

# 中华绒螯蟹螺原体对中华绒螯蟹和 RAW264.7 细胞免疫反应研究

孟庆国<sup>1</sup>, 黄艳青<sup>2</sup>, 靳明建<sup>3</sup>, 顾伟<sup>1</sup>, 王文<sup>1</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室,  
江苏省水生甲壳动物病害重点实验室, 江苏 南京 210046)

(2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090)

(3. 江苏省如东县渔业技术推广站, 江苏 南通 226400)

**[摘要]** 中华绒螯蟹螺原体是一种引起中华绒螯蟹颤抖病的新型病原微生物, 对中华绒螯蟹养殖业造成了很大的损失. 虽然很多无脊椎动物免疫反应的研究已经报道, 但是螺原体引起宿主免疫反应的研究目前还未见报道. 中华绒螯蟹螺原体既可以感染中华绒螯蟹, 也可以感染乳鼠. 本文在动物个体水平上研究了中华绒螯蟹螺原体与中华绒螯蟹的免疫关系, 中华绒螯蟹经螺原体刺激后, 其体内抗脂多糖因子、酚氧化酶原、酚氧化酶原激活因子、消极素轻链等基因的 mRNA 的表达水平显著上升, 而抗氧化蛋白 Prx 6 的表达量显著下降. 本文还在细胞水平研究了中华绒螯蟹螺原体与小鼠巨噬细胞之间的免疫关系, 中华绒螯蟹螺原体刺激后, 细胞中 CD40、IL-1 $\beta$ 、IL-10 基因的 mRNA 表达量显著下降, 而 TGF- $\beta$ 1 和 TNF- $\alpha$  等基因的表达量上升. 本实验结果说明螺原体可以引起寄主很广泛的免疫反应.

**[关键词]** 中华绒螯蟹, RAW264.7 细胞, 螺原体, 免疫反应

**[中图分类号]** Q936 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2012)02-0077-06

## The Immune Responses in Chinese Mitten Crab *Eriocheir Sinensis* and RAW264.7 Cell Line Challenged With *Spiroplasma Eriocheiris*

Meng Qingguo<sup>1</sup>, Huang Yanqing<sup>2</sup>, Jin Mingjian<sup>3</sup>, Gu Wei<sup>1</sup>, Wang Wen<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity & Biotechnology and Jiangsu Key Laboratory for Aquatic Crustacean Diseases,  
School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2. Key and Open Laboratory of Marine and Estuary Fisheries, Ministry of Agriculture of China, East China Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

(3. Rudong Station for Fisheries Technology Extension, Nantong 226400, China)

**Abstract:** *Spiroplasma eriocheiris* is a new kind of pathogen in aquaculture and causes mass mortality of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*, but little is known about the immune responses in *E. sinensis* challenged with this agent. Although immune responses in invertebrates have been widely studied, spiroplasma-induced innate immune responses have not been reported. The mRNA expressions of anti-lipopolysaccharide factor (ALF), prophenoloxidase (proPO), prophenoloxidase-activation factor (PPAF), pacifastin light chain (PLC) and peroxiredoxin 6 (Prx6) immune-related genes were examined in order to estimate the effects of *S. eriocheiris* on the innate immunity of *E. sinensis*. All of the mRNA expressions of above genes except for Prx6 were significantly up-regulated after *S. eriocheiris* challenge. But the mRNA expression of Prx6 was significantly down-regulated after the same treatment. *S. eriocheiris* not only cause tremor disease of *E. sinensis*, but also can cause suckling mouse cataract just like *Spiroplasma mirum*. So we chose RAW264.7 cell line, a murine macrophage-like cell, to study the relationship between the *S. eriocheiris* and the host in cell level. The expression levels of CD40, IL-1 $\beta$ , IL-10 in RAW264.7 cells were up-regulated after challenge with *S. eriocheiris*, while the expression levels of TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  were down-regulated. The results suggested that broad-spectrum immune re-

收稿日期: 2012-03-07.

基金项目: 国家自然科学基金(31170120)、江苏省自然科学基金(2011104SBZ0122)、江苏省普通高校自然科学基金(2011104TSJ0154)、江苏省水产三项工程项目(PJ2011-65).

通讯联系人: 王文, 博士, 教授, 研究方向: 水生甲壳动物病害. E-mail: njnuwang@263.net

sponses could be induced by *S. eriocheir* in both *E. sinensis* and RAW264. 7 cell.

**Key words:** *Spiroplasma eriocheiris* , RAW264. 7 cell , *eriocheir sinensis* , immune response

中华绒螯蟹( 俗称河蟹) 是中国淡水养殖业中重要的养殖品种, 但是病害一直危害其健康发展, 其中“颤抖病”是最严重的一种病害, 对江苏、安徽、浙江等长江中下游地区的河蟹养殖业造成了极大的危害<sup>[1-2]</sup>, 前期研究表明螺原体是中华绒螯蟹“颤抖病”的致病菌<sup>[3]</sup>. 通过系统分类学、血清学等方面的研究, 命名该菌株为螺原体的新种 *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov<sup>[4]</sup>, 这是首个被命名的淡水甲壳动物螺原体. 螺原体( *Spiroplasma*) 是一类缺乏细胞壁、呈高度多形性、能通过 220 nm 孔径滤器、能运动的、可在无生命培养基中生长繁殖的最小原核细胞型微生物, 属于柔膜体纲( *Mollicutes*) 、虫原体目( *Entomoplasmatales*) 、螺原体科( *Spiroplasmataceae*) 、螺原体属( *Spiroplasma*)<sup>[5]</sup>. 传统上认为螺原体只与昆虫和植物有关, 而最近从甲壳类动物分离到螺原体的事实改变了我们对螺原体宿主范围的认识<sup>[6]</sup>.

通过 16S rDNA 序列制作的系统进化树来看, 中华绒螯蟹螺原体与非凡螺原体( *Spiroplasma mirum*) 亲缘关系最近<sup>[2]</sup>. 而前期研究证实, 中华绒螯蟹螺原体不仅能引起河蟹的“颤抖病”, 还能像非凡螺原体一样引起乳鼠产生白内障症状<sup>[7]</sup>. 最近研究发现非凡螺原体与疯牛病、羊瘙痒病等脑部的严重疾病相关联<sup>[8]</sup>. 因此本论文中不仅选择无脊椎动物中华绒螯蟹作为感染对象, 还以脊椎动物小鼠 RAW264. 7 细胞为对象, 在河蟹个体水平和小鼠 RAW264. 7 细胞水平上, 研究螺原体感染后 2 个宿主免疫相关基因表达量的变化情况. 本文的研究为初步探索螺原体的分子致病机理和建立有效的防治技术奠定基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

螺原体按照本实验室建立的方法<sup>[2]</sup>分离自患病中华绒螯蟹体内, 用 R2 培养基在 30℃ 条件下培养.

### 1.2 动物实验和 Realtime PCR 实验

健康的中华绒螯蟹购自南京某水产品市场( 50 ± 3) g, 经 PCR、ELISA 和显微镜检测无螺原体等病原菌, 分成 2 组( 每组 40 只中华绒螯蟹), 暂养 1 周后分别注射 PBS( 对照组) 或培养至对数期的螺原体( 10 μg/只, 0. 1 mg/mL) ( 实验组). 期间每天投喂人工配合饲料, 每天换水. 分别在感染后的 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 用 1 mL 医用无菌一次性注射器从中华绒螯蟹附肢关节结合处抽取约 0. 2 mL 血淋巴, 加入等体积的抗凝剂( 葡萄糖, 2. 05 g; 柠檬酸, 0. 8 g; NaCl, 0. 42 g; 双蒸水定容至 100 mL), 5 只中华绒螯蟹的样品混合, 样品 4℃ 1 000 g 离心 10 min 以收集血细胞.

表 1 文中所用到的引物序列

Table 1 Primers used in the present study

	Forward primer	Reverse primer
ALF	5'-GACGCAGGAGGATGCTAAC-3'	5'-TGATGGCAGATGAAGGACAC-3'
proPo	5'-CCATCCCTTCTGCTTACCA-3'	5'-CTCCATCACAAACCCTAACGACTT-3'
PPAF	5'-CGTGCCCTACTACCTGTGC-3'	5'-CGATGCCTTGAGTGTTCCTA-3'
PLC	5'-GTGTCAATGGCCGAGGGATC-3'	5'-GACGCAGCGGCAGTTGTTG-3'
Prx6	5'-ACCCATCGGACTACACCCAG-3'	5'-GGACCAATGACAAAGACAGCA-3'
β-actin	5'-GCATCCACGAGACCACTTACA-3'	5'-GCATCCACGAGACCACTTACA-3'
IL-1β	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG-3'	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
TNF-α	5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3'	5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
CD40	5'-GTCATCTGTGTTTAAAGTCCCG-3'	5'-AGAGAAACACCCCGAAAATGG-3'
TGF-β1	5'-TGACGTC ACTGGAGTTGTACGG-3'	5'-GGTTCATGTCATGGATGCTGC-3'
IL-10	5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
HPRT	5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3'	5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3'

应用 Trizol ( Invitrogen , USA) 方法参照试剂盒说明书提取中华绒螯蟹血细胞的总 RNA, 利用 Prime-Script RT reagent Kit 试剂盒( Takara , Japan) 反转录总 RNA 为 cDNA. 应用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒( Takara , Japan) 进行 Realtime PCR 实验对免疫相关基因进行定量. PCR 反应采用 25 μL 反应体系: 12. 5 μL 2 × SYBR Premix Ex Taq, 上下游引物分别 1 μL, 1 μL 反转录的 cDNA 和 9. 5 μL DEPC 处理过的双蒸水. Realtime PCR 程序如下: 95℃ 预变性 2 min, 接着 40 个循环的 PCR 反应( 95℃ 10 s、60℃ 30 s). 用于定

量的河蟹免疫基因有 ALF、proPO、PPAF、PLC 和 Prx6 ,同时选择  $\beta$ -actin 基因作为内参基因 ,引物序列见表 1. 不同基因的相对表达水平用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法 ( $\Delta\Delta CT = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照}$ ) 进行计算 ,数据分析采用  $t$  测验方法 ,当  $p < 0.05$  时被判定为差异显著.

### 1.3 RAW264.7 细胞培养和 Realtime PCR 实验

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下 ,用含 10% 胎牛血清和抗生素( 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素) 的 1640 完全培养液培养. 培养好的 RAW264.7 细胞加入 *S. eriocheiris* 至终比例为 1:100 ,分别在诱导刺激后 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h 从细胞中提取总 RNA ,反转录成 cDNA ,具体操作如上

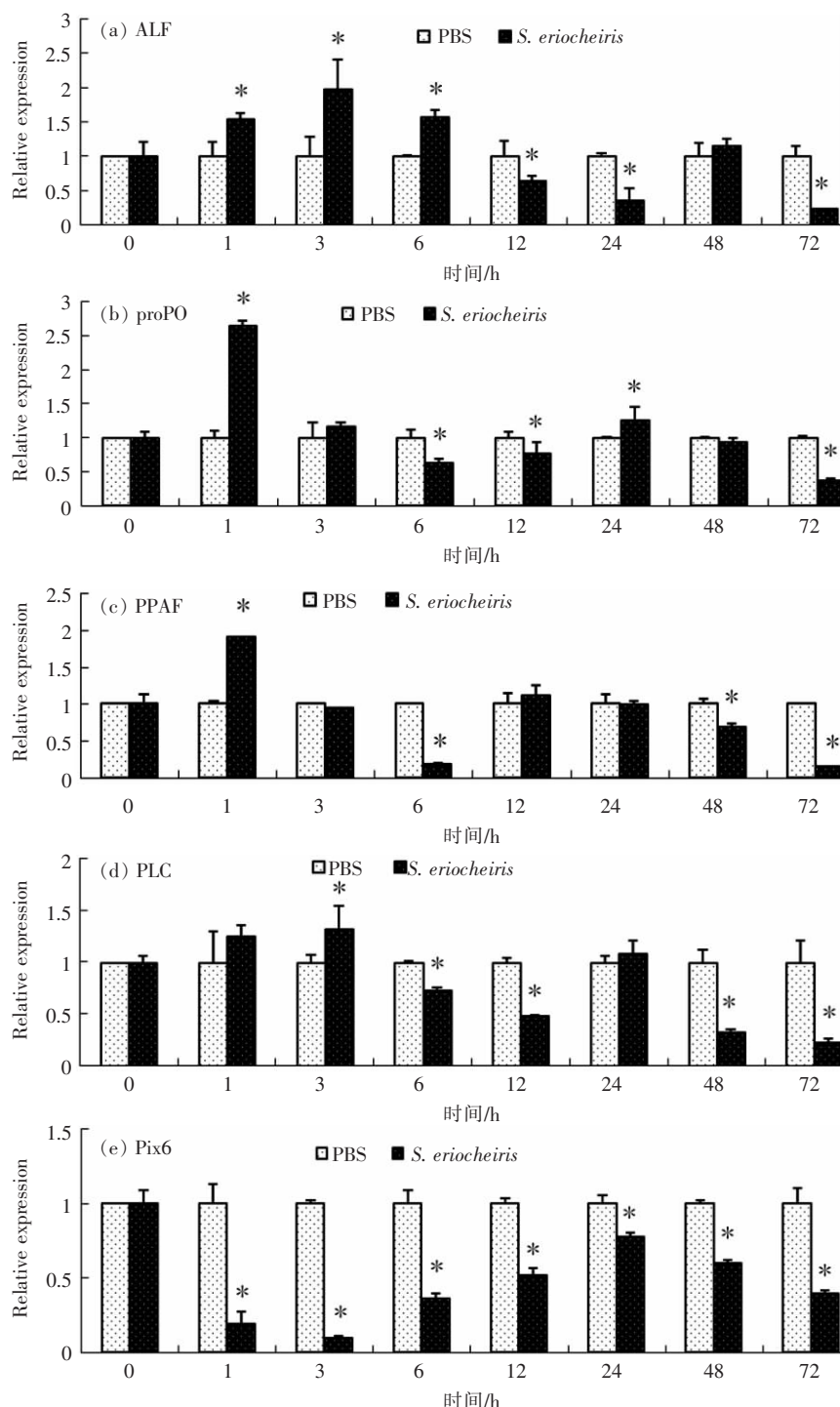


图 1 实时定量 PCR 分析中华绒螯蟹免疫相关基因的表达情况. (a)ALF 的表达分析; (b)proPo 的表达分析; (c)PPAF 的表达分析; (d) PLC 的表达分析; (e)Prx6 的表达分析

Fig.1 The expression level of ALF, PPAF, proPO and PLC in *E. sinensis* hemocytes. (a) the expression level of ALF; (b) the expression level of proPO; (c) the expression level of PPAF; (d) the expression level of PLC; (e) the expression level of Prx6

所述.用于荧光定量 PCR 的反应体系和程序如上.基因相对表达采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算,以 0 min 处理组作为空白对照组,次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因(HPRT)作为内参基因.

## 2 结果

### 2.1 螺原体刺激后中华绒螯蟹 5 种免疫相关基因的表达模式

为了研究 *S. eriocheiris* 诱导刺激对宿主免疫相关因子表达的影响,利用从中华绒螯蟹中克隆得到 ALF<sup>[9]</sup>, proPO<sup>[10]</sup>, PPAF<sup>[11]</sup>, PLC<sup>[12]</sup> 和 Prx6<sup>[13]</sup> 5 个因子的基因序列,用 *S. eriocheiris* 进行刺激中华绒螯蟹,收集血淋巴细胞并提取总 RNA,Realtime RT-PCR 分析各基因的表达,同时设置 PBS 刺激组作为对照.

如图 1 所示,对照组 0 h ~ 72 h 表达量变化不大,差异不显著;*S. eriocheiris* 诱导刺激后,ALF mRNA 表达量逐渐增加,在 3 h 时达到最大值(2 倍),3 h 后表达量逐渐减少,24 h 后又逐渐增加至正常值(48 h),72 h 时为最小值;proPo mRNA 表达量存在 2 个峰值,1 h 为最大值(2.7 倍),1 h 后表达量逐渐减少,6 h 后表达量逐渐增加,24 h 为第 2 个峰值,而后逐渐减少;PPAF mRNA 表达量在 1 h 达到最大值(2 倍),1 h 后逐渐减少,6 h 后又增加至 12 h、24 h 为正常值,24 h 后又开始减少;PLC mRNA 表达量逐渐增加,在 3 h 达到最大值(1.3 倍),3 h 后逐渐减少,12 h 后又增加至 24 h、为正常值,24 h 后又开始减少;Prx6 mRNA 表达量一直下调并处于较低水平.

### 2.2 小鼠巨噬细胞 Real time RT-PCR 分析

利用小鼠的 CD40、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$  和 IL-10 等先天性免疫相关基因,研究 *S. eriocheiris* 刺激小鼠巨噬细胞后这些基因表达量的变化情况.由图 2 可以看出,经 *S. eriocheiris* 刺激后,小鼠巨噬细胞中 IL-1 $\beta$  (0 h ~ 6 h) 和 IL-10 (0 h ~ 6 h) 的表达量显著降低到极低水平(0.02 倍);CD40 的表达量(0 h ~ 6 h) 也显著降低(0.7 倍),它们的表达量都稳定在一个较低的水平;TGF- $\beta$ 1 的表达量(0 h ~ 6 h) 一直处于上调状态,并在 2 h 和 4 h 达到峰值(2.6 倍);TNF- $\alpha$  的表达量在 2 h 和 4 h 时显著上调,但幅度不大(1.6 倍).

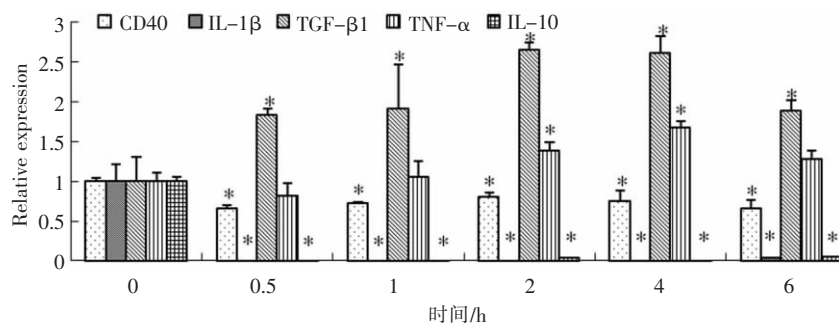


图 2 实时定量 PCR 分析小鼠巨噬细胞相关基因的表达情况

Fig.2 The expression levels of TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-10 and CD40 in RAW2647

## 3 讨论

螺原体作为最小的能自我复制的微生物之一,是一种新发现的水生甲壳类病原微生物<sup>[6]</sup>.除了是中华绒螯蟹等淡水甲壳动物的病原微生物,还是海水甲壳动物南美白对虾 *Litopenaeus vannamei* 的病原微生物<sup>[14,15]</sup>.*S. eriocheiris* 不仅能感染中华绒螯蟹、克氏原螯虾和南美白对虾等甲壳动物,引起“颤抖病”等重大流行病,还可以像 *S. mirum* 一样能引起乳鼠的白内障<sup>[7]</sup>,并且研究发现 *S. mirum* 与疯牛病、羊瘙痒病等脑部的严重疾病相关联<sup>[8]</sup>.为应对日益严峻的动物疾病,除了要利用传统的生物学技术研究病原微生物自身的特征,还要针对寄主的免疫特性进行研究,研究寄主和病原微生物之间的免疫关系.不仅要研究微生物与动物机体之间的免疫关系,还要研究微生物与动物在细胞水平上的免疫关系.

中华绒螯蟹感染 *S. eriocheiris* 后,体内 ALF、proPO、PPAF、PLC 和 Prx6 基因的表达发生了变化.这些基因都是中华绒螯蟹的主要免疫基因,并且这些基因全序列已经被发现<sup>[16,17]</sup>.本文首次研究螺原体和甲壳动物之间的免疫关系. ALF 在甲壳动物先天性免疫中是一个重要的调节因子,它首先被发现作为一种潜在的抗凝剂,可以抑制外毒素介导的激活凝集通路<sup>[18]</sup>.随后的研究显示,ALF 既具有强大的抗革兰氏阴性

细菌的活性,又能抑制革兰氏阳性细菌的生长<sup>[19]</sup>。在目前研究的甲壳动物中,白斑综合病病毒(WSSV)可以引起龙虾 *Pacifastacus leniusculus* ALF 基因的上调, RNA 干扰试验表明, ALF 基因可以保护 *P. leniusculus* 以对抗 WSSV 的感染<sup>[20]</sup>。近期研究显示, 双链 RNA<sup>[21]</sup> 和鳃弧菌 (*V. anguillarum*)<sup>[9]</sup> 都可以引起中华绒螯蟹 ALF 基因的上调。本次试验结果表明, *S. eriocheiris* 刺激中华绒螯蟹后, 也能引起 ALF 的上调。由此可以看出, ALF 不仅能抑制含有细胞壁细菌的活性, 对无细胞壁的螺原体也有作用。虽然经 *S. eriocheiris* 刺激后 ALF 表达量上升的具体机理还不清楚, 但是 ALF 基因对增强中华绒螯蟹免疫力以对抗 *S. eriocheiris* 的感染具有正向调节作用。

酚氧化酶原系统 (proPO system) 是无脊椎动物体内非常重要的先天性免疫系统, 一旦病原侵入机体, 酚氧化酶原系统会在丝蛋白酶的催化下使酚氧化酶前体 (proPO) 转变为有活性的酚氧化酶 (phenoloxidase, PO)。在无脊椎动物体内, 丝蛋白酶和丝蛋白酶抑制剂起到非常重要的生理作用, 它们起到相互克制和动态平衡的作用, 例如: 食物消化、血淋巴凝结、胚胎发育和免疫反应。一旦它们之间的平衡被打破, 生物体正常的新陈代谢出现紊乱, 丝蛋白酶以及下游的反应对组织甚至机体起到破坏作用<sup>[22]</sup>。在甲壳动物中, 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 经 CpG 寡核苷酸刺激后<sup>[23]</sup>, 锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 经 LPS 刺激后<sup>[24]</sup>, 梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 经溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 刺激后<sup>[25]</sup>, proPO 基因都明显上调。中华绒螯蟹经鳃弧菌刺激后, proPO 基因也会上调<sup>[10]</sup>。*S. eriocheiris* 刺激中华绒螯蟹后, proPO 基因明显上调。酚氧化酶前体激活因子 (Prophenoloxidase-activation factor, PPAF) 可以激活酚氧化酶原变化为有活性的酚氧化酶。*S. eriocheiris* 刺激中华绒螯蟹后, PPAF 基因上调。同样, 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 刺激中华绒螯蟹后, 血细胞中的 PPAF 基因也会上调。消胞素 (*Pacifastin*) 是由一系列的丝蛋白酶抑制剂组成的大家族, 它由重链和轻链 2 部分组成。在本实验中, *S. eriocheiris* 刺激中华绒螯蟹后, 血细胞中的 PLC 基因表达量会上调。同样在鳃利斯顿氏菌 (*Listonella anguillarum*) 刺激中华绒螯蟹后<sup>[12]</sup>, PLC 基因表达量也会上调。考虑到酚氧化酶原系统是一个多功能的系统, 它可以在寄主与病原作用的不同阶段起作用<sup>[23]</sup>。因此, 一般病原刺激后酚氧化酶原相关基因的变化比较复杂。

抗氧化蛋白 (Peroxiredoxin) 是一类无硒的过氧化酶家族, 它能有效地减少或去除过氧化氢、过氧化亚硝基和其他一系列的过氧化物以保护机体器官对抗外界的氧化压力<sup>[26]</sup>。*S. eriocheiris* 刺激中华绒螯蟹后, 血细胞中的 Prx6 基因表达量显著下调, 而对照组无明显变化。同样的情况还发生在中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 经鳃弧菌刺激后<sup>[27]</sup>、斑节对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 经肽聚糖刺激后<sup>[27]</sup> 和中华绒螯蟹经鳃利斯顿氏菌刺激后<sup>[13]</sup>。

病原与整个动物有机体之间的关系非常复杂、难以深入研究, 而在细胞水平的研究相对简单。鉴于中华绒螯蟹细胞的培养条件不是很成熟, 我们选择小鼠巨噬细胞这一免疫相关细胞作为研究对象, 研究 *S. eriocheiris* 在细胞水平与寄主之间的免疫反应。在这一部分中, 我们研究了小鼠巨噬细胞被 *S. eriocheiris* 刺激后, TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、IL-1 $\beta$ 、IL-10 和 CD40 等先天免疫相关基因的表达变化情况。结果显示, *S. eriocheiris* 都可以引起这些基因的显著变化。合并发酵支原体 (*Mycoplasma fermentans*) 脂蛋白刺激 RAW264.7 细胞后能引起促炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的过表达<sup>[29]</sup>, 然而 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1 在应对不同螺原体脂蛋白刺激时有不同的变化<sup>[30, 31]</sup>。因此, 我们可以看出 RAW264.7 细胞在应对不同病原刺激时, 其细胞因子的反应大不相同。

在本文中我们研究了 *S. eriocheiris* 刺激后, 中华绒螯蟹和小鼠巨噬细胞免疫反应的变化, 包括脊椎动物和无脊椎动物的免疫反应。同鳃弧菌、鳃利斯顿氏菌、嗜水气单胞菌和双链 RNA 一样, *S. eriocheiris* 也可以引起中华绒螯蟹体内血细胞中 ALF、proPO、PPAF、PLC 和 Prx6 等免疫相关基因表达量的剧烈变化。*S. eriocheiris* 还可以引起小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、IL-1 $\beta$ 、IL-10 和 CD40 等细胞因子的显著变化。这是首次研究螺原体与寄主之间的免疫关系, 因此这方面的研究必将对螺原体致病机理的研究起到很大的推进作用。

#### [参考文献]

- [1] Wang W, Chen J X, Du K H, et al. Morphology of spiroplasmas in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* associated

- with tremor disease[J]. *Research in Microbiology*, 2004, 155(8): 630-635.
- [2] Wang W, Wen B H, Gasparich G E, et al. A spiroplasma associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Microbiology*, 2004, 150(9): 3 035-3 040.
- [3] Wang W, Rong L W, Gu W, et al. Study on experimental infections of *Spiroplasma* from the Chinese mitten crab in crayfish, mice and embryonated chickens [J]. *Research in Microbiology*, 2003, 154(10): 677-680.
- [4] Wang W, Gu W, Gasparich G E, et al. *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., a novel species associated with mortalities in *Eriocheir sinensis*, Chinese mitten crab [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(3): 2 745-2 752.
- [5] Gasparich G E, Whitcomb R F, Dodge D, et al. The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(3): 893-918.
- [6] Regassa L B, Gasparich G E. Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity [J]. *Frontiers in Bioscience*, 2006, 11(9): 2 983-3 002.
- [7] Megraud F, Gamon L B, McGarrity G J. Characterization of *Spiroplasma mirum* (suckling mouse cataract agent) in a rabbit lens cell culture [J]. *Infection and Immunity*, 1983, 42(3): 1 168-1 175.
- [8] Bastian F O, Sanders D E, Forbes W A, et al. *Spiroplasma* spp. from transmissible spongiform encephalopathy brains or ticks induce spongiform encephalopathy in ruminants [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2007, 56(9): 1 235-1 242.
- [9] Li C H, Zhao J M, Song L S, et al. Molecular cloning, genomic organization and functional analysis of an anti-lipopolysaccharide factor from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32(7): 784-794.
- [10] Gai Y C, Zhao J M, Song L S, et al. A prophenoloxidase from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: gene cloning, expression and activity analysis [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 24(2): 156-167.
- [11] 陈大显. 中华绒螯蟹表达序列标签(EST)分析及免疫相关基因的克隆、表达模式研究[D]. 上海: 华东师范大学生命科学学院, 2009.
- [12] Gai Y C, Wang L L, Song L S, et al. cDNA cloning, characterization and mRNA expression of a pacifastin light chain gene from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(5): 657-663.
- [13] Mu C K, Zhao J M, Wang L L, et al. Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin 6 from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 26(6): 821-827.
- [14] Nunan L M, Lightner D V, Oduori M A, et al. *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(6): 2 317-2 322.
- [15] Nunan L M, Pantoja C R, Salazar M, et al. Characterization and molecular methods for detection of a novel spiroplasma pathogenic to *Penaeus vannamei* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 62(3): 255-264.
- [16] Gai Y C, Wang L L, Zhao J M, et al. The construction of a cDNA library enriched for immune genes and the analysis of 7535 ESTs from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 27(6): 684-694.
- [17] Zhao D X, Song S, Wang Q, et al. Discovery of immune-related genes in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) by expressed sequence tag analysis of haemocytes [J]. *Aquaculture*, 2009, 287(3/4): 297-303.
- [18] Tanaka S, Nakamura T, Morita T, et al. Limulus anti-LPS factor: An anticoagulant which inhibits the endotoxin-mediated activation of coagulation system [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1982, 105(2): 717-723.
- [19] Somboonwivat K, Marcos M, Tassanakajon A, et al. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2005, 29(10): 841-851.
- [20] Liu H P, Jiravanichpaisal P, Soderhall I, et al. Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(21): 1 0365-1 0371.
- [21] Dong C, Zhao J, Song L S, et al. The immune responses in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* challenged with double-stranded RNA [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 26(3): 438-442.
- [22] Simonet G, Claeys I, Broeck J V. Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2002, 132(1): 247-255.
- [23] Lu K Y, Huang Y T, Lee H H, et al. Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated in vivo by CpG oligodeoxynucleotides [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 20(3): 274-284.
- [24] Ko C F, Chiou T T, Vaseeharan B, et al. Cloning and characterisation of a prophenoloxidase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2007, 31(1): 12-22.
- [25] Chen P, Li J, Li J, et al. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase gene in swimming crab *Portunus tuerkulatus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 28(1): 106-112.

(下转第88页)

- [20] Mencia A , Modamio H S , Redshaw N , et al. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyn-dromic progressive hearing loss [J]. *Nat Genet* , 2009 , 41( 5) : 609-613.
- [21] Hughes A E , Bradley D T , Campbell M , et al. Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract [J]. *Am J Hum Genet* , 2011 , 89( 5) : 628-633.
- [22] de Pontual L , Yao E , Callier P , et al. Germline deletion of the miR-17 approximately 92 cluster causes skeletal and growth defects in humans [J]. *Nat Genet* , 2011 , 43( 10) : 1 026-1 030.
- [23] Ma L , Young J , Prabhala H , et al. miR-9 , a MYC/MYCN-activated microRNA , regulates E-cadherin and cancer metasta-sis [J]. *Nat Cell Biol* , 2010 , 12( 3) : 247-256.
- [24] Tang F , Hajkova P , Barton S C , et al. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells [J]. *Nucleic Acids Res* , 2006 , 34( 2) : e9.

[责任编辑: 黄 敏]

---

( 上接第 82 页)

- [26] Wood Z A , Schrder E , Robin H J , et al. Structure , mechanism and regulation of peroxiredoxins [J]. *Trends in Biochemi-cal Sciences* , 2003 , 28( 1) : 32-40.
- [27] Zhang Q , Li F , Zhang J , et al. Molecular cloning , expression of a peroxiredoxin gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and the antioxidant activity of its recombinant protein [J]. *Molecular Immunology* , 2007 , 44( 14) : 3 501-3 509.
- [28] Maningas B , Koyama T , Kondo H , et al. A peroxiredoxin from kuruma shrimp , *Marsupenaeus japonicus* , inhibited by pep-tidoglycan [J]. *Developmental and Comparative Immunology* , 2007 , 32( 3) : 198-203.
- [29] Rawadi G , Roman-Roman S. Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism dis-tinct from that of lipopolysaccharide [J]. *Infection and Immunity* , 1996 , 64( 2) : 637-643.
- [30] Razin S , Yogev D , Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 1998 , 62: 1 094-1 156.
- [31] Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells [J]. *Physiological Reviews* , 2003 , 83( 2) : 417-432.

[责任编辑: 黄 敏]