 8b)。

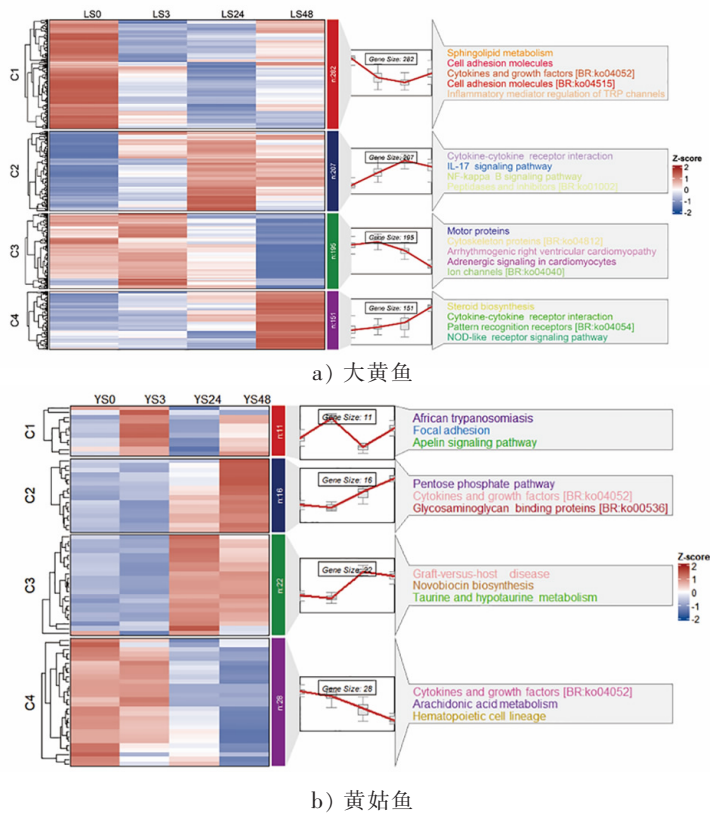


图 8 大黄鱼和黄姑鱼攻毒后基于时间进程的皮肤组织差异表达基因聚类图
Fig.8 Cluster plot of DEGs in the skin of *L. crocea* and *N. albiflora* based on the time after challenge

3 讨论

在养殖生产实践中发现, 随着养殖规模的扩大, 近年来大黄鱼频繁遭受由变形假单

胞菌引起的内脏白点病困扰,造成严重的经济损失。然而,在同一海区、同一渔排养殖的黄姑鱼却未发现内脏白点病,表明其对感染变形假单胞菌可能具有较强的抗病能力,但这一现象尚未经过严格的实验验证。为此,本研究通过浸泡和注射 2 种方式,在相同条件下对大黄鱼和黄姑鱼进行人工攻毒实验,结果显示,在浸泡攻毒实验中,大黄鱼第 3 天就出现发病和死亡个体,至第 7 天实验结束时发病率超过 60%,死亡率达 37.5% (含濒死个体),而黄姑鱼则未出现染病和死亡个体;在注射攻毒实验中,大黄鱼的染病率和死亡率同样显著高于黄姑鱼。这些结果证实,黄姑鱼对变形假单胞菌感染的抗病力确实显著强于大黄鱼。

本研究表明,在浸泡攻毒实验中,许多大黄鱼被感染乃至引发内脏白点病而死亡,黄姑鱼则完全看不到发病的迹象。然而,在注射攻毒实验中,部分黄姑鱼也出现了内脏白点病并死亡。这表明黄姑鱼的较强抗病力主要源于其具有比大黄鱼强大的体表防御,如皮肤、鳃、肠道等能直接接触到海水和海水中病原体的部位的免疫防御。在浸泡攻毒实验中,变形假单胞菌需要攻破鱼的体表防御,进入血液循环并迁移至脾脏、肾脏和肝脏等器官,随后在这些器官中增殖并形成菌落,这些菌落与鱼的分泌物共同构成“白点”。黄姑鱼的鳞片排列紧密且牢固,实验操作(如捞取)不易造成损伤;而大黄鱼鳞片疏松易脱落,实验过程中容易造成损伤导致病原菌侵入,这可能是大黄鱼在浸泡攻毒中易被病原菌感染的重要原因。淋巴系统是鱼类免疫防御的关键,硬骨鱼的主要淋巴组织包括肾脏、胸腺、脾脏和黏膜相关淋巴组织(如肠道、皮肤和鳃),这些黏膜组织不仅构成病原体入侵的物理屏障,还富含参与局部免疫反应的白细胞群^[27]。此外,大黄鱼的应激反应比黄姑鱼强,实验操作也会使大黄鱼产生较严重的应激,可能也会导致大黄鱼的免疫力进一步下降。在注射攻毒实验中,病原体被直接注射入胸腔,绕过了体表防御系统,直接进入循环系统,因此部分黄姑鱼也被感染并死亡。尽管如此,黄姑鱼的发病率和死亡率仍显著低于大黄鱼,表现出较强的抗病力,表明其免疫抗病能力与机制包括免疫应答等与大黄鱼存在显著差异。

皮肤是硬骨鱼中最大的黏膜免疫器官,是免疫系统的第一道防线,在抵御病原体入侵的过程中发挥着重要作用^[28]。深入研究鱼类皮肤免疫调控机制,有助于更有效地防控疾病^[29]。基于皮肤转录组分析,本研究揭示了大黄鱼、黄姑鱼对变形假单胞菌感染的免疫应答模式差异。差异表达分析显示,大黄鱼在感染早期(攻毒 3 h 后)即启动大量免疫相关基因的表达,富集于细胞因子-受体相互作用、TRP 通道的炎症介质调节等通路。皮肤作为第一道免疫屏障,能够快速识别病原入侵并启动先天免疫和炎症反应,这一发现与 Li 等^[30]在鲫鱼(*Carassius auratus*)感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的研究结果类似,其皮肤免疫应答也表现出显著的动态变化特征,涉及多个免疫相关通路。然而,免疫通路在 24 和 48 h 时持续活跃,尤其是与炎症反应、细胞因子、细胞死亡相关的 GO、KEGG 通路依然富集,提示大黄鱼可能存在炎症调控失衡、免疫应答过度激活的问题,这可能导致组织损伤并加剧炎症反应^[31]。

相比之下,黄姑鱼的免疫响应更加温和且呈现阶段性调控特征。其在感染早期主要启动吞噬作用、细胞黏附与信号转导相关通路,在感染中后期富集多种能量代谢相关通

路,如糖酵解、磷酸戊糖途径、PPAR 信号等,表明其在应对病原感染后迅速启动代谢重塑,有助于组织功能的恢复与能量稳态的维持。而大黄鱼尽管也在 48 h 富集糖酵解通路,但整体代谢通路偏重与炎症相关物质代谢,反映其免疫持续激活导致能量代谢异常,可能加剧组织损伤,这与 Zhang 等^[32]在大黄鱼对变形假单胞菌防御反应中多种免疫过程和能量代谢途径的研究结果一致。

此外, Mfuzz 时间序列聚类进一步揭示大黄鱼和黄姑鱼在免疫通路激活时间和趋势上的显著差异。大黄鱼中与炎症和免疫反应相关的通路(如 NF- κ B 和 IL-17 信号通路)表现出更持久的上调。虽然这些通路对于有效的免疫反应至关重要,但如果过度激活或调节不当,也可能导致组织损伤和疾病易感性增加。黄姑鱼中基因表达显示出较强的动态变化,最初显著上调随后是下调,这表明它对感染的反应更加可控,效果可能更有效,可防止过度炎症。

4 结论

本文从攻毒实验、病理症状、死亡率统计和皮肤组织的转录组动态变化,系统比较了大黄鱼与黄姑鱼在面对变形假单胞菌感染时的差异性免疫应答。结果表明,大黄鱼免疫应答迅速但调控失衡,易导致炎症扩散和组织损伤;黄姑鱼则表现出更协调的免疫激活与代谢重塑能力,使其在抗感染中展现出更强的适应性和生存优势。这为解析大黄鱼对内脏白点病的高易感性提供了理论依据,也为黄姑鱼作为抗病育种资源的开发利用提供了实证支撑。

[参 考 文 献]

[1] 张其永,洪万树,杨圣云,等. 大黄鱼地理种群划分的探讨[J]. 现代渔业信息,2011,26(2):3-8.

[2] YAN L,JIANG Y,XU Q, et al. Reproductive dynamics of the large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Sciaenidae): a commercially important fishery species in China[J]. *Frontiers in Marine Science*,2022,9:868580.

[3] 孟玉琼,马睿,申屠基康,等. 野生和配合饲料养殖大黄鱼品质的比较研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2016,46(11):108-116.

[4] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站,中国水产学会. 2024 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2024.

[5] MAO Z J,LI M F,CHEN J G, et al. Draft genome sequence of *Pseudomonas plecoglossicida* strain NB2011, the causative agent of white nodules in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Genome Announcement*,2013,1(4):00586.

[6] 胡娇,张飞,徐晓津,等. 大黄鱼内脏白点病病原分离鉴定及致病性研究[J]. 海洋与湖沼,2014,45(2):409-417.

[7] ZHANG J T,ZHOU S M,AN S W, et al. Visceral granulomas in farmed large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson), caused by a bacterial pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida* [J]. *Journal of Fish Diseases*,2014,37(2):113-121.

[8] 刘年锋,郭睿,江小斌,等. 福州地区大黄鱼变形假单胞菌的分离与鉴定[J]. 渔业研究,2016,38(1):14-20.

[9] 许斌福,王凡,陈永聪,等. 宁德地区大黄鱼内脏结节病的流行病学调查[J]. 福建畜牧兽医,2017,39(1):5-6.

[10] 崔晓莹,李泽宇,李完波,等. 一种定量检测大黄鱼感染变形假单胞菌方法的建立与应用[J]. 集美大学学报(自然科学版),2019,24(5):328-334.

[11] LI C W,WANG S L,REN Q L, et al. An outbreak of visceral white nodules disease caused by *Pseudomonas plecoglossicida* at a water temperature of 12 $^{\circ}$ C in cultured large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in China[J]. *Journal of Fish Diseases*,2020,43(11):1353-1361.

- [12] YUAN Y B, ZHOU M, LI Z Y, et al. Evaluation of genomic prediction of resistance to visceral white-spot disease in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Aquaculture, 2025, 599: 742114.
- [13] 孙成峰, 季本安, 陈晓玲, 等. 黄姑鱼人工养殖技术[J]. 科学养鱼, 2022(7): 61-62.
- [14] LI Z Y, FANG M, TANG X, et al. Disentangling genetic variation for endurance and resistance to visceral white-nodules disease in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) using genome information[J]. Aquaculture, 2022, 564: 739045.
- [15] XUE Y D, WANG R X, YAO T Y, et al. Genome-wide identification and characterization of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) suppressors of cytokine signaling (SOCS) in immune response to *Pseudomonas plecoglossicida* infection and acute hypoxia stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2024, 151: 109669.
- [16] BROWN J, PIRRUNG M, MCCUE L A. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool[J]. Bioinformatics, 2017, 33(19): 3137-3139.
- [17] EWELS P A, MAGNUSSON M, LUNDIN S, et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report[J]. Bioinformatics, 2016, 32(19): 3047-3048.
- [18] DOBIN A, GINGERAS T R. Mapping RNA-seq reads with STAR[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2015, 51(1): 1-19.
- [19] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools[J]. Bioinformatics, 2009, 25(16): 2078-2079.
- [20] PERTEA M, PERTEA G M, ANTONESCU C M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(3): 290-295.
- [21] LIAO Y, SMYTH G K, SHI W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features[J]. Bioinformatics, 2014, 30(7): 923-930.
- [22] ANDERS S, HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data[J]. Genome Biology, 2010, 11: 264757762.
- [23] HUERTA-CEPAS J, FORSLUND K, COELHO L P, et al. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-Mapper[J]. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34(8): 2115-2122.
- [24] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. OMICS: A Journal of Integrative Biology, 2012, 16(5): 284-287.
- [25] ZHAO Y D, LI M C, KONATÉ M M, et al. TPM, FPKM, or normalized counts? : a comparative study of quantification measures for the analysis of RNA-seq data from the NCI patient-derived models repository[J]. Journal of Translational Medicine, 2021, 19(1): 269.
- [26] KUMAR L, FUTSCHIK M. Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data[J]. Bioinformation, 2007, 2(1): 5-7.
- [27] MOKHTAR D M, ABDELHAFEZ E A. An overview of the structural and functional aspects of immune cells in teleosts[J]. Universidad de Murcia, Departamento de Biología Celular Histiología, 2021, 36(4): 399-414.
- [28] LI Z C, JIANG B A, ZHONG Z H, et al. Skin transcriptomic analysis and immune-related gene expression of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) after *Amyloodinium ocellatum* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 128: 188-195.
- [29] YU Y Y, WANG Q C, HUANG Z Y, et al. Immunoglobulins, mucosal immunity and vaccination in teleost fish[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 567941.
- [30] LI X W, HU X C, LÜ A J, et al. Skin immune response to *Aeromonas hydrophila* infection in crucian carp *Carassius auratus* revealed by multi-omics analysis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 127: 866-875.
- [31] LIU D H, ZHONG Z Y, KARIN M. NF- κ B: a double-edged sword controlling inflammation[J]. Biomedicines, 2022, 10(6): 1250.
- [32] ZHANG Y M, LU L X, LI C W, et al. Transcriptome analysis revealed multiple immune processes and energy metabolism pathways involved in the defense response of the large yellow croaker *Larimichthys crocea* against *Pseudomonas plecoglossicida* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2021, 40: 100886.

(责任编辑 马建华 英文审校 黄力行)