

何秋璐, 胡长柏, 吴正彝, 等. 斑马鱼鳃黏膜免疫及共生菌群在鲤春病毒血症病毒局部侵染过程中的响应[J]. 华中农业大学学报, 2026, 45(1): 278-288. DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2026.01.025

斑马鱼鳃黏膜免疫及共生菌群在鲤春病毒血症病毒局部侵染过程中的响应

何秋璐¹, 胡长柏², 吴正彝², 杜佳燊², 赵旭阳²,
张玉军², 秘琮然², 阮国良¹, 王乾¹, 于永耀²

1. 长江大学动物科学学院, 荆州 434025; 2. 华中农业大学水产学院/湖北洪山实验室, 武汉 430070

摘要 为深入解析鱼类病毒性疾病的致病及微生物抗病作用的机制, 以斑马鱼为研究对象构建鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)局部侵染模型, 分析感染后不同时间(1、4、7和14 d)斑马鱼鳃组织病毒载量、病理和免疫相关基因表达情况, 并基于转录组和16S rRNA测序进一步探究斑马鱼鳃黏膜免疫相关基因和鳃表面菌群在急性感染期(4 d)和恢复期(14 d)的变化。结果显示, SVCV感染后斑马鱼鳃小片结构破坏、呼吸上皮脱落及炎症细胞浸润。在急性感染期(4 d), 抗病毒基因(*ifn γ* 、*mxr*)和促炎因子(*tnf α* 、*il1 β*)显著上调。感染后4 d鳃组织除了炎症反应强烈外, 其表面菌群也发生紊乱, 条件致病菌(如假单胞菌属等)丰度显著增加, 向组织内部发生移位, 机体同时启动抗病毒和细菌感染的免疫反应。感染后14 d鳃炎症反应和表面菌群结构均有所恢复。研究表明SVCV经鳃感染可损伤鳃物理屏障结构, 破坏黏膜菌群平衡, 导致继发性细菌感染。因此, 在病毒感染情况下应加强预防细菌病的暴发。

关键词 鲤春病毒血症病毒(SVCV); 斑马鱼; 鳃; 黏膜免疫; 共生菌群

中图分类号 X503.225; X171.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2026)01-0278-11

鳃作为鱼类重要的呼吸器官, 长期与水环境中的病原微生物接触, 使得鳃组织成为多种病原体入侵的首要门户^[1]。已有研究证实鳃相关淋巴组织(gill-associated lymphoid tissue, GIALT)并非简单的免疫细胞弥散分布区, 而是具有高度组织化的免疫微环境^[2], 被认定为硬骨鱼类关键的黏膜免疫场所^[3], 在抵抗病原体侵袭中发挥着重要的作用^[4-5]。初次感染时, 鳃黏膜可通过物理屏障、免疫细胞及体液免疫因子三重途径^[6], 快速激活先天性免疫应答并介导局部炎症反应, 以此快速识别并初步阻断病原体的入侵。当病原体再次入侵时, 鳃黏膜启动适应性免疫应答以特异性地清除病原体^[7], 在防止继发性感染方面起着重要的作用^[8-9]。

鱼类黏膜是免疫相关分子的重要载体, 其表面定植着复杂的共生微生物群落, 这些微生物与宿主形成互利共生关系, 共同构建抵御病原体入侵的生物屏障。在维持体内稳态条件下, 共生菌群参与宿

主的发育调控、代谢平衡和免疫防御, 具备稳定的益生功能^[10-12]。然而, 这种平衡会因细菌、病毒和寄生虫感染而遭到破坏^[13], 黏膜菌群的多样性和丰度会发生显著变化, 引发菌群的紊乱, 进而对宿主正常生理功能以及抵抗病原的能力造成影响^[14]。然而, 病毒感染对硬骨鱼类鳃黏膜免疫和微生物群稳态的影响尚未明晰。

水产养殖业面临的主要病害威胁源于细菌、病毒及寄生虫等病原体的感染, 其中病毒性疾病因其传播迅速、致死率高而危害尤为严重。随着集约化养殖模式的推广, 常引发区域性病情暴发, 破坏养殖生态系统平衡并造成重大经济损失^[15]。鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)在全国范围内流行, 几乎可以感染所有的鲤科鱼类, 致死率高达90%, 主要通过鳃和皮肤黏膜侵入宿主, 具有感染率高、发病迅速的特点^[16-18], 对我国水产养殖业构成严重威胁^[19], 但目前尚未开发出有效的药物和商

收稿日期: 2025-04-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(32102831); 中国博士后创新人才支持计划(BX20200145); 湖北省自然科学基金项目(2024AFB454)

何秋璐, E-mail: 1213467761@qq.com

通信作者: 王乾, E-mail: qianwang@yangtzeu.edu.cn; 于永耀, E-mail: yuyy@mail.hzau.edu.cn

业疫苗,因此,从免疫学和微生物学视角,开发一种兼具安全、有效与绿色养殖特性的新型治疗药物或策略,是亟待解决的关键问题。

本研究以斑马鱼为模型,通过鳃局部接种感染 SVCV,结合组织病理学评估、qPCR、转录组学和 16S rRNA 测序技术,系统研究病毒感染对宿主抗病毒免疫应答及鳃黏膜菌群的影响,旨在揭示鳃黏膜共生菌群的功能,为深入解析鱼类病毒性疾病的致病机理及微生物抗病作用机制提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼和养殖条件

实验鱼为 AB 型野生型斑马鱼,采购自国家斑马鱼资源中心(China zebrafish resource center)。斑马鱼的饲养与繁育在华中农业大学水产学院斑马鱼养殖系统中进行。养殖光照周期为照明 14 h 后黑暗 10 h,水温(28 ± 0.5) °C, pH 6.8~7.5,余氯 < 0.02 mg/L。

1.2 病毒扩增、活体感染和样本采集

1) SVCV 毒株扩增。采用鲤上皮瘤(epithelioma papulosum cyprini, EPC)细胞系进行培养,条件为 M199 基础培养基添加 10% 胎牛血清和双抗(青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μ g/mL),于 28 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。待细胞形成致密单层后接种病毒,每日监测细胞病变情况。当病变率超过 80% 时,收集细胞培养物悬液,经反复冻融 3 次后离心(4 000 r/min, 20 min)收集高纯度病毒悬液。将病毒悬液按 1 mL/1.5 mL EP 管分装,冻存于 -80 °C 备用。取 3 支分装后的病毒悬液按梯度稀释后接种到铺有 EPC 细胞的 96 孔板中,依据 Reed-Muench 法计算病毒悬液的 TCID₅₀ 值,以此确定后续感染实验所需的病毒使用量。

2) 鳃局部接种感染。选用健康成年斑马鱼随机分为对照组和试验组,对照组所有个体经 MS-222 (150 mg/L) 水溶液浸浴麻醉后,用无菌镊轻提鳃盖暴露鳃腔,使用移液枪将 20 μ L 无菌 M199 培养基缓慢滴入斑马鱼鳃上,另一侧鳃进行同样的操作,滴入培养基后用湿滤纸裹住斑马鱼 3 min,促进液体吸附,完成鳃部接种,随后置于清水中待其恢复正常游动;试验组接种 SVCV 病毒悬液(浓度 1×10^7 PFU/mL),操作步骤同对照组。所有斑马鱼恢复正常后转入循环水系统饲养。试验全程遵循动物福利伦理规范。

3) 鳃和脾脏组织样本采集。分别在感染后 1、4、7 和 14 d 采集斑马鱼鳃和脾脏组织样本。①组织病理学样本:取鳃组织于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,经梯度脱水后石蜡包埋;②分子检测样本和组学分析样本:无菌条件下采集鳃和脾脏组织,液氮速冻后于 -80 °C 保存。所有操作均在冰上完成,确保样本质量。

1.3 组织病理学观察

鳃组织样本经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,用 PBS 漂洗,依次通过梯度乙醇和二甲苯处理后进行石蜡包埋。使用轮转切片连续切片,厚度 5 μ m,每个试验组制备 3 个重复切片。经苏木精-伊红染色后,使用 CellSens 成像系统在 Olympus BX53 显微镜下观察。依据病变程度对鳃组织进行病理评分,病变越严重,分值越高。评分标准如下:鳃小片末端肿大弯曲(0~4 分)、鳃小片基底部组织水肿和破损(0~3 分)、呼吸上皮细胞出现空泡变性(0~3 分)。所有图像经 CellSens 统一处理后,由 3 位未参与试验设计的研究人员独立完成评分,评估过程不告知样本信息,图像名称由数字编号代替,评分结果取平均值。

1.4 RNA 提取和 qRT-PCR 分析

总 RNA 提取使用 Trizol 试剂(Invitrogen),严格遵循制造商推荐的操作流程。RNA 纯度及浓度通过 Nanodrop ND1000 分光光度计和琼脂糖凝胶电泳验证。使用反转录试剂盒(Hifair® III, Yeasen)进行反转录,将所得 cDNA 产物稀释 3 倍。定量 PCR 分析使用 SYBR Green Master Mix(Hieff™, Yeasen),反应程序设定为 95 °C 初始变性 5 min,随后 95 °C 变性 10 s、58 °C 退火/延伸 30 s, 40 个循环。每个样品设置 3 个平行,以 β -actin 为内参基因,采用比较 Ct 法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)计算目的基因的相对表达量。病毒绝对定量分析基于 SVCV-G 基因标准曲线进行。

1.5 鳃组织中免疫荧光定位分析

组织切片经脱蜡、抗原修复及 5% 牛血清白蛋白封闭后,与抗 SVCV-G 单克隆抗体 4 °C 孵育 12 h,之后用异硫氰酸荧光素(FITC)标记二抗 4 °C 避光反应 45 min, 4, 6-二脒基-2 苯基吲哚(DAPI)复染后封片,试验设置同型抗体对照。使用 Olympus BX53 荧光显微镜采集荧光信号,通过 CellSens 软件进行多通道图像合成和分析。

抗 SVCV-G 单克隆抗体由华中农业大学水产学院刘学芹教授课题组馈赠。

1.6 鳃部细菌的荧光原位杂交分析

5 μm 冰冻切片经甲醛固定及70%乙醇透化后,用DEPC-PBS充分漂洗。样本在37℃下预杂交2h后,将切片与Cy3标记的EUB338探针及其互补序列(阴性对照)37℃下孵育过夜,修复液洗涤后,滴加DAPI复染细胞核并用抗淬灭剂封片。使用Olympus BX53荧光显微镜采集荧光信号,通过CellSens软件进行多通道图像合成与分析。

1.7 RNA-Seq文库构建和转录组分析

分别在急性感染期(感染后4d)和恢复期(感染后14d)采集样本,严格遵循无菌操作规范,液氮速冻后-80℃保存,由欧易生物公司完成后续转录组测序工作。使用Trizol法提取总RNA,经质量检测确认样本纯度($D_{260}/D_{280}=1.8\sim 2.0$)和完整性($\text{RIN}\geq 7.0$),以满足转录组测序要求。采用VAHTS Universal V6建库试剂盒制备链特异性文库,主要步骤包括:RNA随机片段化、双链cDNA合成、末端修复及Illumina接头连接。在NovaSeq 6000测序平台完成双端测序(PE150),经严格质控后每个样本平均获得24M高质量clean reads。生物信息学分析采用HISAT2比对参考基因组,StringTie进行转录本定量。差异基因筛选设定阈值为 $|\log_2\text{FC}|\geq 1$ 且校正 P 值 < 0.05 。通过clusterProfiler软件包对差异基因进行功能注释和通路富集分析,解析宿主免疫应答相关信号通路的调控特征。

1.8 16S rRNA测序和分析

取样操作同本文“1.7”所述,将样品交由欧易生物公司完成后续16S rRNA测序工作。具体过程如下:采用MagPure Soil DNA试剂盒提取微生物组DNA,经紫外分光光度计检测浓度,琼脂糖凝胶电泳评估质量合格后,选用特异性引物扩增16S rRNA基因V3~V4可变区,扩增产物经磁珠纯化后构建Illumina测序文库。高通量测序在NovaSeq 6000平台完成,获得250 bp双端序列。在进行生物信息学分析前将原始数据使用质量过滤工具(Trimmomatic)和序列拼接工具(FLASH)严格去除低质量序列($Q20<75\%$)、短读长(<150 bp)及嵌合体(UCHIME)。之后基于97%相似度聚类OTU(Vsearch),采用RDP分类器(置信阈值0.7)注释物种。群落多样性分析包含 α 多样性(Chao1丰富度指数和Shannon多样性指数)和 β 多样性(unweighted Unifrac距离矩阵,配合PCoA可视化)。差异菌群鉴定采用LEfSe分析($\text{LDA}>2.0$),所有计算均在QI-

IME2环境中完成。

1.9 数据分析和数据存档保存

采用GraphPad Prism 8.0进行统计学分析和数据可视化,对照组和试验组的个体数目均满足 $N\geq 3$,2组间比较根据数据分布特征选择非配对 t 检验,所有统计检验均为双侧检验,显著性水平设定 $P<0.05$ 为具有统计学意义。

将转录组和16S rRNA测序原始数据上传到NCBI数据库中,本研究中转录组和16S rRNA数据的NCBI序列片段归档(SRA)登录号分别为PRJNA1256627(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1256627>)和PRJNA1257464(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1257464>)。

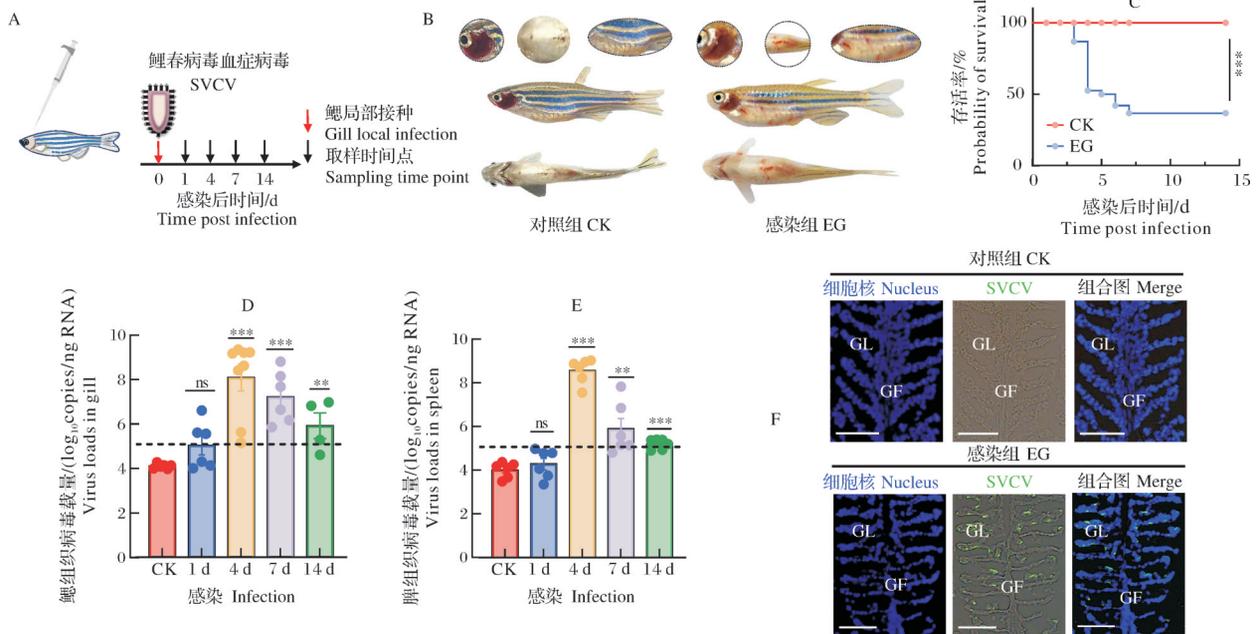
2 结果与分析

2.1 斑马鱼鳃局部接种SVCV感染模型构建

研究采用鳃局部接种建立斑马鱼SVCV感染模型(图1A),病毒感染后斑马鱼表现出游动迟缓、体表出血性病变、鳃丝颜色变白等典型的临床症状(图1B)。感染后3d开始出现死亡,4~7d为死亡高峰期,累计死亡率达60%(图1C),而对照组未出现异常症状。通过qPCR检测到在感染前期鳃组织内病毒载量快速上升,于感染后4d达到最高水平,而后病毒载量逐渐降低(图1D)。除鳃组织外,在免疫器官脾脏中也检测到SVCV的存在(图1E),表明SVCV从鳃组织侵入到体内组织。同时感染组鳃组织观测到明显的SVCV-G蛋白特异性绿色荧光信号,对照组中没有荧光信号(图1F)。该结果从蛋白水平证实了SVCV对鳃组织的成功侵染,表明鳃局部接种SVCV模型构建成功。

2.2 SVCV感染导致鳃组织病理变化和免疫相关基因的表达

通过苏木精-伊红染色对SVCV感染后不同时间点鳃组织的石蜡切片进行病理评估,对照组斑马鱼两侧鳃丝(gill filament, GF)清晰完整,排列整齐,鳃小片(gill lamella, GL)呈扁平囊状(图2A)。感染后4~7d,呼吸上皮细胞出现空泡变性(图2A中五角星所示)并大面积脱落,鳃小片末端肿大,隆起弯曲(图2A中箭头所示),鳃小片基底部组织水肿和破损(图2A中三角形所示),至感染后14d基本恢复正常(图2B)。qPCR分析结果显示,感染后促炎因子(tnfa , $\text{il1}\beta$)和趋化因子 ccl20 表达显著变化(图2C),表明机体启动了强烈的炎症反应。同时,抗病毒相关



A: 鳃局部接种 SVCV 模型示意图 Schematic diagram of the model of local infection of gills with SVCV; B: 体表特征对比 Comparison of body surface characteristics; C: 生存曲线 Survival curve; D~E: 鳃组织和脾脏中病毒载量 Viral load in gill and spleen; F: SVCV 的免疫荧光图 Immunofluorescence micrograph of SVCV. GF: 鳃丝 Gill filaments; GL: 鳃小片 Gill lamella. 图中的 ns 和星号表示不同显著水平 (ns 表示 $P > 0.05$, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$), 下同。The “ns” and asterisks in the figure indicate different levels of statistical significance (ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$). the same as below.

图 1 鳃局部接种 SVCV 模型构建

Fig.1 Establishment of the gill localized SVCV infection model

基因 (*il2*, *ita*, *mx*, *ifn γ*) 表达量增加, 说明宿主激活了抗病毒免疫防御机制。值得注意的是, *thr5a* 和 *il17a*

的表达增强暗示在 SVCV 感染过程中存在继发性细菌感染。

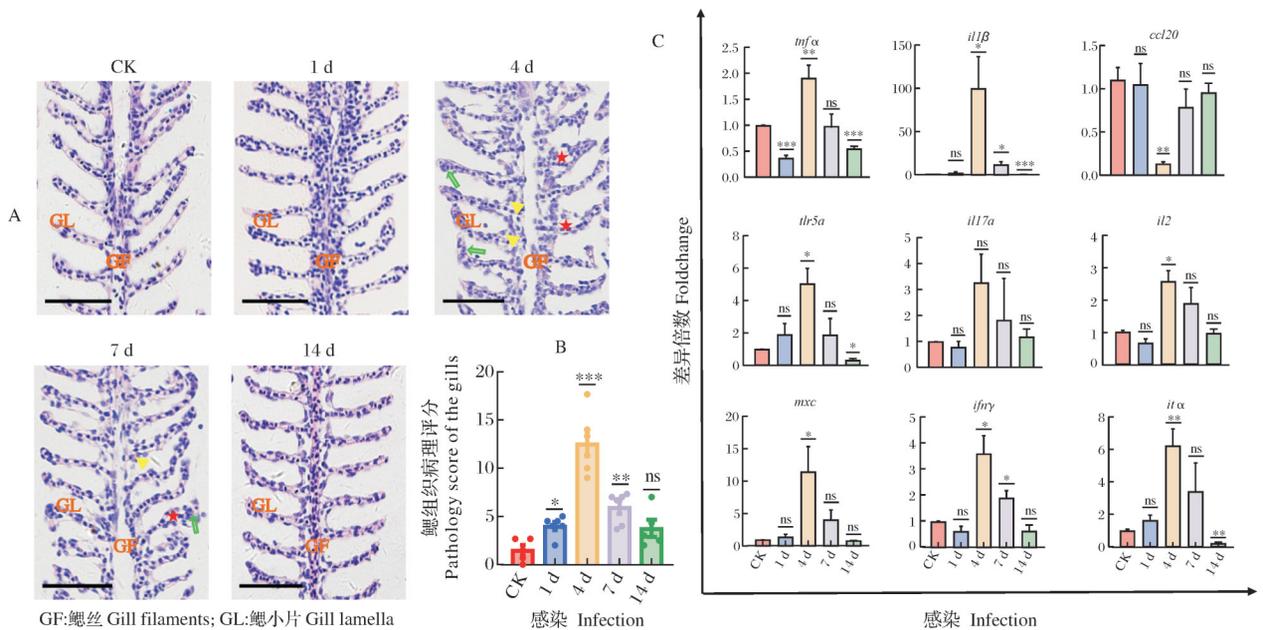


图 2 SVCV 感染后鳃组织不同时间点组织病理学变化 (A)、病理评分 (B) 和免疫基因表达变化 (C)

Fig.2 Histopathological alterations (A), pathology score (B) and immune gene expression dynamics (C) in gill during infection

2.3 感染后鳃组织转录组的差异表达谱

为进一步探究 SVCV 感染诱导斑马鱼鳃组织免疫应答的特征,通过 RNA-seq 技术获得感染后 4 d 和感染后 14 d 鳃组织的基因表达谱。主成分分析结果显示,感染后 4 d 表达谱显著区别于感染后 14 d 和对照组(图 3A),表明急性感染期宿主基因转录水平发生剧烈变化。差异表达分析鉴定出感染后 4 d 出现 3 576 个差异表达基因(其中上调 1 296 个,下调 2 280 个),而感染后 14 d 只有 184 个(图 3B)。此外,如图

3C~E 所示,抗病毒基因(*mx*、*ifna*、*hsp70*等)、促炎因子(*il12*、*il6*)和趋化因子(*ccl*、*cxcl*)在感染后 4 d 的表达量显著上调,而在感染后 14 d 略有下降,这显示斑马鱼鳃组织在感染急性期表现出强烈的抗病毒和先天免疫反应来抵抗 SVCV 入侵。同时感染后 4 d 中抗细菌基因(*hamp*、*lyz*)的高表达,再次表明 SVCV 感染可能引发继发性细菌感染。比较 qPCR 计算结果与 RNA-seq 测序结果,显示 2 组数据基本吻合($P < 0.05$,图 3F),验证了转录组测序数据的准确性。

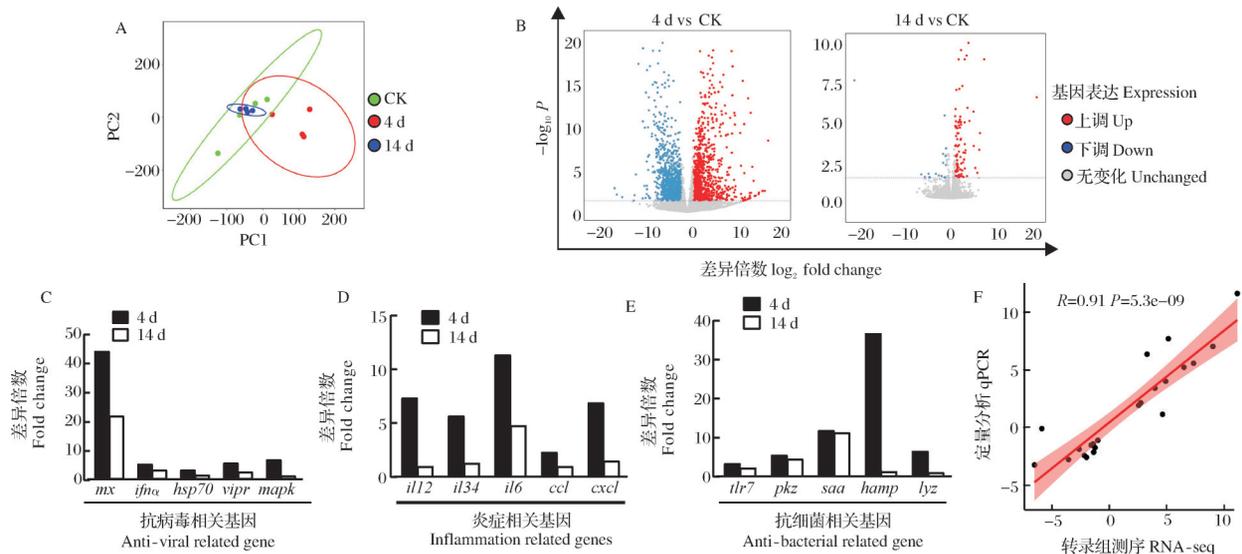


图3 鳃组织转录组聚类分析(A)、差异基因表达(B)、免疫相关基因差异变化(C,D,E)和转录组验证(F)

Fig.3 Gill transcriptome sequencing cluster analysis (A), differential gene expression (B), differential changes in immune-related genes (C,D,E), and transcriptome validation (F)

2.4 感染后差异表达基因的通路富集分析

基于转录组测序数据,利用 GO 和 KEGG 富集分析系统解析 SVCV 感染诱导的免疫调控网络。GO 分析显示,感染 4 d 后的差异基因主要富集于 I 型干扰素信号通路(如“干扰素生成调控”)、免疫细胞迁移(如“髓系白细胞趋化”)等生物学过程(图 4A)。分子功能层面,MHC II 类分子结合、信号受体活性等功能在感染后 4 d 显著增强,提示早期免疫应答以抗原呈递和信号转导为主。感染 14 d 后的差异基因则富集于“抗病毒防御”“适应性免疫应答”等过程,RIG- I 样受体结合、Ig 受体结合等功能激活,表明免疫应答从先天性免疫向适应性免疫转变(图 4B)。KEGG 通路分析进一步揭示,在感染 4 d 后差异基因主要参与细胞外基质互作、代谢重编程等通路(图 4C);而感染 14 d 后则偏向于氨基酸代谢、病毒生命周期相关通路(图 4D)。这种时序性变化特征表明宿主在急性感染期以快速免疫激活为主,恢复期则侧重于能量代谢调整和持续性免疫防御,反映宿

主通过动态调控代谢途径和免疫信号网络来应对病毒感染。

2.5 感染后鳃组织模式识别受体 (PRR) 通路的激活

Toll 样受体 (TLRs) 作为识别病原相关分子模式 (PAMPs) 的关键受体,在宿主-病原互作中发挥核心作用。针对 SVCV 感染过程中 TLRs 信号通路的调控机制对转录组数据展开分析,结果(图 5A)显示,TLR2、TLR3 和 TLR4 等受体,通过 MyD88 依赖和非依赖途径分别激活 PI3K-Akt、MAPK 和 NF- κ B 等关键信号转导通路,以此来特异性识别细菌组分,进而介导促炎因子(*tnfa*、*il6*)和 I 型干扰素的表达。如图 5B 所示,*tlr5a* 和 *tlr5b* 在感染后 4 d 表达上调,表明机体正通过先天免疫系统对病原体(尤其是细菌)发起针对性防御;而在感染后 14 d 表达量恢复至正常水平,提示 *tlr5a* 和 *tlr5b* 可能通过负反馈机制参与免疫应答的动态平衡,干扰素 *ifna* 呈现相似的表达模式。*irf3*/*irf7* 在感染后 4 d 显著上调,协同增强抗病

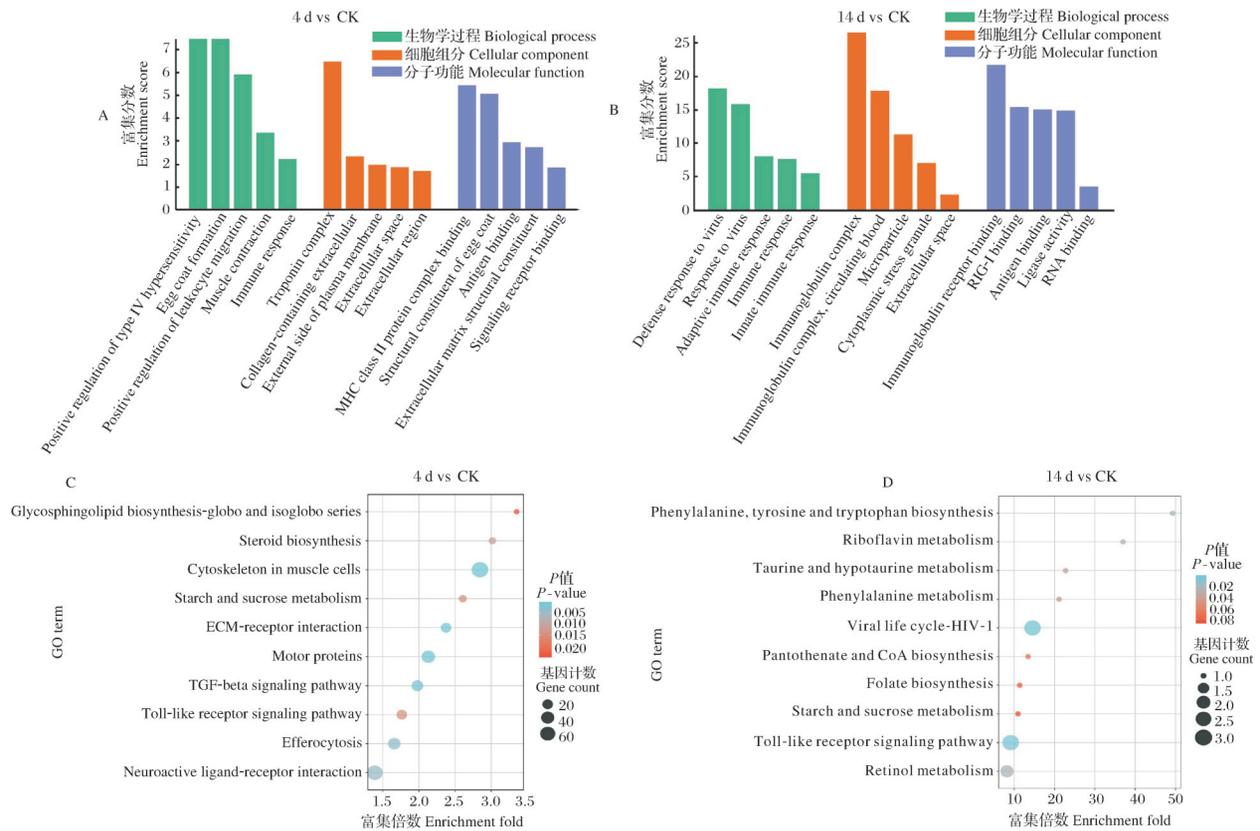


图 4 SVCV 感染后 4 d 和 14 d 斑马鱼鳃组织差异表达基因的 GO 富集分析(A, B)和 KEGG 通路富集分析(C, D)
 Fig.4 GO enrichment (A, B) and KEGG pathway analysis of differentially expressed genes (C, D) in zebrafish gill after SVCV infection

毒防御。同时, *il6* 和 *itac* 等炎症因子在感染后 4 d 的高表达表明在 SVCV 感染过程中机体发起免疫细胞募集, 另外 TLR5 作为细菌鞭毛蛋白的特异性受体, 其表达抑制可能影响宿主对继发细菌感染的防御能力。而 TLR3/7/8/9 等病毒敏感受体的陆续激活, 反映宿主持续监控病毒感染。

2.6 SVCV 感染介导斑马鱼鳃黏膜菌群的移位

如图 6 所示, SVCV 感染对斑马鱼鳃黏膜菌群空间分布造成影响。与对照组相比, 感染组在鳃丝表面和鳃小片间质区域均检测到更多的细菌特异性荧光信号。这一现象表明病毒感染导致鳃黏膜屏障功能受损, 使得更多条件致病菌突破鳃黏膜屏障, 在鳃组织上定植。

2.7 感染后鳃黏膜菌群群落组成的变化

为了证实 SVCV 感染对斑马鱼鳃部菌群的影响, 采用 16S rRNA 测序分析感染后菌群多样性和组成变化, 如图 7 所示。 α 多样性分析显示, 感染后 4 d Simpson 指数显著降低, 而感染后 14 d 逐步回升(图 7B), 表明菌群多样性先降低后恢复。 β 多样性 PCoA 分析表明, 感染后 4 d 的微生物组成区别于其

他两组, 形成独立聚类(图 7A), 证实 SVCV 感染初期导致菌群结构紊乱。进一步分析鳃黏膜菌群组成变化, 在门水平上(图 7C), 对照组以拟杆菌门(Bacteroidetes)为主 (>30%), 其次是厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)。感染后 4 d, 变形菌门成为优势菌门, 而厚壁菌门的丰度明显下降。至感染后 14 d, 厚壁菌门比例恢复至 21.5%。目水平上发现感染后 4 d 伯克氏菌目(Burkholderiales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)等条件致病菌显著增加, 而感染后 14 d 乳杆菌目(Lactobacillales)等有益菌群重新定植(图 7D)。属水平热图(图 7E)进一步揭示了感染后 4 d 莱因海默菌属(*Rheinheimera*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等致病菌属丰度明显升高, 而益生菌属如普雷沃氏菌属(*Prevotella*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)显著下降。感染 14 d 后, 拉氏菌科(Lachnospiraceae)和普雷沃氏菌属(*Prevotella*)等有益菌群逐渐恢复。这些结果揭示 SVCV 感染导致鳃部微生态失衡, 表现为急性期致病菌增殖和益生菌减少, 而恢复期菌群逐步重建。

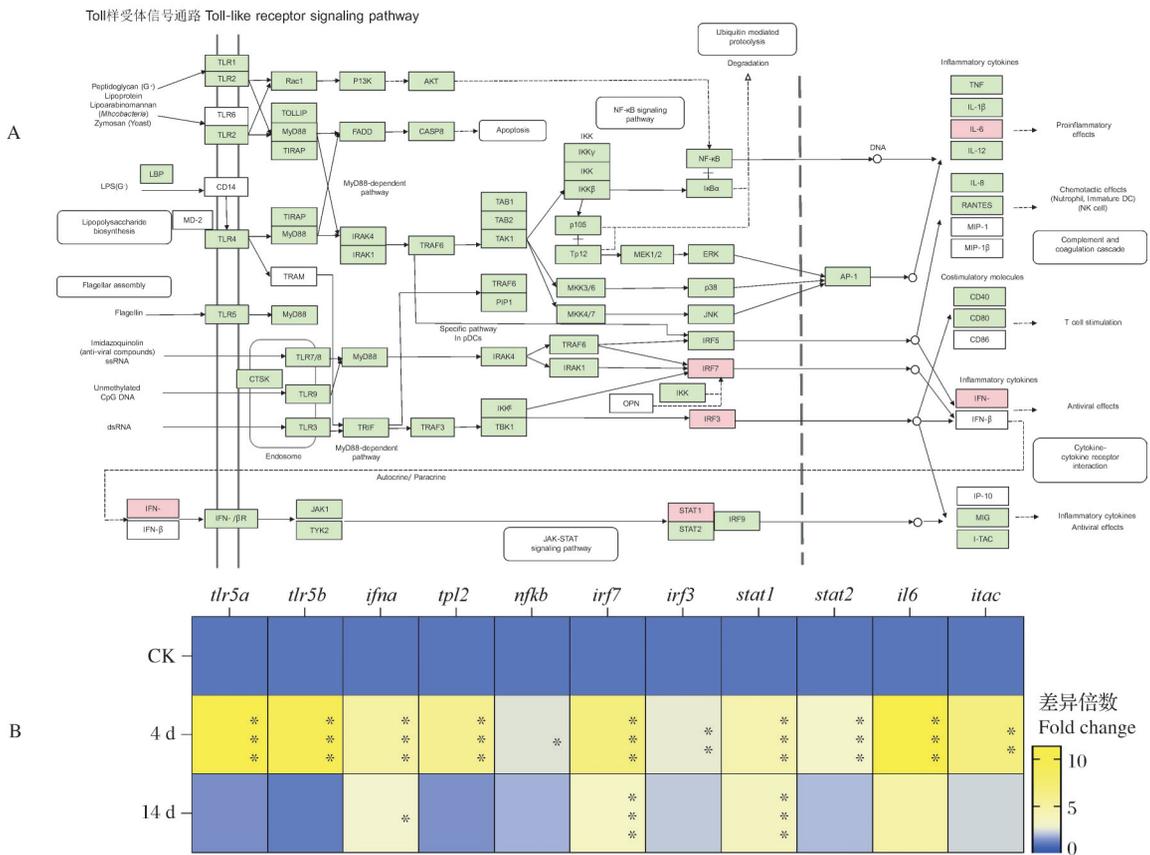
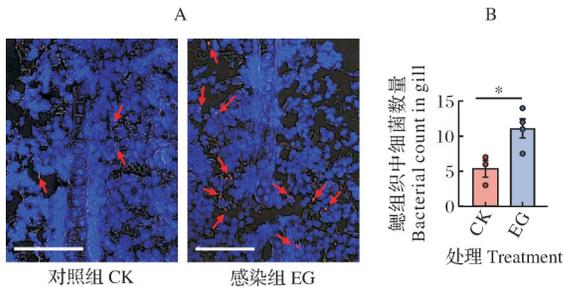


图5 感染后鳃组织中TLR信号通路(A)及差异性基因表达情况分析(B)

Fig.5 Analysis of TLR signaling pathway (A) and differential gene expression in gill after infection (B)



A: 斑马鱼鳃组织细菌原位杂交图, 图中红色荧光信号指示细菌
In situ hybridization of bacteria in zebrafish gill, with a red fluorescent signal indicating bacteria; B: 细菌数量 Bacterial content.

图6 SVCV感染后斑马鱼鳃部细菌移位情况

Fig.6 Bacterial translocation in zebrafish gills following SVCV infection

2.8 感染后鳃黏膜特征性差异标志物种的鉴定与分析

为了深入揭示 SVCV 感染过程中斑马鱼鳃部菌群的动态演变特征, 利用 LEfSe 分析鉴定出感染前(对照组)、感染后 4 d 和 14 d 的显著变化的菌群, 结果如图 8 所示。在属水平上, 感染后 4 d 显著富集条件致病菌螺旋杆菌属 (*Helicobacter*) 和副萨特氏菌属 (*Parasutterella*) 等有害菌属的标志菌群; 条件致病菌

暗单胞菌属 (*Pelomonas*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的相对丰度较对照组显著增加, 表明 SVCV 感染破坏了微生态屏障, 使得更多致病菌入侵。与之相反, 感染后 14 d 样本中检测到拟杆菌属 (*Bacteroides*)、粪杆菌属 (*Faecalibacterium*) 等有益菌群的重新定植, 其丰度和对照组并无差异(图 8C), 此外, 参与氮代谢的硝酸盐裂解菌科 (*Nitiliruptoraceae*) 和具有环境适应性的莱茵海默菌属 (*Rheinheimera*) 也呈现回升趋势, 反映在感染 14 d 后菌群群落功能的逐步恢复, 重新达到微生态平衡。

3 讨论

为了更直接地解析鳃黏膜及其共生菌群在抗 SVCV 感染中的作用, 本研究采用鳃局部接种法建立 SVCV 感染模型, 相较于浸泡感染和腹腔注射, 鳃部局部接种能更精准地靶向鳃组织, 从而增强对鳃黏膜特异性免疫应答^[20-21]。试验结果显示, 感染组斑马鱼表现出典型的病毒性症状, 包括体表点状出血、鳃丝发白等临床表现, 免疫荧光检测进一步证实病毒主要定植于鳃小片上皮细胞^[19]。感染后 4~7 d

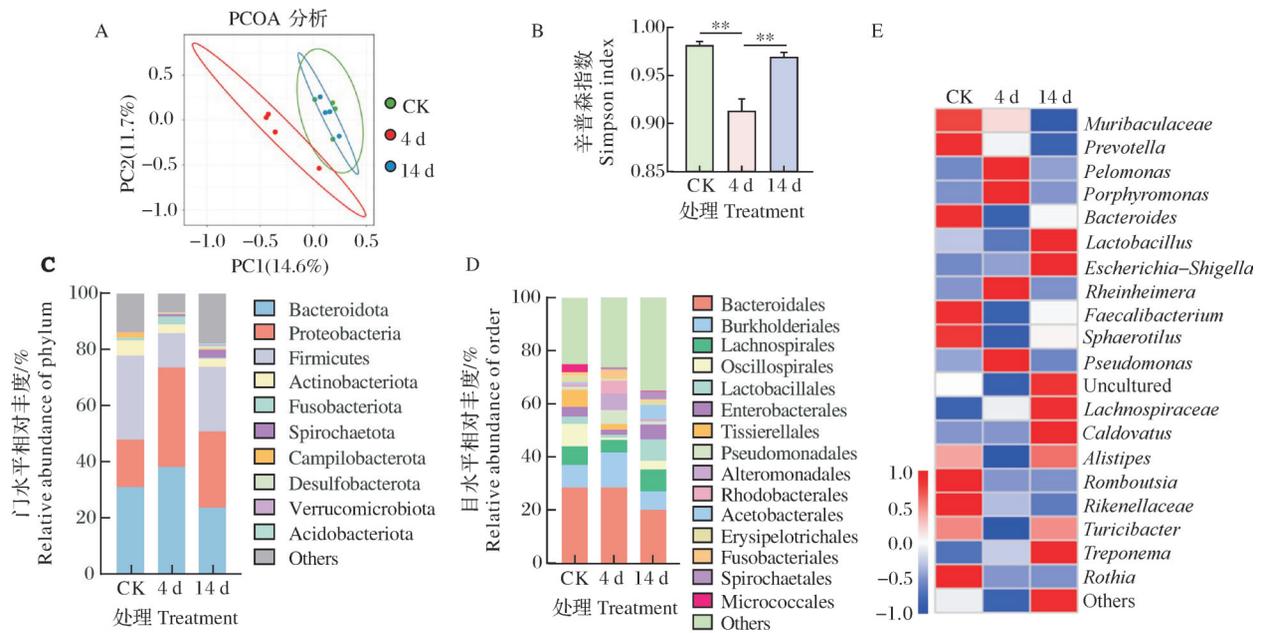


图 7 SVCV 感染后 4 d 和 14 d 的斑马鱼鳃组织中微生物主坐标分析(A)、辛普森指数(B)和门水平(C)、目水平(D)及属水平(E)的微生物组成变化

Fig.7 Microbial principal coordinate analysis (A), Simpson index (B), phylum level (C), order level (D) and genus level (E) changes in microbial composition in gill of zebrafish 4 and 14 days after SVCV infection

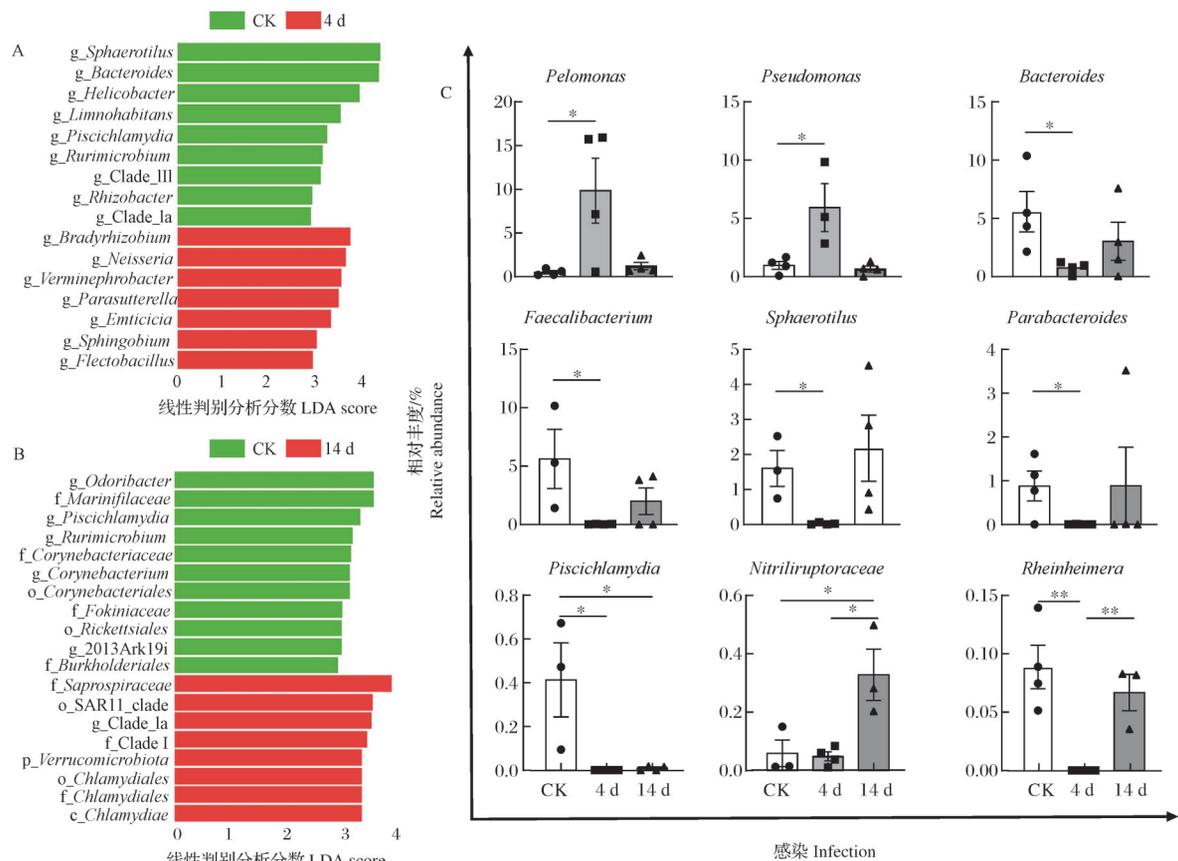


图 8 SVCV 感染后 4 d 和 14 d 斑马鱼鳃组织在属水平的特征性差异菌群(A,B)和标志性微生物相对丰度变化趋势(C)

Fig.8 Characteristic differences in gill of zebrafish at the genus taxonomic level (A, B) and relative abundance trends of landmark microorganisms at 4 and 14 days after SVCV infection (C)

为死亡高峰期,该时段病毒载量达到峰值,随后因宿主免疫应答的激活而逐渐下降。组织病理学研究表明 SVCV 感染可导致鳃小片呼吸上皮细胞空泡变性、大面积脱落,末端肿大弯曲,这些特征性病变与先前报道的病毒性鳃炎病理改变基本吻合^[22-23]。

作为低等脊椎动物的代表,鱼类免疫系统展现出独特的进化特征。与哺乳动物不同,鱼类缺乏结构化的淋巴器官(如淋巴结和扁桃体)^[24],其免疫防御主要依赖于弥散分布的黏膜相关淋巴组织。其中,鳃黏膜相关淋巴组织(GIALT)作为重要的免疫屏障,在结构上与哺乳动物呼吸道 I 型上皮相似^[25],由多种免疫细胞(包括 T/B 淋巴细胞、巨噬细胞、粒细胞和自然杀伤样细胞)和分泌型细胞(如黏液细胞和杯状细胞)共同构成^[26]。SVCV 感染斑马鱼后,鳃组织在感染后 4 d 时促炎因子(*il1 β* 、*tnfa*)和抗病毒效应分子(*il2*、*mxc*、*ifny*、*ita*)的表达水平显著上调,其中 *ifny* 通过诱导 *mxc* 表达发挥关键抗病毒作用,有效保护斑马鱼抵御 SVCV 感染^[27]。这种免疫应答模式反映鱼类先天免疫系统对病毒入侵的快速识别和响应机制,为后续适应性免疫的激活奠定基础^[28]。值得注意的是,抗菌相关基因(*thr5a*、*il17a*)的同步上调提示可能存在继发性细菌感染,特别是 *thr5a* 作为细菌鞭毛蛋白的特异性受体,其表达量上调反映了宿主在防御细菌感染过程中发挥重要作用^[6]。这些免疫分子的表达动态呈现出时序特征,在感染高峰期(感染后 4 d)达到峰值后逐渐回落,与病毒载量和病理损伤的变化趋势相一致。然而,趋化因子 *ccl20* 的表达模式却呈现相反趋势,其下调可能通过限制 CCR6⁺ Th17 细胞的募集来调控炎症反应强度。已有研究表明 *ccl20* 的基础表达水平与共生菌群的稳态密切相关^[29]。这也可能反映了病毒感染导致的黏膜菌群失调,这些结果共同揭示了鱼类鳃黏膜免疫系统在应对病原体入侵时能够协调多种免疫效应机制,包括炎症反应、抗病毒防御和抗菌保护等,从而形成多层次的防御体系。

在正常生理状态下,斑马鱼鳃黏膜表面维持着复杂的微生物生态平衡,与宿主免疫防御系统共同构筑抵御病原体入侵的多重屏障。然而,SVCV 感染显然破坏了这一平衡,转录组数据显示感染后期抗菌相关基因的激活,反映病毒感染伴随继发性细菌感染。通过荧光原位杂交技术,研究直观证实病毒感染可导致鳃黏膜细菌的异常定植和迁移。为深入探究菌群的结构变化,采用 16S rRNA 高通量测序

技术对感染不同阶段的鳃组织样本进行系统分析。 α 多样性(Simpson 指数)和 β 多样性(PCoA 分析)结果显示,感染高峰期(感染后 4 d)菌群物种丰富度和结构组成发生显著改变,表现为多样性指数明显降低和 PCoA 空间分布偏移,而恢复期(感染后 14 d)逐步向对照组趋近。进一步的分类学分析揭示,急性感染期条件致病菌(莱因海默菌属和假单胞菌属)相对丰度显著增加,而具有免疫调节功能的共生菌(普雷沃氏菌属和乳杆菌属)则明显减少。到恢复期时,具有益生潜能的菌群(如拟杆菌属、粪杆菌属及副拟杆菌属)重新定植并恢复至接近正常水平。这些发现共同表明 SVCV 感染初期通过破坏黏膜物理屏障和改变局部微环境,导致菌群结构失衡,增加继发感染风险;而随着宿主免疫系统的激活和病毒载量的下降,共生菌群逐步重建稳态^[31],这种动态变化过程反映了宿主-微生物互作系统应对病原体侵袭的适应性调节机制。

在本研究通过鳃局部接种病毒模型阐明了 SVCV 感染后斑马鱼的免疫应答特征以及鳃部的黏膜微生物变化。试验证实病毒可有效侵染鳃上皮细胞并引发典型病理改变,分子水平分析显示感染初期宿主迅速启动先天免疫应答,抗病毒基因和促炎因子显著上调;同时抗菌相关基因的激活暗示继发性细菌感染。免疫相关基因时序表达谱分析揭示感染进程呈现动态免疫调控特征,急性期以抗原呈递和信号转导为主,而恢复期则转向适应性免疫应答。TLR 信号通路关键分子的选择性激活表明鱼类通过模式识别受体精确调控抗病毒反应。16S rRNA 测序结果进一步显示病毒感染导致鳃黏膜菌群结构失衡,表现为益生菌减少而条件致病菌增殖;随着免疫系统的激活,微生物稳态逐步重建。这些发现共同揭示 SVCV 局部感染鳃后病毒、宿主和共生菌群三者间的复杂互作关系,可为深入理解鱼类黏膜免疫防御机制和共生菌群提供重要理论基础,为研发靶向鳃黏膜微环境的抗 SVCV 微生物制剂奠定基础。

参考文献 References

- [1] EVANS D H, PIERMARINI P M, CHOE K P. The multi-functional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste [J]. *Physiological reviews*, 2005, 85(1): 97-177.
- [2] HAUGARVOLL E, BJERKÅS I, NOWAK B F, et al. Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon [J]. *Journal of anatomy*,

- 2008, 213(2):202-209.
- [3] RESSÉGUIER J, DALUM A S, PASQUIER L D, et al. Lymphoid tissue in teleost gills: variations on a theme[J/OL]. *Biology*, 2020, 9(6): 127 [2025-04-14]. <https://doi.org/10.3390/biology9060127>.
- [4] GOMEZ D, SUNYER J O, SALINAS I. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2013, 35(6):1729-1739.
- [5] DALUM A S, KRAUS A, KHAN S, et al. High-resolution, 3D imaging of the zebrafish gill-associated lymphoid tissue (GIALT) reveals a novel lymphoid structure, the amphibranchial lymphoid tissue[J/OL]. *Frontiers in immunology*, 2021, 12: 769901 [2025-04-14]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.769901>.
- [6] RIERA ROMO M, PÉREZ-MARTÍNEZ D, CASTILLO FERRER C. Innate immunity in vertebrates: an overview [J]. *Immunology*, 2016, 148(2):125-139.
- [7] MOKHTAR D, ZACCONE G, ALESCI A, et al. Main components of fish immunity: an overview of the fish immune system[J/OL]. *Fishes*, 2023, 8(2): 93 [2025-04-14]. <https://doi.org/10.3390/fishes8020093>.
- [8] XU Z, TAKIZAWA F, PARRA D, et al. Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods[J/OL]. *Nature communications*, 2016, 7: 10728 [2025-04-14]. <https://doi.org/10.1038/ncomms10728>.
- [9] SMITH N C, RISE M L, CHRISTIAN S L. A comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish[J/OL]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 2292 [2025-04-14]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02292>.
- [10] RAJEEV R, ADITHYA K K, KIRAN G S, et al. Healthy microbiome: a key to successful and sustainable shrimp aquaculture[J]. *Reviews in aquaculture*, 2021, 13(1):238-258.
- [11] GÓMEZ G D, BALCAZÁR J L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish[J]. *FEMS immunology and medical microbiology*, 2008, 52(2):145-154.
- [12] KITANO H, ODA K. Robustness trade-offs and host-microbial symbiosis in the immune system[J/OL]. *Molecular systems biology*, 2006, 2: 2006.0022 [2025-04-14]. <https://doi.org/10.1038/msb4100039>.
- [13] HUANG Z Y, ZHAN M T, CHENG G F, et al. IHNV infection induces strong mucosal immunity and changes of microbiota in trout intestine[J/OL]. *Viruses*, 2022, 14(8): 1838 [2025-04-14]. <https://doi.org/10.3390/v14081838>.
- [14] ZHOU Z D, XU L P, QIU C Y, et al. Characterization of the gill microbiota in koi following carp edema virus infection [J/OL]. *Aquaculture*, 2025, 604: 742485 [2025-04-14]. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2025.742485>.
- [15] 张思佳, 于红. 大模型在水产养殖病害防治中的创新应用与展望[J]. *大连海洋大学学报*, 2024, 39(3): 369-382. ZHANG S J, YU H. Innovative applications and prospects of large models in disease prevention and control for aquaculture: a review [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2024, 39(3): 369-382 (in Chinese with English abstract).
- [16] ALBERTINI A A V, BAQUERO E, FERLIN A, et al. Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry [J]. *Viruses*, 2012, 4(1):117-139.
- [17] REGAN A D, WHITTAKER G R. Entry of rhabdoviruses into animal cells[J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2013, 790:167-177.
- [18] BELOT L, ALBERTINI A, GAUDIN Y. *Advances in virus research*[M]. San Diego: Academic Press, 2019:147-183.
- [19] ASHRAF U, LU Y A, LIN L, et al. Spring viraemia of carp virus: recent advances [J]. *Journal of general virology*, 2016, 97(5):1037-1051.
- [20] 张鹏奇. 鲤春病毒血症自组装纳米疫苗构建及其免疫效果研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2023. ZHANG P Q. Construction of self-assembled nano vaccine of carp spring viraemia virus and its immune effect [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2023 (in Chinese with English abstract).
- [21] VALENZUELA-MUÑOZ V, PEREIRO P, ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ M, et al. Comparative modulation of lncRNAs in wild-type and rag1-heterozygous mutant zebrafish exposed to immune challenge with spring viraemia of carp virus (SVCV) [J/OL]. *Scientific reports*, 2019, 9: 14174 [2025-04-14]. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50766-0>.
- [22] 刘舒亚. 一株鲤春病毒血症病毒的分离鉴定及其感染对鲤鱼鳃和肠道的损伤研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2023. LIU S Y. Isolation and identification of SVCV study on the damage of carp gills and intestine caused by its infection [D]. Ya'an; Sichuan Agricultural University, 2023 (in Chinese with English abstract).
- [23] OUYANG P, LI Q N, LIU S Y, et al. Histopathology and transcriptome profiling reveal features of immune responses in gills and intestine induced by Spring viremia of carp virus [J/OL]. *Fish & shellfish immunology*, 2024, 152: 109726 [2025-04-14]. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109726>.
- [24] YU Y Y, WANG Q C, HUANG Z Y, et al. Immunoglobulins, mucosal immunity and vaccination in teleost fish [J/OL]. *Frontiers in immunology*, 2020, 11: 567941 [2025-04-14]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.567941>.
- [25] CHIU C, OPENSHAW P J. Antiviral B cell and T cell immunity in the lungs [J]. *Nature immunology*, 2015, 16(1): 18-26.
- [26] MOKHTAR D M, ABDELHAFEZ E A. An overview of the structural and functional aspects of immune cells in teleosts [J]. *Histology and histopathology*, 2021, 36(4): 399-414.
- [27] LOPEZ-MUNOZ A, ROCA F J, MESEGUER J, et al. New insights into the evolution of IFNs: zebrafish group II IF-

- Ns induce a rapid and transient expression of *IFN*-dependent genes and display powerful antiviral activities[J]. *The journal of immunology*, 2009, 182(6):3440-3449.
- [28] ALTMANN S M, MELLON M T, JOHNSON M C, et al. Cloning and characterization of an *Mx* gene and its corresponding promoter from the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Developmental & comparative immunology*, 2004, 28(4):295-306.
- [29] COMERFORD I, BUNTING M, FENIX K, et al. An immune paradox: how can the same chemokine axis regulate both immune tolerance and activation?: CCR6/CCL20: a chemokine axis balancing immunological tolerance and inflammation in autoimmune disease[J]. *BioEssays*, 2010, 32(12):1067-1076.

Characteristics of response of mucosal immunity and commensal microbiota in zebrafish gill during localized infection with spring viremia of carp virus

HE Qiulu¹, HU Changbai², WU Zhengben², DU Jiayi², ZHAO Xuyang², ZHANG Yujun², BEI Congran², RUAN Guoliang¹, WANG Qian¹, YU Yongyao²

1. College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract A model of the localized infection with spring viremia of carp virus (SVCV) in zebrafish (*Danio rerio*) was established to deeply study the mechanisms of viral disease development and the protective functions of microbial communities in fish. The viral load, pathological alterations, and expression profiles of immune-related genes in gill at 1 day, 4 days, 7 days and 14 days post-infection were analyzed. The changes in the expression profiles of mucosal immune-related genes and surface microbiota in zebrafish gill during the acute infection (4 d) and recovery phase (14 d) were further investigated based on transcriptomic profiling and 16S rRNA sequencing. The results showed that the structure of gill lamellae was disrupted, with respiratory epithelium detachment and inflammatory cell infiltration after infection with SVCV. The expression level of antiviral genes (*ifn γ* , *mxc*) and proinflammatory cytokines (*tnf α* , *il1 β*) was significantly upregulated during the period of acute infection. Concurrent strong inflammatory response and disordered surface microbiota of gill was identified at 4 d, characterized by significantly increased abundance of opportunistic pathogens (e.g., *Pseudomonas* spp.) and their translocation into underlying tissues. The body simultaneously initiated immune responses against viral and bacterial infections in the mucous. Both the inflammatory response in gill and the structure of surface microbiota was restored after 14 days of infection. It is indicated that SVCV infection through gills can damage the structure of physical barrier in gill, disrupt the homeostasis of mucosal microbiota, and lead to secondary bacterial infections. Therefore, it is necessary to strengthen the prevention of the outbreaks of bacterial diseases in the case of viral infection.

Keywords spring viremia of carp virus (SVCV); zebrafish (*Danio rerio*); gill; mucosal immunity; commensal microbiota

(责任编辑:边书京)