

Doi: 10.11840/j.issn.1001-6392.2023.01.007

环境激素壬基酚对长牡蛎免疫相关基因表达的影响研究

李玲玲^{1,2}, 陈伟³, 董凯琦², 刘茜², 桑秀秀², 刘文娟², 王蕾¹,
李方舒², 董娟², 黄宝玉², 王晓通², 邱盛尧¹

(1. 烟台大学 海洋学院, 山东 烟台 264005; 2. 鲁东大学 农学院 山东 烟台 264025;
3. 烟台市海洋经济研究院, 山东 烟台 264003)

摘要: 壬基酚 (Nonylphenol, NP) 是一种典型的环境内分泌干扰物, 具有高亲脂性、难降解性、生物蓄积性和高毒性, 其广泛应用引起的环境污染问题越发严重。本研究选取长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 为研究对象, 关注壬基酚暴露后长牡蛎免疫相关基因的转录表达变化, 以探索壬基酚暴露对海洋贝类免疫系统的影响。实验结果表明: 长牡蛎的抗氧化酶 (SOD、CAT 和 GPX)、热休克蛋白 (Heat shock proteins, HSP) 以及 NF- κ B 蛋白家族有关基因在壬基酚刺激后的表达显著提高。实验初步证明了壬基酚刺激可显著影响长牡蛎免疫相关基因的表达, 为以后结合病原刺激实验解析贝类大规模死亡原因打下基础; 另一方面, 也可明晰海洋贝类壬基酚胁迫响应机制提供参考。

关键词: 长牡蛎; 壬基酚; 免疫; 基因表达

中图分类号: P735; S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6932(2023)01-0059-07

Effects of environmental hormone Nonylphenol stress on the expression of immune-related genes in the Pacific oyster

LI Lingling^{1,2}, CHEN Wei³, DONG Kaiqi², LIU Qian², SANG Xiuxiu², LIU Wenjuan², WANG Lei¹,
LI Fangshu², DONG Juan², HUANG Baoyu², WANG Xiaotong², QIU Shengyao¹

(1. School of Ocean, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, China;
3. Yantai Marine Economic Research Institute, Yantai 264003, China)

Abstract: Nonylphenol (NP) is a common environmental endocrine disruptor, which is highly lipophilic, hard to degrade, bioaccumulative and highly toxic. Its widespread application has caused increasingly severe environmental pollution. In this study, *Crassostrea gigas* was selected as the research object, and the transcriptional expression changes of some immune-related genes in *C. gigas* after NP exposure were investigated to explore the effect of NP stress on the immune system of marine shellfish. The experimental results showed that the expression levels of genes of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPX), heat shock proteins (HSP) and NF- κ B protein family were significantly induced after NP exposure. Our experiments preliminarily proved that NP exposure can significantly affect the expression of immune-related genes in oyster, laying the foundation for the analysis of the causes of mass mortality in shellfish in combination with pathogen stimulation experiments. On the other hand, it also provide a reference for clarifying the response mechanism of NP stress in marine shellfish.

Keywords: *Crassostrea gigas*; Nonylphenol; Immunity; expression of gene

收稿日期: 2022-08-30; 修订日期: 2022-10-05

基金项目: 国家自然科学基金(42076088); 山东省重点研发计划(农业良种工程)项目(2022LZGC015); 烟台市级以上领军人才专项配套经费资助(2022-7); 山东省泰山学者专项基金(tsqn201812094); 山东省现代农业产业技术体系(SDAIT-14-03); 山东省高等学校“青创科技计划”(2019KJF004)

作者简介: 李玲玲 (1997—), 硕士研究生, 主要从事水产动物免疫研究, 电子邮箱: lililing0603@126.com。陈伟 (1970—), 高级工程师, 电子邮箱: 15615756323@163.com

通信作者: 王晓通, 博士, 教授, 电子邮箱: wangxiaotong999@163.com; 邱盛尧, 硕士, 教授, 电子邮箱: s.qiu@126.com

壬基酚 (Nonylphenol, NP) 是一类被广泛用于家用洗涤剂和农药制剂的环境激素^[1-2]。因其具有雌激素效应,可模拟体内的雌激素并与雌激素受体结合,从而干扰生物内分泌代谢并引起毒性效应^[3]。研究表明,壬基酚的持续暴露会影响贝类及鱼类生殖活力,使长牡蛎精子活力减弱;增加剑尾鱼 (*Xiphophorus Hellerii*) 卵黄生成素的表达,促进其睾丸细胞的凋亡^[4-5]。

长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 是深受喜爱的海水养殖贝类,为人们提供了大量的优质蛋白^[6]。然而,近年来长牡蛎深受病害引起的大规模死亡事件的困扰,给长牡蛎养殖业造成了巨大的经济损失^[7-8]。尽管有报道称病毒感染可能是长牡蛎死亡的原因之一^[9-10],但不可否认的是,各种环境因素在长牡蛎大规模死亡过程中发挥着不可忽视的作用。壬基酚广泛存在于水环境中,具有内分泌干扰作用,持续暴露可能会影响软体动物的免疫系统,从而使它们更容易受到病原感染而死亡。研究表明,壬基酚会对贝类的免疫系统产生影响。例如壬基酚刺激可显著降低贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 血细胞溶酶体膜的稳定性^[11]。壬基酚还可影响菲律宾蛤仔 (*Tapes philippinarum*) 的免疫调节及诱导细胞凋亡^[12]。然而,关于壬基酚对贝类免疫相关基因表达

影响的研究还很有限,仍需进一步地探究。

因此,为了探索壬基酚刺激对贝类免疫系统的影响,以长牡蛎作为研究对象,通过实时定量荧光 PCR 的方法检测了不同浓度壬基酚暴露后,长牡蛎多个免疫相关基因的表达的变化。研究结果初步证实长牡蛎免疫相关基因参与壬基酚胁迫的响应,同时也为后续壬基酚对水生动物毒性机制以及养殖长牡蛎大规模死亡机制的解析奠定了基础。

1 材料方法

1.1 实验用长牡蛎及壬基酚暴露实验

实验用长牡蛎购于山东省烟台市长岛某水产养殖场,平均壳高为 68 mm。实验开始前,养殖于室内 50 L 的玻璃缸中,加满经过滤且不断充气的海水 ($18 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$),暂养 10 天以上。使用二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 制备壬基酚 (Sigma, USA) 的储备液 (1 mg/mL),用海水稀释至实验设定浓度。实验用长牡蛎共 150 只,随机分为三组:第一组为对照组,不做任何处理;第二组和第三组分别暴露于 20 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的壬基酚溶液中。实验期间每天定时投饵,更换海水,换水后重新添加壬基酚储备液至设定浓度。分别于壬基酚暴露后的 0 d、12 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d 和 7 d 每组

表 1 本研究所用引物及序列

引物名称	序列 (5' - 3')	用途
EF-1 α -QF	AGTCACCAAGGCTGCACAGAAAG	qRT-PCR
EF-1 α -QR	TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT	qRT-PCR
CgSOD-qRT-F	TTGTCAGGGGAGATTAAGGGAT	qRT-PCR
CgSOD-qRT-R	GTGCTCTTTGTTGAAGGGGTT	qRT-PCR
CgCAT-qRT-F	CCAACAACACTCTCGCTGAGGT	qRT-PCR
CgCAT-qRT-R	GGTGGGTGTCGGAGTAAGAG	qRT-PCR
CgGPX-qRT-F	GATTCCCCGTGAACCAGTTCG	qRT-PCR
CgGPX-qRT-R	CCGTTGACATCGCCTATTCCC	qRT-PCR
CgHSP70-qRT-F	AACGGTATCCTGAATGTGTC	qRT-PCR
CgHSP70-qRT-R	CTTCTCGTCTTCCTGCTTG	qRT-PCR
CgHSP90-qRT-F	CGAGGAAGCAGAAGCAGAG	qRT-PCR
CgHSP90-qRT-R	ATGTCAACAGACGGTTAGATAC	qRT-PCR
CgRel1-qRT-F	GCTACGAGTGTGAGGGGAGATCA	qRT-PCR
CgRel1-qRT-R	GGGAAACTGATGACGTTGGTGTC	qRT-PCR
CgRel2-qRT-F	GCATCCACACCATTCGTCC	qRT-PCR
CgRel2-qRT-R	CACATTCCAGCCTTCATTATCT	qRT-PCR

随机选取 3 只长牡蛎取其鳃组织，液氮速冻后于 -80°C 冰箱保存。

1.2 长牡蛎组织总 RNA 的提取和第一链 cDNA 合成

使用总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen, China) 提取长牡蛎鳃组织的总 RNA，利用琼脂糖凝胶电泳检测和 A260/A280 nm 的比值确定所提取 RNA 的质量，使用 PrimeScript RT 试剂盒 (Takara Bio, Japan) 进行第一链 cDNA 的合成。上述实验步骤均按照试剂盒说明书进行。

1.3 长牡蛎免疫相关基因的表达的测定

利用实时定量荧光 PCR (qRT-PCR) 检测长牡蛎免疫相关基因的表达情况。实验用引物序列见表 1。qRT-PCR 程序如下: 95°C , 3 min; 95°C , 5 s; 55°C , 15 s; 72°C , 30 s; 共 40 个循环。选择 EF-1 α (GenBank 登录号: AB122066) 作为内参基因，利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达量。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 16.0 对数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)，结果以平均值 $\pm$ 标准差 ($N=3$) 表示，当 $p < 0.05$ 时表示存在显著差异。

2 实验结果

2.1 长牡蛎抗氧化酶相关基因在壬基酚暴露之后的表达

本研究关注长牡蛎三个抗氧化酶：超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPX) 相关基因在不同浓度壬基酚暴露后的表达。

实验结果显示 (图 1(a))，当使用 $20\text{ }\mu\text{g/L}$ 的壬基酚刺激后，长牡蛎 *CgSOD* 基因表达相对稳定，在实验前 5 d，其表达量的变化不大，仅在实验的 5 d 和 7 d 出现小幅度的上升。当壬基酚的浓度升高至 $100\text{ }\mu\text{g/L}$ 时，*CgSOD* 表达量在刺激后的 12 h 就出现较为显著的上调，在 5 d 时 *CgSOD* 的表达量达到最大值。长牡蛎过氧化氢酶基因 *CgCAT* 对壬基酚刺激的响应更为明显 (图 1(b))，不同浓度壬基酚暴露后呈现出较为相似的表达模式。*CgCAT* 的表达在刺激 12 h 后就出现明显的上调，在 5 d 达到最大值。与此同时，研究发现：较高浓度壬基酚刺激后 *CgCAT* 表达量的变化幅度小于低浓度。谷胱甘肽过氧化物酶基因 *CgGPX* 的表达变

化结果显示 (图 1(c))，壬基酚刺激后，*CgGPX* 的表达量呈现较为明显的变化，在高浓度壬基酚刺激后 *CgGPX* 的表达量的变化幅度更大。低浓度壬基酚刺激 12 h 后，*CgGPX* 表达量显著上调，而在高浓度暴露 24 h 后，*CgGPX* 表达量才呈现较为显著的增加，*CgGPX* 表达量的最高值均出现在刺激后的 5 d。

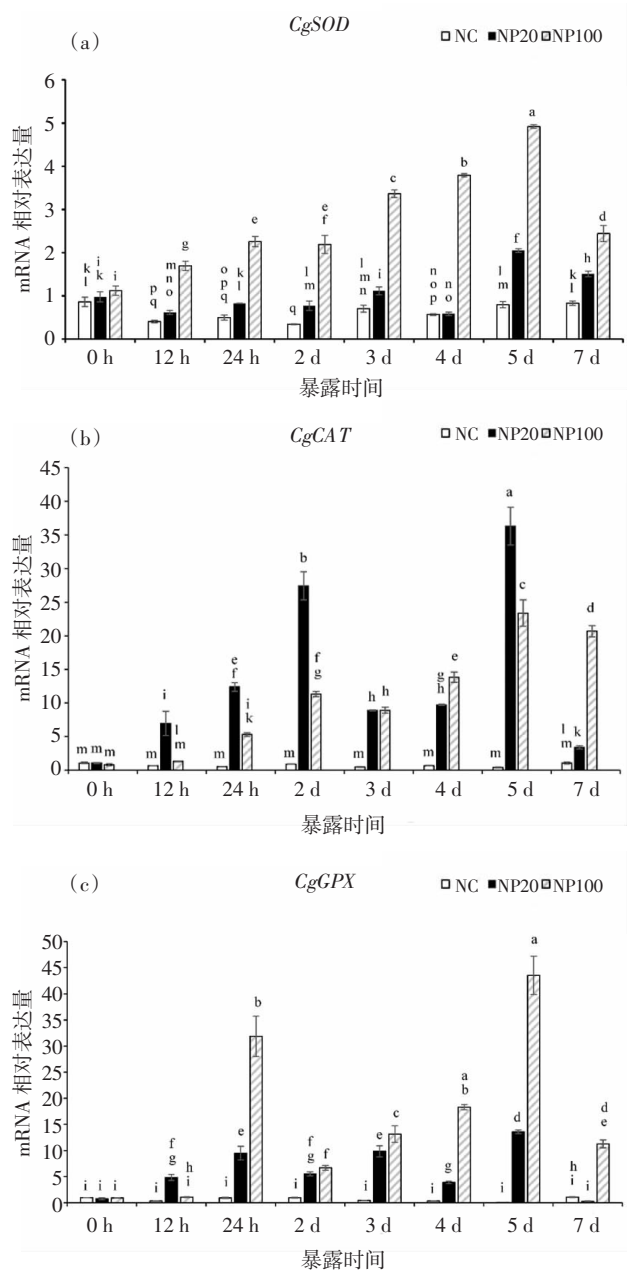


图 1 长牡蛎鳃组织抗氧化酶相关基因在壬基酚暴露后不同时间转录水平的变化

注：以 EF-1 α 为内参基因，0 h 样品为对照样品。竖条表示均值 $\pm$ SD ($N=3$)，不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)

2.2 长牡蛎热休克蛋白基因在壬基酚暴露之后的表达

热休克蛋白家族 (Heat shock proteins, HSPs) 是细胞在某些环境因素或应激条件刺激下形成的一类具有分子伴侣特性的蛋白质, 在生物体响应生物或非生物胁迫过程中发挥关键作用。本研究中, 长牡蛎两个 HSP 基因 *CgHSP70* 和 *CgHSP90* 在壬基酚刺激后的 mRNA 的表达情况如图所示 (图 2)。从结果可看出, 长牡蛎 *CgHSP70* 基因在壬基酚刺激后呈现出较为显著的变化。在高浓度壬基酚刺激时, *CgHSP70* 表达量升高的幅度较大, 且在 5 d 处于最高值。在壬基酚刺激后的大部分时间里, *CgHSP90* 基因表达略有下降, 5 d 后表达有所升高, 达到最大值。总体而言, *CgHSP70* 对壬基酚刺激的响应更为明显, 其表达量的变化幅度也更大。

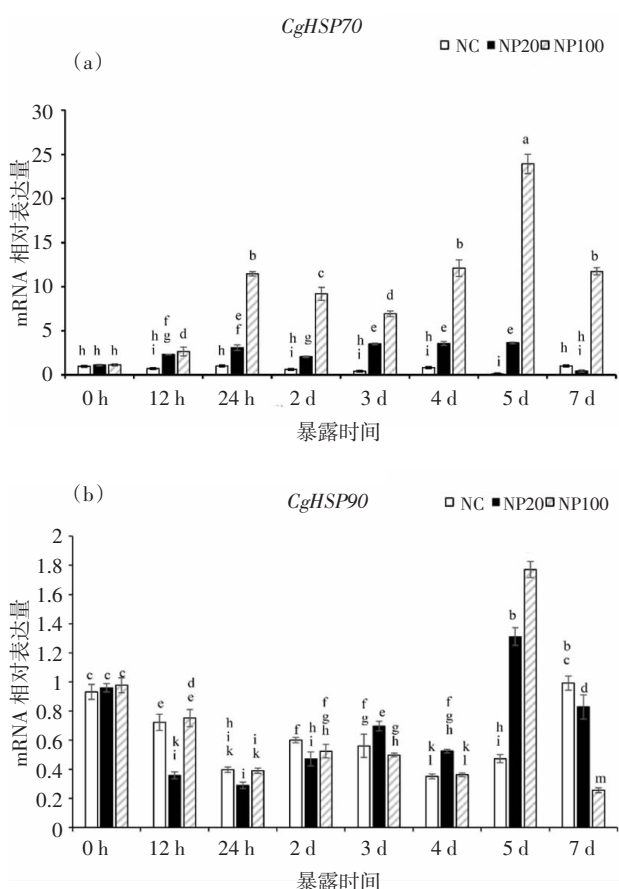


图 2 长牡蛎组织热休克蛋白基因在壬基酚暴露后不同时间转录水平的变化

注: 以 *EF-1 α* 基因为内参基因, 0 h 样品为对照样品。竖条表示均值 $\pm$ SD ($N=3$), 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)

2.3 长牡蛎 NF- κ B 转录因子家族基因在壬基酚暴露之后的表达

核转录因子 NF- κ B 是免疫系统机制的活化剂, 在生物应对环境刺激时发挥关键作用。在本研究中长牡蛎中的两个 Rel 基因 *CgRel1* 和 *CgRel2* 在壬基酚刺激后的响应情况如图 3 所示。不同浓度的壬基酚刺激下 *CgRel1* 基因呈现出不同的表达模式。当使用 20 μ g/L 壬基酚刺激时, *CgRel1* 基因的表达在 3 d 之前无明显变化, 在 4–7 d 表达量呈下调趋势。当壬基酚的浓度为 100 μ g/L 时, *CgRel1* 基因在各时间点呈上调表达, 在 5 d 上调最为明显。*CgRel2* 的表达大体上呈现的是先下降后上升的表达模式, 在壬基酚暴露 5 d 时 *CgRel2* 的表达量达到峰值。

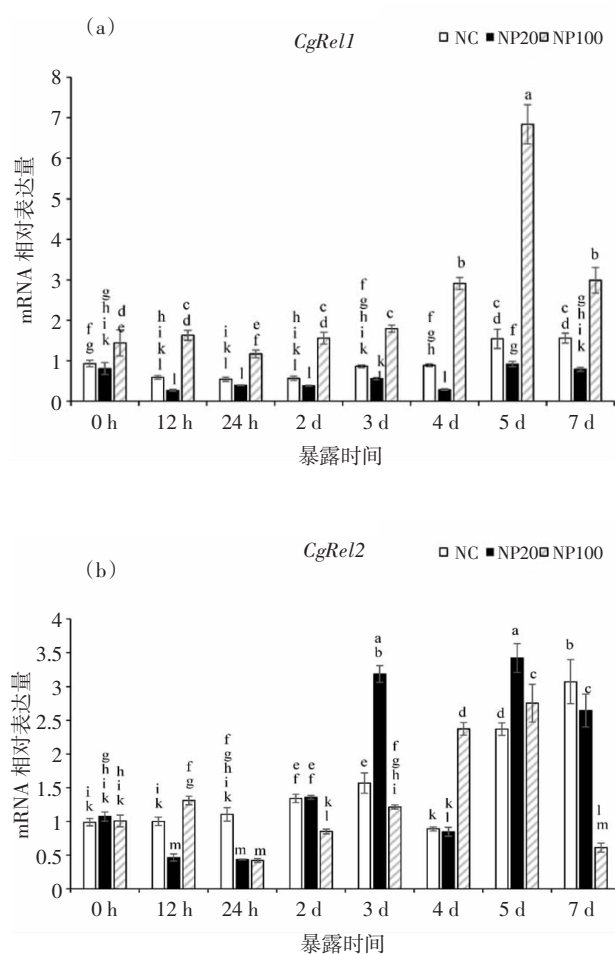


图 3 长牡蛎组织 NF- κ B 转录因子家族基因在壬基酚暴露后不同时间转录水平的变化

注: 以 *EF-1 α* 基因为内参基因, 0 h 样品为对照样品。竖条表示均值 $\pm$ SD ($N=3$), 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)

3 讨论

水产养殖动物为人们提供了大量优质蛋白质,但是病害问题的频发严重影响水产养殖产业的发展。研究显示,水产动物病害的发生往往是病原、宿主与环境相互作用的结果^[8,13]。环境因素在病原宿主互作过程中发挥的重要作用引起研究者的关注。壬基酚作为水环境中广泛存在的环境激素,必然会对海水养殖贝类的多个生理过程产生影响。本研究关注壬基酚对长牡蛎免疫系统的影响,研究壬基酚暴露后对长牡蛎免疫相关基因的表达进行探究。

抗氧化酶在机体清除体内多余的活性氧(ROS)以保护自身免受氧化损伤,以及先天免疫防御反应中发挥着关键作用^[14-15]。本研究利用qRT-PCR技术测定了长牡蛎 *CgSOD*、*CgCAT*、*CgGPX* 多个抗氧化酶基因在不同浓度壬基酚刺激下的表达情况。结果显示,在 20 $\mu\text{g/L}$ 壬基酚刺激时, *CgSOD* 的表达未发生大幅度的变化,这可能是由于长牡蛎抗逆性较强,面对低浓度的壬基酚刺激时不需要调动大量超氧化物歧化酶对外界刺激做出响应。然而当壬基酚浓度达到 100 $\mu\text{g/L}$ 时, *CgSOD* 的表达则出现明显的上升,推测此时高浓度的壬基酚刺激引起长牡蛎体内 ROS 的大量释放,长牡蛎需要产生大量超氧化物歧化酶从而调节体内超氧阴离子自由基(O_2^-)含量,以维持体内的动态平衡。

当前,对于贝类 CAT 基因克隆及其功能鉴定的结果表明, CAT 基因在贝类环境胁迫过程中发挥重要作用。例如,在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)中, *CfCAT* 在抗鳃弧菌刺激过程中发挥了关键作用^[16];长牡蛎 *CgCAT* 可能参与了机体应对金属镉胁迫,在机体代谢和保护细胞免受损伤过程中至关重要^[17]。本研究测定了长牡蛎 *CgCAT* 基因在壬基酚暴露后的表达情况。结果发现,在暴露后第 1 天 *CgCAT* 表达量即显著增加。但是在高浓度 100 $\mu\text{g/L}$ 壬基酚刺激时, *CgCAT* 表达量的变化幅度低于低浓度的变化。推测在低浓度壬基酚刺激时, *CgCAT* 可能参与多个生理过程以响应壬基酚的胁迫,因此变化较为显著。而高浓度壬基酚刺激后, *CgCAT* 变化量反而低于低浓度,可能是因为在高浓度壬基酚刺激时,长牡蛎启用其他的信号通路或

效应分子以应对壬基酚胁迫,因此 *CgCAT* 表达量反而低于低浓度的表达。当然,这仍需要更进一步的实验来支持该假设。

研究表明,长牡蛎 *CgGPX* 基因表达在金属镉刺激后其表达量显著升高^[17]。本研究关注的第三个抗氧化酶基因-谷胱甘肽过氧化物酶在壬基酚胁迫后的在长牡蛎体内的转录水平的变化结果显示,在不同浓度壬基酚刺激后,长牡蛎 *CgGPX* 表达量均表现出显著的变化,并且在高浓度刺激时, *CgGPX* 表达量的变化幅度较大,推测谷胱甘肽过氧化物酶作为一种关键的抗氧化酶,可能直接参与了长牡蛎抗壬基酚胁迫的过程中。

HSP 是存在于细胞中的一种主要的分子伴侣,在细胞的生长发育、代谢分化、基因转录和环境适应性方面发挥着重要作用,其最主要的功能是帮助错误折叠蛋白回到原来的状态,维持细胞的稳态,参与生物体响应外界的不良刺激如热激,病原体感染等,也在生物体应对非生物胁迫(如高温、缺氧、重金属胁迫)等过程中发挥着关键作用^[18]。在 HSP 蛋白家族中, HSP70 的研究最为深入。当生物体处于高温、重金属等逆境中时, HSP70 表达量会迅速上升,用以维持细胞完整性及机体正常代谢^[19]。因此,研究测定了长牡蛎 *CgHSP70* 基因在不同浓度壬基酚暴露后的基因表达变化情况。结果显示,长牡蛎鳃组织中的 *CgHSP70* 基因在刺激后表达量显著升高。并且当壬基酚的浓度升高时, *CgHSP70* 表达量升高的幅度更大,推测 *CgHSP70* 基因可能直接参与长牡蛎响应壬基酚胁迫的过程中。上述结果显示, *CgHSP70* 基因的高表达对壬基酚胁迫下长牡蛎机体细胞稳态及代谢分化的维持发挥着至关重要的作用。

除了 HSP70 之外, HSP90 也是一类关键的分子伴侣蛋白,在细胞发育、生理、免疫和进化等多种细胞途径中发挥核心作用^[20]。有关贝类 HSP90 功能的研究已经开展,如福寿螺(*Pomacea canaliculata*) *PocaHSP90* 基因在热刺激下,其表达显著升高^[21],菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*) *RpHSP90* 基因在苯并(a)芘(benzo(a)pyrene, BaP)暴露后其表达出现较为显著的变化^[22]。长牡蛎壬基酚暴露实验结果显示,在壬基酚刺激后的大部分时间里, *CgHSP90* 基因的表达呈现下降的趋势,只是在刺激后的 5 d 表达有所升高,据此推测该长牡蛎

CgHSP90 基因可能在牡蛎抗壬基酚胁迫中发挥了负调控的功能。当然, 由于长牡蛎基因组编码多个 HSP90 基因^[23], 不排除 *CgHSP90* 基因在长牡蛎发生了明显的功能分化。

NF- κ B 蛋白家族是一类多功能转录因子, 在生物应对环境刺激时往往发挥着关键作用^[24-25]。研究证实, 几乎在所有动物细胞均可发现 NF- κ B 有关基因的表达。NF- κ B 广泛参与细胞对刺激的反应, 如响应氧化应激、细胞因子、自由基、重金属、紫外线照射和细菌或病毒抗原等刺激。此外, NF- κ B 在调节宿主细胞对感染的免疫应答中起关键作用^[26-27]。截至目前, 已有两个 Rel 基因在长牡蛎中得到鉴定: *CgRel* 和 *CgRel2*。长牡蛎中 *CgRel* 基因通过调节 *CgIL17* 和 *CgBigDef1* 的表达以响应细菌的刺激, 在细菌免疫防御中发挥重要作用^[28]。本实验中 qRT-PCR 结果显示, 当低浓度壬基酚刺激时, *CgRel1* 基因的表达并未出现显著的表达升高, 而且呈现一定的下降模式。而壬基酚的浓度为 100 μ g/L 时, *CgRel1* 基因才呈现表达升高的模式。推测在低浓度壬基酚刺激时, *CgRel1* 可能并未完全参与抗壬基酚胁迫中, 而当壬基酚威胁进一步增大时, 长牡蛎中 *CgRel1* 的表达升高以维持机体稳定。长牡蛎 NF- κ B 家族的另一个成员 *CgRel2* 研究显示, *CgRel2* 可以对病原体感染作出响应, 参与免疫信号转导并激活 NF- κ B、TNF α 和 *CgIL-17* 报告基因^[29]。因此, 本研究也研究了长牡蛎 *CgRel2* 基因对壬基酚刺激的基因表达响应模式。在壬基酚暴露时, 长牡蛎 *CgRel2* 的表达大体上呈现的是先下降然后再升高的表达模式。表明壬基酚刺激前期, 长牡蛎可能依赖别的应激响应系统, 如抗氧化系统等来应对壬基酚胁迫。但随着暴露时间的延长, 长牡蛎 *CgRel2* 也参与壬基酚刺激的响应。总的说来, 长牡蛎 NF- κ B 家族成员参与到长牡蛎抗壬基酚胁迫的过程中。

4 结论

本文以长牡蛎为研究对象, 利用荧光定量技术研究不同浓度壬基酚暴露后长牡蛎免疫相关基因的转录表达变化情况。研究结果显示, 长牡蛎的抗氧化酶基因、热休克蛋白以及 NF- κ B 蛋白家族等基因在壬基酚胁迫后表达量出现较为明显的变化。

实验结果初步证明了壬基酚刺激可显著影响长牡蛎免疫相关基因的表达, 为以后结合病原刺激实验, 解析贝类大规模死亡原因打下基础, 同时也可明晰海洋贝类壬基酚胁迫响应机制提供参考。

参 考 文 献

- [1] WANG J, SHIM W J, YIM U H, et al. Nonylphenol in bivalves and sediments in the northeast coast of China[J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, 22(11): 1735-1740.
- [2] 同帆, 高丹, 詹婷洁, 等. 壬基酚对鱼、藻、溞的毒性研究及风险评估[J]. 环境污染与防治, 2018, 40(9): 1049-1055.
- [3] SOARES A, GUIEYSSE B, JEFFERSON B, et al. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters[J]. Environment International, 2008, 34(7): 1033-1049.
- [4] KWAK H-I, BAE M-O, LEE M-H, et al. Effects of nonylphenol, bisphenol a, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*)[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001, 20(4): 787-795.
- [5] NICE H E. Sperm motility in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is affected by nonylphenol[J]. Marine Pollution Bulletin, 2005, 50(12): 1668-1674.
- [6] 张国范, 李莉, 阙华勇. 中国牡蛎产业的嬗变——新认知、新品种和新产品[J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(4): 740-749.
- [7] 白昌明, 辛鲁生, 王崇明. 软体动物疱疹病毒及其对贝类养殖产业的危害[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 214-226.
- [8] 宋林生. 海水养殖贝类病害预警预报技术及其应用[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(1): 1-9.
- [9] AGIUS J R, CORBEIL S, HELBIG K J. Immune Control of Herpesvirus Infection in Molluscs[J]. Pathogens, 2020, 9(8): 618.
- [10] PETTON B, DESTOUMIEUX-GARZ N D, PERNET F, et al. The Pacific oyster mortality syndrome, a polymicrobial and multifactorial disease: state of knowledge and future directions[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 630343.
- [11] CANESI L, LORUSSO L C, CIACCI C, et al. Environmental estrogens can affect the function of mussel hemocytes through rapid modulation of kinase pathways[J]. General and Comparative Endocrinology, 2004, 138(1): 58-69.
- [12] MATOZZO V, MARIN M G. 4-Nonylphenol induces immunomodulation and apoptotic events in the clam *Tapes philippinarum*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2005, 285: 97-106.
- [13] 董波, 相建海, 杨鸣, 等. 海水养殖生物病害发生和抗病力的基础研究[J]. 中国基础科学, 2003, (6): 21-26.
- [14] HAN J, LU Y, ZHENG H, et al. Differential expression of CuZnSOD gene under low temperature stress in noble scallop *Chlamys nobilis* with different carotenoid content[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 30-39.
- [15] NI D, SONG L, GAO Q, et al. The cDNA cloning and mRNA expression

- ssion of cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) gene in scallop *Chlamys farreri*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(5): 1032–1042.
- [16] LI C, NI D, SONG L, et al. Molecular cloning and characterization of a catalase gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24(1): 26–34.
- [17] JO P G, CHOI Y K, CHOI C Y. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2008, 147(4): 460–469.
- [18] MULTHOFF G, POCKLEY A G, SCHMID T E, et al. The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation[J]. Cancer Letters, 2015, 368(2): 179–184.
- [19] 王卓, 曹云师, 李雪梅, 等. Hsp70 及其辅助伴侣分子的分子结构和生物学功能研究进展[J]. 动物医学进展, 2020, 41(10): 107–111.
- [20] ZHAO R, HOUY W A. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2005, 83(6): 703–710.
- [21] XU Y, ZHENG G, DONG S, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of HSP60, HSP70 and HSP90 in the golden apple snail, *Pomacea canaliculata*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 41(2): 643–653.
- [22] LIU T, PAN L, CAI Y, et al. Molecular cloning and sequence analysis of heat shock proteins 70 (HSP70) and 90 (HSP90) and their expression analysis when exposed to benzo (a) pyrene in the clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Gene, 2015, 555(2): 108–118.
- [23] ZHANG G, FANG X, GUO X, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation[J]. Nature, 2012, 490(7418): 49–54.
- [24] SUN S C, LEY S C. New insights into NF- κ B regulation and function[J]. Trends in Immunology, 2008, 29(10): 469–478.
- [25] WONG E T, TERGAONKAR V. Roles of NF- κ B in health and disease: mechanisms and therapeutic potential[J]. Clinical Science, 2009, 116(6): 451–465.
- [26] YUAN S, ZHANG J, ZHANG L, et al. The Archaic Roles of the Amphioxus NF- κ B/I κ B Complex in Innate Immune Responses[J]. The Journal of Immunology, 2013, 191(3): 1220–1230.
- [27] LI C, WANG S, HE J. The Two NF- κ B Pathways Regulating Bacterial and WSSV Infection of Shrimp[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 1785.
- [28] LI Y, SUN J, ZHANG Y, et al. CgRel involved in antibacterial immunity by regulating the production of CgIL17s and CgBigDef1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 474–482.
- [29] DONG J, SANG X, SONG H, et al. Molecular characterization and functional analysis of a *Rel* gene in the Pacific oyster[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 101: 9–18.

(本文编辑:袁泽轶)