DOI: 10.3969/j.issn.2095-9869.20250210001　　http://www.yykxjz.cn/

王洋, 单洪伟, 陈朝通, 王芳. 基于转录组解析水体高亚硝态氮导致凡纳对虾外骨骼软化机制. 渔业科学进展, 2026, 47(1): 24–36

WANG Y, SHAN H W, CHEN C T, WANG F. Analysis of the mechanism of exoskeleton softening induced by high nitrite concentration in water based on transcriptome sequencing in *Penaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2026, 47(1): 24–36

基于转录组解析水体高亚硝态氮导致凡纳对虾外骨骼软化机制*

王 洋　单洪伟①　陈朝通　王 芳

(海水养殖教育部重点实验室　中国海洋大学　山东　青岛　266003)

摘要　亚硝态氮对对虾具有较强毒性，是影响对虾生长、生存的主要环境胁迫因子之一。水体高亚硝态氮环境往往伴随着对虾外骨骼软化(软皮)的现象。为揭示水体亚硝态氮对凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)外骨骼影响的作用机制，本研究从 3 个亚硝态氮浓度为(4.35±1.07) mg/L 的凡纳对虾养殖池随机取硬壳虾(CH)为对照组，从另外 3 个亚硝态氮浓度为(21.05±0.84) mg/L 的对虾养殖池中取硬壳虾(NH)和软壳虾(NS)作为实验组，对肝胰腺组织进行转录组学以及生理指标测定分析。转录组学结果显示，NS 组几丁质降解途径关键基因的表达水平显著上调，而几丁质合成、矿物质吸收以及角质层蛋白合成途径中的关键基因的表达水平显著下调。生理指标结果显示，NS 组几丁质酶、β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性显著高于 NH 组和 CH 组($P<0.05$)。CH 组海藻糖酶活性显著高于 NS 组，Ca^{2+}-ATPase 的活性显著高于 NH 组($P<0.05$)。NH 组肝胰腺中 Ca^{2+}含量显著高于 NS 组和 CH 组($P<0.05$)。以上结果提示，水体中高浓度的亚硝态氮可能通过降低几丁质的含量、损伤角质层构象以及减少矿物质的沉积影响凡纳对虾的外骨骼硬度。本研究为进一步探究亚硝态氮对对虾外骨骼的影响提供了理论基础。

关键词　凡纳对虾；亚硝态氮；外骨骼；几丁质；矿物质

中图分类号　S917.4　**文献标识码**　A　**文章编号**　2095-9869(2026)01-0024-13

凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)具有生长迅速、环境适应能力强、饲料转化率高等特点，是世界上最重要的水产养殖物种之一(周静心等, 2024)。据统计，2022 年世界凡纳对虾养殖总产量超过 680 万 t (FAO, 2024)。凡纳对虾集约化养殖期间产生大量的残饵粪便，使水体含氮废物含量不断升高，其可在亚硝化细菌作用下转化为亚硝态氮(寇红岩等, 2014)。亚硝态氮作为养殖过程中重要的环境胁迫因子，制约着对虾养殖业的发展。研究发现，亚硝态氮的浓度随着养殖时间的增加而增加，在养殖中后期，水体中亚硝态氮浓度可达到 20 mg/L (Tacon *et al*, 2002)。水体中高浓度的亚硝态氮会影响对虾生长蜕皮、呼吸、免疫等多种生理功能，导致死亡率升高(肖威等, 2020)。

甲壳类动物坚硬的外骨骼对其生存至关重要，它支撑身体，抵抗机械负荷，并且可作为抵御外界不良环境的第一道屏障，抵御外界污染物以及病原体的攻击(Fabritius *et al*, 2011)。例如美国龙虾(*Homarus americanus*)和欧洲龙虾(*H. gammarus)*外骨骼受损更

* 山东省自然科学基金(ZR2022MC147)资助。王 洋，Email: wangyang9685@stu.ouc.edu.cn
① 通信作者：单洪伟，副教授，Email: shanhongwei@ouc.edu.cn
收稿日期: 2025-02-10, 收修改稿日期: 2025-03-20

容易引起细菌的入侵，导致死亡率上升(Davies *et al*, 2014)。外骨骼的硬度主要取决于其化学成分与组成。对虾外骨骼主要由几丁质多糖、角质层蛋白以及矿物质沉积物组成(Shaked *et al*, 2020)。对虾外骨骼中碳酸钙、几丁质、蛋白质的比例升高会增加其硬度，有助于保护其组织，为其提供支撑和保护(Weerathunga *et al*, 2023)。

对虾外骨骼的硬度受各种环境因素的影响，如环境污染物、水体 pH 和矿物质浓度(Oliver *et al*, 2004)。研究发现，微塑料会抑制凡纳对虾蜕皮过程中的钙循环，进而影响外骨骼的矿化，降低其硬度(Tong *et al*, 2024)；高浓度铅可能会阻碍蓝蟹(*Callinectes sapidus*)外骨骼结构中钙的沉积，影响其硬度(Han *et al*, 2017)。作为对虾养殖过程中主要的环境胁迫因子，水体中高亚硝态氮浓度会导致对虾外骨骼软化(软壳)现象的发生(Lemos *et al*, 2021; 石英, 2024)，而其中的作用机制尚不清晰。因此，本研究利用 RNA-Seq 技术对由高亚硝态氮引起的软壳对虾肝胰腺进行转录组学分析，并且测定肝胰腺中钙的储存和运输能力以及几丁质的合成与降解相关生理指标，以期揭示高亚硝态氮导致对虾外骨骼软化的作用机制，为凡纳对虾的健康养殖提供数据支撑。

1　材料与方法

1.1　样品采集

本实验的样品采集自山东省东营市黄河三角洲海洋科技有限公司工厂化养殖车间，凡纳对虾养殖池面积为 35 m^2，养殖密度为 470 尾/m^2，放养对虾初始体重为(1.68±0.62) g。每天在 01:00、05:00、09:00、13:00、17:00、21:00 共进行 6 次投喂，日投饵量为对虾体重的 8%~12%。

样品采集自同一批凡纳对虾 6 个养殖池，取样时间在养殖的第 35 天。选取 3 个亚硝态氮浓度为(4.35±1.07) mg/L 养殖池作为对照组，每个养殖池选取 20 尾对虾(CH)。另外随机选取 3 个亚硝态氮浓度为(21.05±0.84) mg/L 养殖池作为胁迫组，胁迫持续 10 d，每个养殖池选取 20 尾硬壳虾(NH)和 20 尾软壳虾(NS)，其中软壳虾处于蜕皮间期，其软壳由高亚硝态氮浓度所引起，如图 1 如示。取对虾肝胰腺，经液氮快速冷冻后放入–80 ℃超低温冰箱保存。每个养殖池 10 尾对虾的肝胰腺用于生理指标测定，10 尾对虾肝胰腺进行转录组测序。采样期间，对照组养殖池溶解氧(DO)为(7.92±0.97) mg/L，pH 为 7.50±0.26，对虾体重为(10.59±0.31) g。胁迫组养殖池溶解氧(DO)为(8.05±0.98) mg/L，pH 为 7.57±0.20，对虾体重为(10.17±0.55) g。两组水温维持在(28.5±1.0) ℃，盐度为 33.0±0.5。除亚硝态氮浓度外，两组养殖池其他理化指标无明显差异。胁迫组的养殖池软壳虾比例显著高于对照组，养殖池中经常发现对虾异常死亡现象，最后的存活率也显著低于对照组。

1.2　生理指标测定

每组称取 0.5 g 肝胰腺样品，按 1∶9 的比例(质

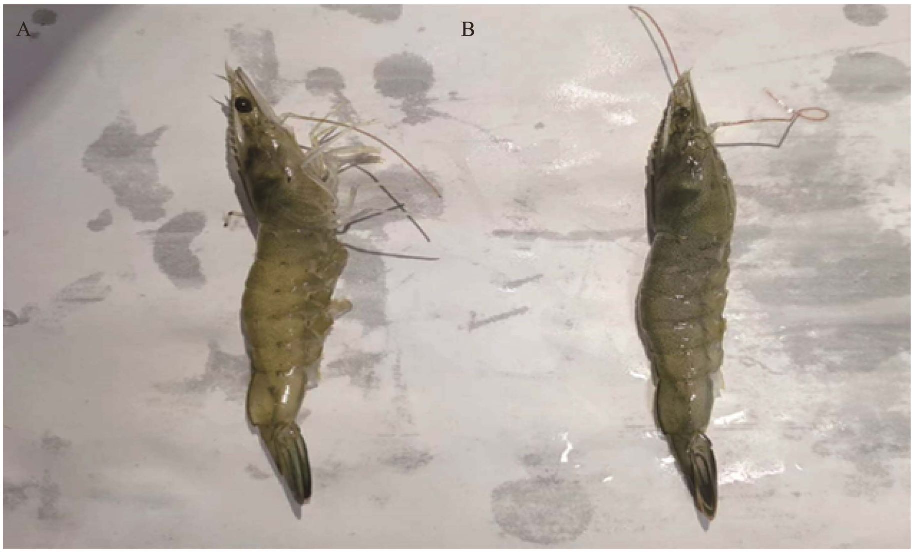

图 1　实验使用的对虾样品
Fig.1　The shrimp samples used in the experiment

A：硬壳虾；B：软壳虾。
A: Hard-shell shrimp; B: Soft-shell shrimp.

量体积比)加入 4.5 mL 预冷的生理盐水，冰上充分匀浆后离心 20 min (4 ℃，12 000 r/min)，取上清液用于各指标的测定。肝胰腺中几丁质酶(Chitinase)、β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)、海藻糖酶(THL)、Ca^{2+}-ATP 酶活性、Ca^{2+}含量以及总蛋白含量均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定，按照具体说明书进行操作。

1.3 RNA 提取及 Illumina 测序

使用 Trizol 试剂(Qiagen，德国)从肝胰腺中提取总 RNA。利用生物分析仪 5300 系统(Agilent，美国)对 RNA 完整性进行鉴定，然后分别通过 1%琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific，美国)检测 RNA 的纯度及其浓度。使用 TruSeq™链式 mRNA 样品制备试剂盒(Illumina，美国)构建 cDNA 文库，库检检验合格后，使用 NovaSeq X Plus 测序仪(Illumina，美国)完成高通量测序，并将原始数据上传至 NCBI (登录号：PRJNA1233453)。

1.4 质量控制与序列比对

使用 Fastq (https://github.com/OpenGene/fastp)对原始测序数据进行过滤，从而得到高质量的测序数据(clean data)，对质控后的数据进行质量评估。然后用 HiSat2 (Kim *et al*, 2015) (http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml)软件对质控后的原始数据与参考基因组进行比对。参考基因组版本：GCF_003789085.1；凡纳对虾参考基因组来源：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/10710?genome_assembly_id=422001。

1.5 基因差异表达分析以及功能富集

为了鉴定样本之间的差异表达基因(DEGs)，根据 TPM (the transcripts per million reads)计算每个基因的表达水平。使用 RSEM (Li *et al*, 2011) (http://deweylab.github.io/RSEM/)软件对基因的表达水平进行定量分析。使用 DESeq2 进行样本间基因的表达差异分析，筛选标准 FDR<0.05 且$|\log_2 FoldChange| \geq 1$。

此外，分别使用软件 Goatools (https://github.com/tanghaibao/GOatools)和 Python scipy 软件包(https://scipy.org/install/)进行 GO 功能以及 KEGG 通路富集分析。

1.6 实时荧光定量 PCR 验证

为了验证 RNA-Seq 的结果，随机选取 13 个基因进行实时荧光定量 PCR 分析。使用与测序结果相同的 RNA 样本，采用 HiScriptⅢ RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(诺唯赞，中国)试剂盒，按照说明书将 RNA 反转录为 cDNA。按照 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (High ROX Premixed)提供的试剂和操作方法，使用仪器 StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems)进行实时荧光定量 PCR，引物序列如表 1 所示。反应程序：95 ℃ 30 s；95 ℃ 10 s、56 ℃ 30 s，40 个循环。选取 *β-actin* 为内参基因，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算相对基因表达水平(Livak *et al*, 2001)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab.1 Real-time quantitative PCR primer sequences

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	长度 Length/bp	退火温度 T_m/℃
CYP	TGAGAGAGGGAGAGGGTTGT	GTGTAAGCGACGTTCGAGGA	293	60.0
ALP	CAGAAGGAAGGATGGGCGAG	ACCAGCAAGAAGAAGCCGTT	270	60.1
MR	CACCCAAGCTCCAGAAGAGG	GCCCTTCAGTGGAATCGGAA	263	60.0
CRT	CAGAAGCCAAGAAGCCCGA	GTCTGTGCTCTTGGTTTGGAT	224	59.8
GP	ACATTCTCCCAAGGCATCTCC	TTCACCACACTCTTCCACCAG	128	59.8
VLCAD	TGGTCAGCCTCTCCTCAACA	AGGTCCCGGTAGAAACGACT	255	60.3
sialin	GGACGAACGCACGCAATAAG	AACTGCGTCAGGAAGGGAAG	208	60.1
POLI	ACAGGCAGTTTTCAACGGAGA	TGACTGCCTGCCGTTAATCT	232	59.7
CHST1	AAGAAACTCCACGATAAGCGG	GGGAGCGTCTTACACTGACT	246	58.8
ATP1B	CGACTGGGTTCCTGATGTGT	ACTTTGCCCTGGTTTTCGTC	108	59.4
TS	AGCAGCATACCATTACATGAGC	ATCTTCTCCCTTCTTCATCCACA	175	58.9
TYMK	GCCTTTTCTGGTGTTGCCTT	CCACGAGTCATCCTTCAGCAA	222	59.8
GPAT3	TGGGTGACTGCCTGGACTA	AAGATGGTGAGCCGAACACT	154	59.5
β-actin	ACCACCGCTGCTTCCTCCTC	CGGATGTCCACGTCGCACTTC	188	64.0

1.7　数据分析

对不同样本的化学成分和酶活性进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Tukey 检验来鉴定数据显著性水平。分析之前，分别通过 Shapiro-Wilk test 和 Levene’s test 检验数据的正态性和方差齐性，所有分析均采用 SPSS 26.0 软件进行。P<0.05 表示存在显著性差异。

2　结果

2.1　转录组测序与组装

在 Illumina Novaseq 6000 平台进行测序共获得 404 803 278 个 raw reads，然后在去除低质量序列和接头后获得 400 197 920 个 clean reads，其中 CH 组、NS 组、NH 组分别平均获得 45 457 339、43 648 589、44 293 378 个 clean reads (表 2)。CH 组样品的 GC 含量范围为 48.29%~51.07%，Q20 大于 97.5%，Q30 大于 93%;NS 组样品的 GC 含量范围为 44.09%~46.69%，Q20 大于 97.2%，Q30 大于 92.4%；NH 组样品的 GC 含量范围为 46.55%~47.17%，Q20 大于 97.3，Q30 大于 92.6。此外，CH 组、NS 组、NH 组能够定位到基因组上的 clean reads 平均分别有 89.93% (65.2% unique mapped)、89.39% (72.50% unique mapped)、90.21% (67.10% unique mapped)。

表 2　测序数据的质量评估
Tab.2　Quality assessment of the sequencing data

Samples	Raw Reads	Clean Reads	GC/%	Q20/%	Q30/%	Total mapped	Unique mapped	Multiple mapped
CH1	49 799 274	49 209 006	51.07	97.69	93.47	44 106 122 (89.63%)	31 591 288 (64.20%)	12 514 834 (25.43%)
CH2	43 744 944	43 249 244	48.29	97.60	93.26	39 081 636 (90.36%)	28 876 471 (66.77%)	10 205 165 (23.60%)
CH3	44 422 806	43 913 768	49.89	97.55	93.10	39 435 295 (89.80%)	28 412 496 (64.70%)	11 022 799 (25.10%)
NS1	43 743 422	43 196 762	46.69	97.32	92.55	38 272 399 (88.60%)	31 026 053 (71.82%)	7 246 346 (16.78%)
NS2	47 939 902	47 320 686	44.09	97.26	92.41	42 586 745 (90.00%)	34 550 216 (73.01%)	8 036 529 (16.98%)
NS3	40 881 032	40 428 320	44.96	97.31	92.53	36 207 102 (89.56%)	29 383 304 (72.68%)	6 823 798 (16.88%)
NH1	45 062 430	44 607 110	46.55	97.47	92.82	39 843 753 (89.32%)	31 386 520 (70.36%)	8 457 233 (18.96%)
NH2	45 539 842	45 002 846	47.17	97.36	92.66	40 488 100 (89.97%)	30 470 742 (67.71%)	10 017 358 (22.26%)
NH3	43 669 626	43 270 178	46.94	97.60	93.05	39 528 678 (91.35%)	27 354 868 (63.22%)	12 173 810 (28.13%)

2.2　基因的功能注释

将获得的基因与各数据库(NR、Swiss-Prot、Pfam、EggNOG、GO 和 KEGG)进行比对，结果见表 3。基因在 NR 数据库注释较多(92.83%)，其次是 EggNOG 数据库(58.58%)、Pfam 数据库(57.39%)、Swiss-Prot 数据库(53.82%)、GO 数据库(52.49%)、KEGG 数据库(43.22%)。总体而言，30 746 个基因中有 28 878 个(占总数 93.92%)至少在 1 个数据库进行了注释。

表 3　基因注释成功率
Tab.3　Success rate of gene annotation

数据库名称 DB name	注释基因数 Number of unigenes	比例 Percentage/%
GO	16 138	52.49
KEGG	13 287	43.22
EggNOG	18 011	58.58
NR	28 849	93.83
Swiss-Prot	16 547	53.82
Pfam	17 644	57.39
Total annotation	28 878	93.92
Total unigenes	30 746	100

2.3　差异表达基因分析

利用 DESeq2 软件进行差异基因的鉴别筛选，筛

选标准为|$\log_{2F}$oldChange)|>1 和 FDR<0.05。不同组凡纳对虾样品共发现 3 284 个 DEGs (图 2A)，其中，NS *vs* CH 组的 DEGs 数量最多，为 2 924 个，其中上调基因为 1 375 个，下调基因为 1 549 个(图 2C)；NH *vs* CH 组 DEGs 的数量最少，为 479 个，其中上调基因为 313 个，下调基因为 166 个(图 2D)；NS *vs* NH 组 DEGs 数量为 837 个，上调基因 588 个，下调基因 249 个(图 2B)。

2.4　差异基因的 GO 功能分类和 KEGG 富集分析

根据 GO 富集分析结果显示，NS *vs* NH 组差异表达基因在 40 个功能分类显著富集，在分子功能类别中富集程度依次是 FAD 结合通路(GO: 0071949)、铁离子结合(GO: 005506)、氧化还原酶活性(GO: 0016491)；而在细胞组分类别中差异表达基因在过氧化物酶体(GO: 0005777)显著富集；在生物过程类别中，差异表达基因在羧酸生物合成过程(GO: 0046394)，有机酸生物合成过程(GO: 0016053)、脂肪酸代谢过程(GO: 0006631)出现显著富集(图 3A)。

在 NS *vs* CH 组，差异表达基因在 45 个 GO 功能分类显著富集，与分子功能相关的差异表达基因主要参与水解酶，水解 O-糖基化化合物(GO: 0004553)，其次是水解酶，作用于糖基键(GO: 0016798)、氧化还原酶活性(GO: 0016491)；而在细胞组分类别富集程度

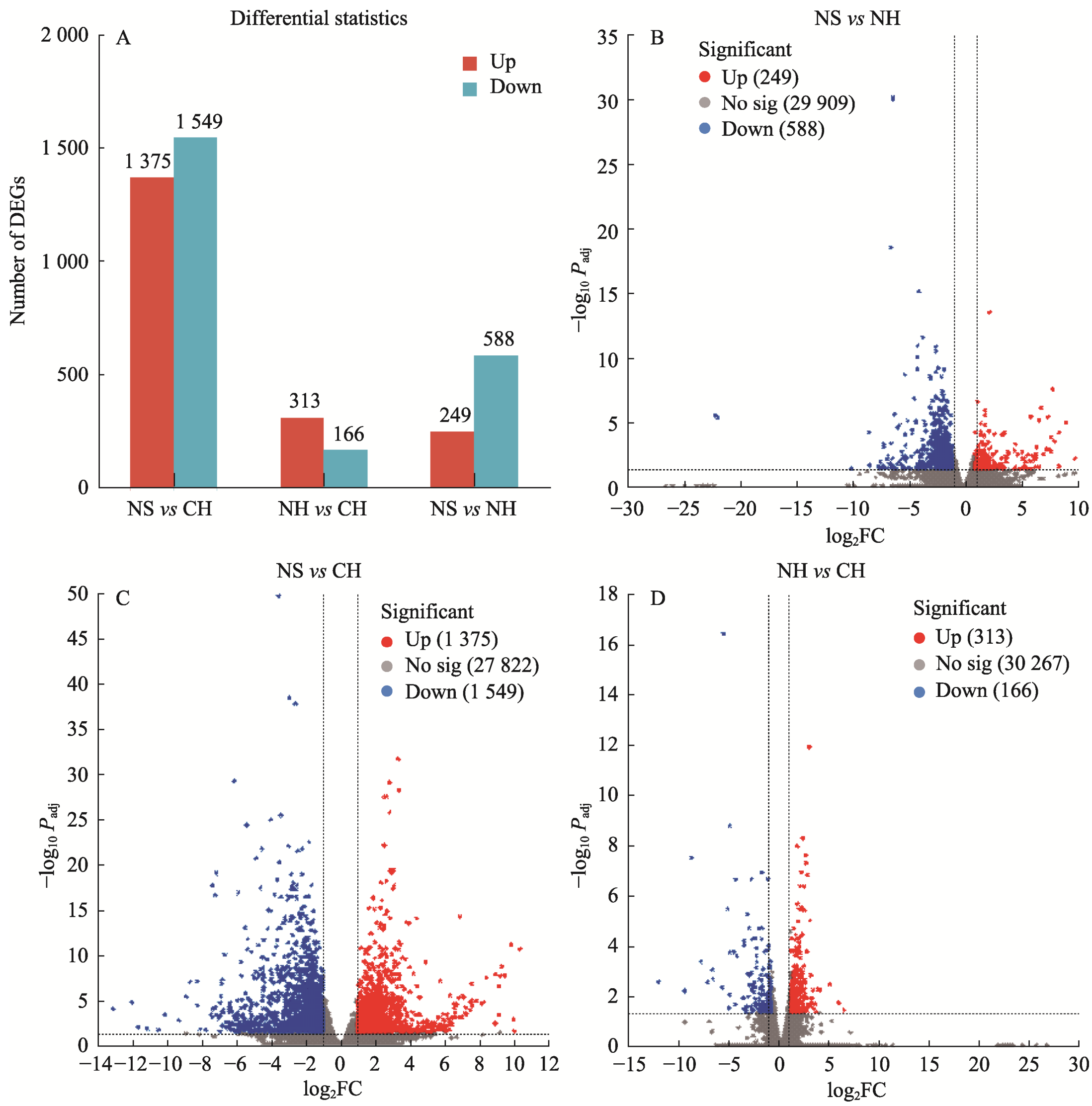

图 2　差异表达基因火山图

Fig.2　Volcano map of DEGs

A：差异表达基因数量；B：NS *vs* NH；C：NS *vs* CH；D：NH *vs* CH。

A: Number of differentially expressed genes; B: NS *vs* NH; C: NS *vs* CH; D: NH *vs* CH.

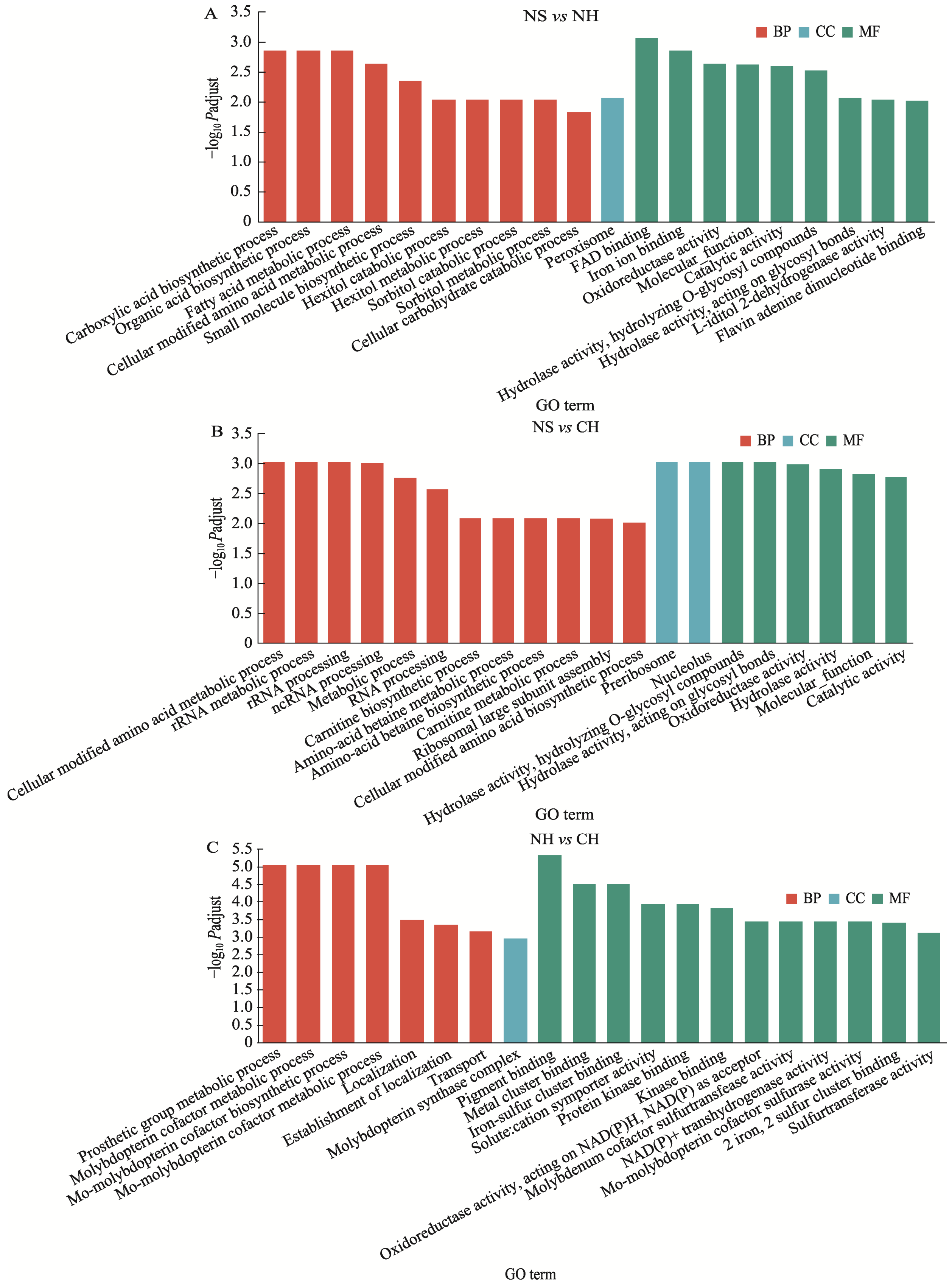

图 3　差异表达基因的 GO 功能富集分析

Fig.3　GO functional enrichment analysis of DEGs

A: NS *vs* NH; B: NS *vs* CH; C: NH *vs* CH.

最高的为前核糖体(GO: 0030684)，其次是核仁(GO: 0005730)；在生物过程类别，差异表达基因则在细胞修饰的氨基酸代谢过程(GO: 0006575)、rRNA 代谢过程(GO: 0016072)、rRNA 加工过程(GO: 0006364)通路显著富集(图 3B)。

而在 NH *vs* CH 组，差异表达基因仅在 7 个 GO 功能分类出现显著富集。在分子功能类别，显著富集的通路色素结合(GO: 0031409)、金属簇结合(GO: 0051540)；在生物过程类别，富集程度较高的为辅基代谢过程(GO: 0051189)、钼辅因子代谢过程(GO: 0043545) (图 3C)。

根据 KEGG 富集结果显示(图 4)，NS *vs* NH 组中下调的差异表达基因在视黄醇代谢(ko00830)、细胞色素 P450 对外源物质代谢(ko00980)通路显著富集。NS *vs* CH 组中下调最显著的通路亦是细胞色素 P450 对外源物质代谢通路(ko00980)，而且在戊糖葡萄糖醛酸转换通路(ko00040)、胰腺分泌通路(ko04972)、视黄醇代谢通路(ko00830)亦显著富集。NH *vs* CH 组中，醛固酮调节钠再吸收通路(ko04960)、孕酮介导的卵母细胞成熟通路(ko04914)显著富集。此外，在 NS *vs* NH 组和 NS *vs* CH 组中 PPAR 信号通路(ko03320)、脂肪酸降解通路(ko00071)均出现显著富集。

为了进一步了解亚硝态氮软化外骨骼的机制，对差异表达基因进行分类和分析(表 4)，结果显示，与几丁质水解相关的基因在 NS 组较其他两组出现显著上升，如内切几丁质酶、中性 α-糖苷酶等，而与几丁质合成相关的基因则在 NS 出现显著下调，如葡萄糖-6-磷酸异构酶(G6PI)、UDP-N-乙酰葡糖胺焦磷酸化酶等。此外，与其他两组相比，与矿物质吸收与转运相关基因的表达在 NS 组亦出现不同程度的下调。

2.5 高亚硝态氮胁迫对外骨骼硬度理化指标的影响

NO_2^--N 胁迫对凡纳对虾外骨骼硬度相关理化指标的影响见图 5。NS 组和 NH 组几丁质酶活性均显著高于 CH 组，且 NS 组显著高于 NH 组($P<0.05$)；而且 NS 组 NAG 活性显著高于 NH 组和 CH 组($P<0.05$)。而对于 THL 的活性，NH 组显著高于 NS 组($P<0.05$)。CH 组 Ca^{2+}-ATPase 的活性最高，且显著高于 NH 组($P<0.05$)。肝胰腺中钙离子含量 NH 组显著高于 NS 组和 CH 组($P<0.05$)。

2.6 通过实时荧光定量 PCR 验证转录组学数据

为了进一步验证转录组数据，选取 13 个差异表达基因进行实时荧光定量 PCR 测定，结果显示与 RNA-seq 有相似的表达趋势(图 6)。

3 讨论

对虾坚硬的外骨骼由角质层组成，而角质层中主要成分为几丁质。几丁质是一种结构性多糖，由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖单体通过 β-1,4-糖苷键连接形成(Gao *et al*, 2017)。几丁质的合成途径受到一系列酶的调控，包括 THL、己糖激酶(HK)、G6PI、UDP-N-乙酰氨基葡萄糖焦磷酸化酶和几丁质合成酶等(Zhang *et al*, 2022)。本研究中，NS 组 THL 活性显著低于 NH 组和 CH 组，且转录组学结果显示，高浓度亚硝态氮显著抑制了葡萄糖-6-磷酸异构酶、海藻糖转运蛋白、UDP-N-乙酰氨基葡萄糖焦磷酸化酶、谷氨酰胺合成酶等与几丁质合成相关的关键基因的表达水平，这表明高浓度亚硝态氮会抑制对虾几丁质合成过程。研究发现，几丁质合成相关基因的下调可能会导致外骨骼中几丁质含量的降低(Tong *et al*, 2024)，这与本文研究结果一致。除此之外，本研究发现，在 NS 组几丁质降解关键酶(几丁质酶、β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶)活性显著高于 NH 组和 CH 组，而且转录组结果显示 NS 组中与几丁质降解相关的基因表达水平(几丁质内切酶、壳三糖酶、中性 α-葡萄糖苷酶)显著上升，此外，根据 GO 富集分析结果显示，在亚硝态氮胁迫下，NS 组 O-糖基化合物水解酶活性(GO: 0004553)、糖基键水解酶活性(GO: 0016798)相关基因的表达发生上调，这可能会进一步导致角质层几丁质含量的下降。

角质层还会形成几丁质–蛋白质复合物，外骨骼通过在这种复合物中沉积和钙化矿物质来促进硬化，因此，角质层蛋白的含量可一定程度影响外骨骼的硬度(Inoue *et al*, 2003; Nagasawa *et al*, 2011)。角质层蛋白质是由经典分泌途径产生，这些途径的基因表达的改变，可能会影响几丁质与蛋白质的结合(Soares *et al*, 2013)。在本研究中，GO 富集分析显示，NS 组与 CH 组相比差异表达基因在前核糖体(GO: 0030684)，核仁(GO: 0005730)、细胞修饰的氨基酸代谢过程(GO: 0006575)、rRNA 代谢过程(GO: 0016072)、rRNA 加工过程(GO: 0006364)显著富集，例如与角质层形成相关的蛋白质二硫键异构酶(PDI)出现显著下调，这可能会导致角质层发育不全。有研究发现，通过 RNA 干扰降低 PDI 的表达可导致长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)的角质层出现损伤(Li *et al*, 2017)。此外，转录组结果显示相关的下调基因，包括长醇二磷酸寡糖蛋白糖基转移酶(RPN)、翻译起始因子 2 (EIF2)这可能会导致角质层杂乱无章(Lechner *et al*, 2014)。

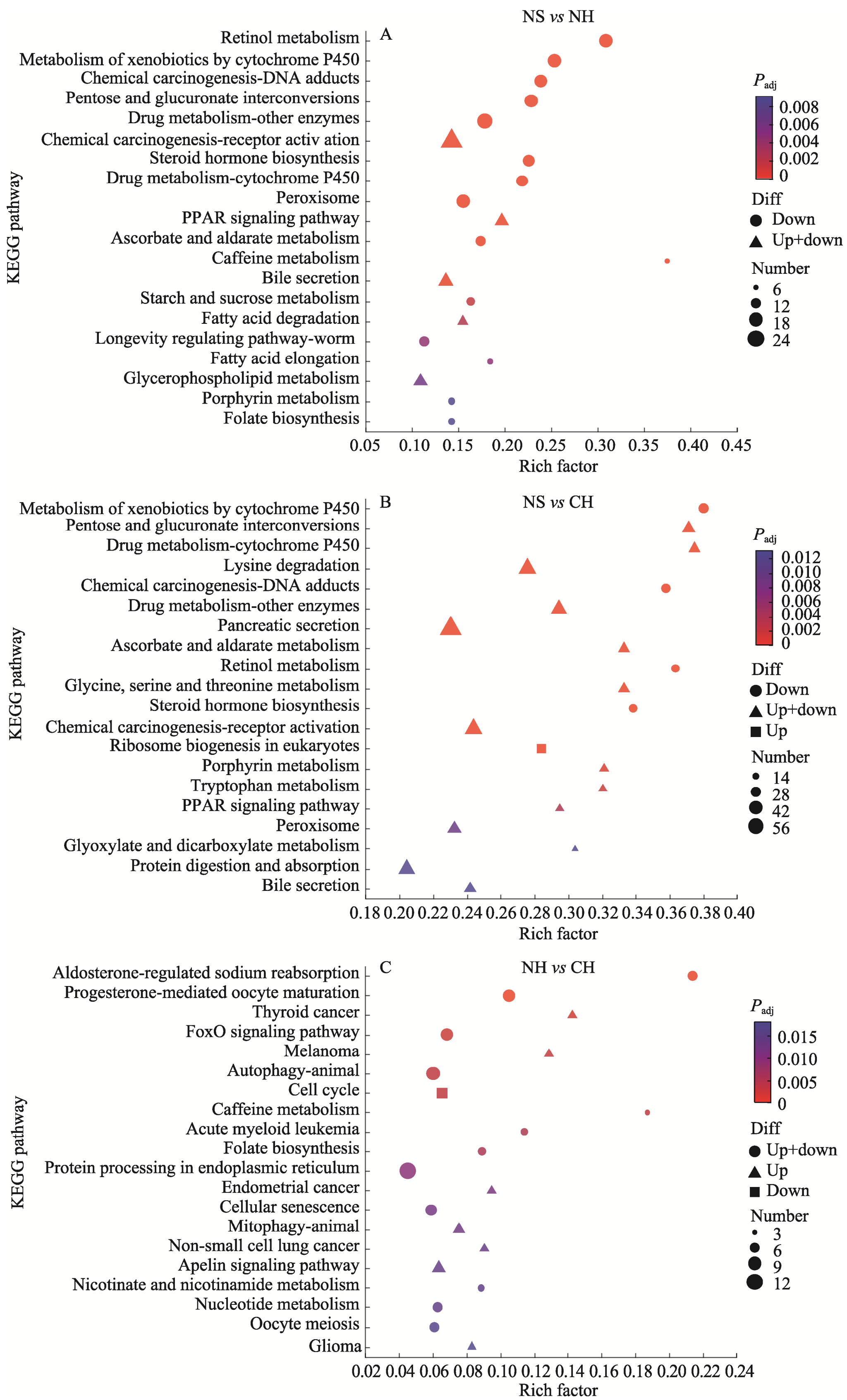

图 4　差异表达基因的 KEGG 功能富集分析

Fig.4　KEGG pathway enrichment analysis of DEGs

A: NS *vs* NH; B: NS *vs* CH; C: NH *vs* CH.

表 4 与外骨骼硬度相关的差异表达基因的分析比较

Tab.4 Analysis of DEGs related to the hardness of exoskeletons

基因 Genes	NS *vs* NH	NS *vs* CH	NH *vs* CH
几丁质合成与降解			
内切几丁质酶 Endochitinase	Up	–	–
壳三糖苷酶 Chitotriosidase	Up	–	–
中性 α-糖苷酶 Neutral alpha-glucosidase	Up	–	–
葡萄糖-6-磷酸酶 Glucose-6-phosphate isomerase	Down	–	–
海藻糖转运蛋白 Facilitated trehalose transporter Tret1	Down	Down	–
磷酸-N-乙酰氨基葡萄糖磷酸转移酶 UDP-N-acetylglucosamine phosphotransferase	Down	Down	–
谷氨酰胺合成酶 Glutamine synthetase	Down	–	–
矿物质吸收与转运			
钙网蛋白 Calreticulin	Down	–	–
溶质载体家族 Solute carrier family	Down	Down	–
钙整合素结合蛋白 Calcium and integrin binding protein	Down	Down	Up
高亲和力铜摄取蛋白 High affinity copper uptake protein	Down	Down	–
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	Down	Down	–
钠依赖性磷酸转运蛋白 Sodium-dependent phosphate transport protein	–	–	Up
钠/钾离子转运 ATP 酶 Sodium/potassium-transporting ATPase	Down	–	Down
铁蛋白 Ferritin	Down	Down	–

注：Up：上调；Down：下调；–：无显著差异。

Note: Up: Up-regulated; Down: Down-regulated; –: No significant difference.

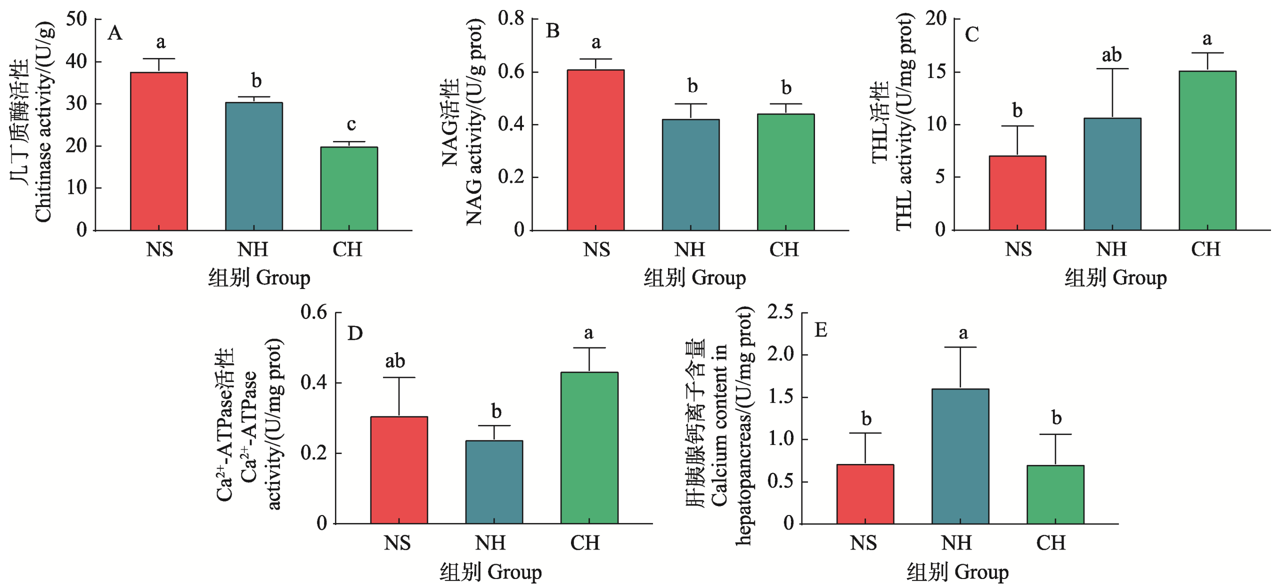

图 5 亚硝态氮胁迫对凡纳对虾外骨骼相关生理指标的影响

Fig.5 The effects of nitrite stress on exoskeleton-related physiological indices in the *Penaeus vannamei*

不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

There was significant difference between means with different letters ($P<0.05$).

沉积在几丁质纤维网络的矿物质同样会影响甲壳类外骨骼的硬度(Moore *et al*, 1980; Wang *et al*, 2021)。研究表明，矿物质吸收的减少会干扰角质层的钙化，导致柔软外骨骼的产生(Kim *et al*, 2023)。在本研究中，转录组学结果显示，NS 组中与矿物质吸收相关的基因(钙整合素结合蛋白、高亲和力铜摄取蛋白、铁蛋白等)呈显著下调，表明亚硝态氮胁迫降低了对虾机体对矿物质的吸收。同时，碳酸钙作为甲

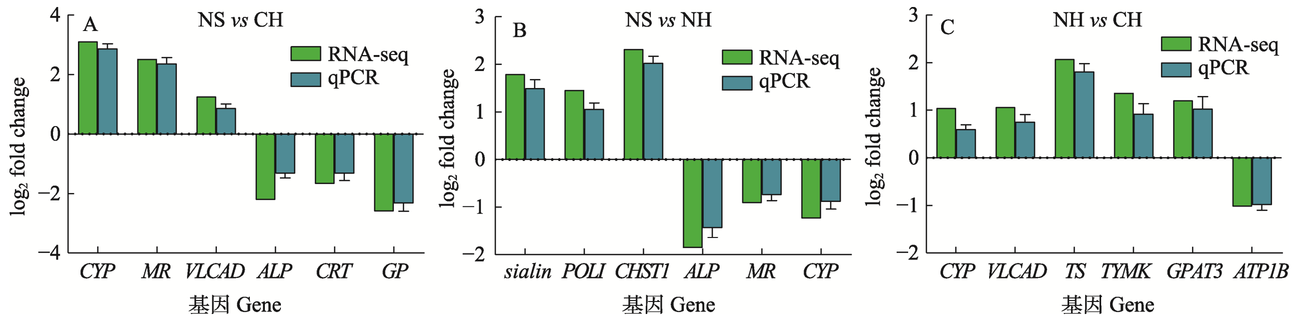

图 6　qRT-PCR 验证基因表达量
Fig.6　qRT-PCR validation of gene expression levels

A: NS *vs* NH; B: NS *vs* CH; C: NH *vs* CH.

壳类外骨骼生物矿物质的主要成分，可能会直接沉积完成外骨骼的形成(都婷婷等, 2023)。NS 组肝胰腺中钙离子含量显著低于 NH 组，表明高亚硝态氮浓度会影响对虾外骨骼角质层钙化过程中矿物质的沉积。此外，钙网蛋白是内质网主要的钙结合蛋白之一，结合钙的能力强，在甲壳动物体内钙离子储存中扮演着重要角色(郑丽明等, 2012; Hsieh *et al*, 2021)。而在本研究中，亚硝态氮胁迫下 NS 组钙网蛋白的基因出现显著下调，表明亚硝态氮胁迫会影响钙离子在体内的储存，进而影响外骨骼的硬化。对虾外骨骼的硬化是一个耗能的过程，涉及细胞增殖、分化、矿物质吸收等过程，因此需要足够的能量来完成外骨骼的合成和硬化(Wei *et al*, 2009; Lemos *et al*, 2021)。在本研究中，KEGG 富集分析结果显示，NS 组与其他两组相比差异表达基因在 PPAR 信号通路(ko03320)、脂肪酸降解通路(ko00071)均出现显著富集，表明高亚硝酸氮浓度可能会抑制对虾脂类代谢供能，从而导致对虾没有额外的能量来进行外骨骼硬化过程。

对虾体内钙主要储存在肝胰腺和血淋巴中，钙会在蜕皮后释放以加速外骨骼的硬化(Wilder *et al*, 2009; Xu *et al*, 2016)。雌二醇 17β-脱氢酶(17E2DH)可能会参与肝胰腺中钙离子的释放，影响外骨骼的硬化过程，转录组结果显示 NH 组雌二醇 17E2DH 的表达量显著高于 NS 组和 CH 组。有研究发现，RNA 干扰拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*) 17E2DH 的表达会显著降低其甲壳的硬度(Fu *et al*, 2022)。在本研究中，NH 组肝胰腺钙离子含量显著高于 NS 组和 CH 组。这可能是同处于高亚硝态氮的养殖池出现硬壳虾的原因。

4　结论

亚硝态氮作为对虾养殖过程中重要的环境胁迫因子，水体中高浓度亚硝态氮常常会导致对虾外骨骼软化现象的出现。本研究通过 RNA-seq 技术对高亚硝态氮胁迫引起软壳的凡纳对虾肝胰腺进行转录组测序，结果表明亚硝态氮主要通过降低几丁质含量、损伤角质层构象、抑制矿物质的沉积来降低对虾外骨骼的硬度。这为进一步探究亚硝态氮对外骨骼的影响以及亚硝态氮耐受的分子机制提供了理论基础。

参　考　文　献

都婷婷, 丁丽, 潘玺方, 等. 水体外源钙补充对罗氏沼虾蜕皮周期的影响. 农业生物技术学报, 2023, 31(12): 2568–2579 [DU T T, DING L, PAN X F, *et al*. Effects of exogenous calcium supplementation in water on molting cycle of *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Agricultural Biotechnology, 2023, 31(12): 2568–2579]

寇红岩, 冼健安, 郭慧, 等. 亚硝酸盐对虾类毒性影响的研究进展. 海洋科学, 2014, 38(2): 107–115 [KOU H Y, XIAN J A, GUO H, *et al*. Research progress of toxic effects of nitrite on shrimp. Marine Sciences, 2014, 38(2): 107–115]

石英. 亚硝酸盐急性胁迫对凡纳滨对虾免疫功能及鳃 Na^+/K^+-ATP 酶活性的影响. 饲料研究, 2024, 47(17): 55–60 [SHI Y. Effects of acute nitrite stress on immunity function and gill Na^+/K^+-ATPase activity in *Litopenaeus vannamei*. Feed Research, 2024, 47(17): 55–60]

肖威, 单洪伟, 马甡, 等. 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分和糖代谢的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 74–81 [XIAO W, SHAN H W, MA S, *et al*. Effects of chronic nitrite stress on body composition and glucose metabolism of *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 74–81]

郑丽明, 周发林, 杨其彬, 等. 斑节对虾钙网蛋白基因 cDNA 克隆和表达分析. 上海海洋大学学报, 2012, 21(2): 183–189 [ZHENG L M, ZHOU F L, YANG Q B, *et al*. Molecular cloning and expression analysis of calreticulin from *Penaeus monodon*. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(2): 183–189]

周静心, 孟宪红, 傅强, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变对

凡纳对虾不同家系幼体发育及仔虾抗逆性状的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(6): 144–154 [ZHOU J X, MENG X H, FU Q, *et al*. Effect of atmospheric and room-temperature plasma mutagenesis on the larval development of *Penaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(6): 144–154]

DAVIES C E, WHITTEN M M A, KIM A, *et al*. A comparison of the structure of American (*Homarus americanus*) and European (*Homarus gammarus*) lobster cuticle with particular reference to shell disease susceptibility. Journal of Invertebrate Pathology, 2014, 117: 33–41

FABRITIUS H, SACHS C, RAABE D, *et al*. Chitin in the exoskeletons of arthropoda: From ancient design to novel materials science. Springer, Dordrecht, 2011, 35–60

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in action. Rome, 2024

FU Y Y, LIU X, LIU L, *et al*. Identification and functional analysis of the estradiol 17β-dehydrogenase gene on the shell hardness of *Scylla paramamosain* during the molting cycle. Aquaculture, 2022, 553: 738113

GAO Y , WEI J , YUAN J, *et al*. Transcriptome analysis on the exoskeleton formation in early developmental stages and reconstruction scenario in growth-moulting in *Litopenaeus vannamei*. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1098

HAN S, WANG B, WANG M, *et al*. Effects of ammonia and nitrite accumulation on the survival and growth performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Invertebrate Survival Journal, 2017, 14: 221–232

HSIEH S L, WU Y C, XU R Q, *et al*. Effect of polyethylene microplastics on oxidative stress and histopathology damages in *Litopenaeus vannamei*. Environmental Pollution, 2021, 288: 117800

INOUE H, OHIRA T, OZAKI N, *et al*. Cloning and expression of a cDNA encoding a matrix peptide associated with calcification in the exoskeleton of the crayfish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 136(4): 755–765

KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. Nature Methods, 2015, 12(4): 357–360

KIM L, KIM S A, AN Y J. Microfibers from cigarette butts can induce exoskeletal alteration in whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*). Marine Pollution Bulletin, 2023, 197: 115734

LECHNER A, KECKEIS H, LUMESBERGER-LOISL F, *et al*. The Danube so colourful: A potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe’s second largest river. Environmental Pollution, 2014, 188: 177–181

LEMOS D, WEISSMAN D. Moulting in the grow-out of farmed shrimp: A review. Reviews in Aquaculture, 2021, 13(1): 5–17

LI B, DEWEY C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 323

LI H P, AL-JAPAIRAI K, TAO Y, *et al*. RPN2 promotes colorectal cancer cell proliferation through modulating the glycosylation status of EGFR. Oncotarget, 2017, 8(42): 72633–72651

LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 2001, 25(4): 402–408

MOORE G K, ROBERTS G A F. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. International Journal of Biological Macromolecules, 1980, 2(2): 115–116

NAGASAWA H. Structure and function of matrix proteins and peptides in the biomineral formation in crustaceans. Progress in Molecular and Subcellular Biology, 2011, 52: 315–329

OLIVER W C, PHARR G M. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. Journal of Materials Research, 2004, 19(1): 3–20

SHAKED S A, ABEHSERA S, LEVY T, *et al*. From sporadic single genes to a broader transcriptomic approach: Insights into the formation of the biomineralized exoskeleton in decapod crustaceans. Journal of Structural Biology, 2020, 212(2): 107612

SOARES M P M, BARCHUK A R, SIMÕES A C Q, *et al*. Genes involved in thoracic exoskeleton formation during the pupal-to-adult molt in a social insect model, *Apis mellifera*. BMC Genomics, 2013, 14: 576

TACON A G J, CODY J J, CONQUEST L D, *et al*. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. Aquaculture Nutrition, 2002, 8(2): 121–137

TONG D F, YU Y Y, LU L Z, *et al*. Microplastics weaken the exoskeletal mechanical properties of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Hazardous Materials, 2024, 468: 133771

WANG Z L, FAN L F, WANG J, *et al*. Insight into the immune and microbial response of the white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* to microplastics. Marine Environmental Research, 2021, 169: 105377

WEERATHUNGA V, HUNG C C, DUPONT S, *et al*. Ocean acidification increases inorganic carbon over organic carbon in shrimp’s exoskeleton. Marine Pollution Bulletin, 2023, 192: 115050

WEI L Z, ZHANG X M, HUANG G Q, *et al*. Effects of limited dissolved oxygen supply on the growth and energy allocation of juvenile Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Journal of the World Aquaculture Society, 2009, 40(4): 483–492

WILDER M N, DO THI THANH HUONG, JASMANI S, *et al*. Hemolymph osmolality, ion concentrations and calcium in the structural organization of the cuticle of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Changes with the molt cycle. Aquaculture, 2009, 292(1/2): 104–110

XU B P, LONG C, DONG W R, *et al*. Molecular characterization of calreticulin gene in mud crab *Scylla paramamosain* (Estampador): Implications for the regulation of calcium homeostasis during moult cycle. Aquaculture Research, 2016, 47(10): 3276–3286

ZHANG W X, TANG Y, HAN Y, *et al*. Immunotoxicity of pentachlorophenol to a marine bivalve species and potential toxification mechanisms underpinning. Journal of Hazardous Materials, 2022, 439: 129681

(编辑　冯小花)

Analysis of the Mechanism of Exoskeleton Softening Induced by High Nitrite Concentration in Water Based on Transcriptome Sequencing in *Penaeus vannamei*

WANG Yang, SHAN Hongwei[①], CHEN Chaotong, WANG Fang

(*Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao* 266003, *China*)

Abstract Nitrite is strongly toxic to shrimp, and is one of the main environmental stress factors affecting the growth and survival of shrimp. High nitrite levels in aquaculture systems are often associated with the phenomenon of shrimp exoskeleton softening (soft-shell), and the mechanism underlying this must be further studied. In order to reveal the mechanism of nitrite resulting in the exoskeleton softening of *Penaeus vannamei*, this study chosen shrimp from three distinct groups: hard-shell shrimp (CH) randomly sampled from three ponds with nitrite concentration of (4.35±1.07) mg/L as the control group, and both hard-shell shrimp (NH) and soft-shell shrimp (NS) collected from three other ponds with nitrite concentration of (21.05±0.84) mg/L, as experimental groups. The physiological indexes of the hepatopancreas were determined, and transcriptomic analysis was performed. An average of 45,457,339, 43,648,589, and 44,293,378 clean reads were obtained in the CH, NS, and NH groups, respectively. The obtained unigenes were annotated in the NR (NCBI non-redundant protein sequences), NT (NCBI nucleotide sequences), PFAM (protein family), KOG (euKaryotic Ortholog Groups), SwissProt (a manually annotated and reviewed protein sequence database), GO (Gene Ontology), and KO (KEGG Orthology) databases. The majority of the genes were annotated in the NR database (92.83%), followed by the EggNOG (58.58%), Pfam (57.39%), Swiss-Prot (53.82%), GO (52.49%), and KEGG (43.22%) databases. Overall, 28,878 out of 30,746 genes (accounting for 93.92% of the total) were annotated in at least one database. The transcriptomic results showed that a total of 3,284 differentially expressed genes (DEGs) were identified across different groups. Among these, the NS *vs.* CH group had the highest number of DEGs, at 2,924, including 1,375 up-regulated genes and 1,549 down-regulated genes. The NH *vs.* CH group had the fewest DEGs, with 479, including 313 up-regulated genes and 166 down-regulated genes. In the NS *vs.* NH group, 837 DEGs were identified, with 588 up-regulated genes and 249 down-regulated genes. According to the KEGG enrichment results, the down-regulated differentially expressed genes in the NS *vs.* NH group were significantly enriched in the retinol metabolism pathway (ko00830) and the cytochrome P450 metabolism of xenobiotics pathway (ko00980). In the NS *vs.* CH group, the most significantly down-regulated pathway was also the cytochrome P450 metabolism of xenobiotics pathway (ko00980), with significant enrichment observed in the pentose and glucuronate

① Corresponding author: SHAN Hongwei, E-mail: shanhongwei@ouc.edu.cn

interconversions pathway (ko00040), pancreatic secretion pathway (ko04972), and retinol metabolism pathway (ko00830). In the NH *vs.* CH group, the aldosterone-regulated sodium reabsorption pathway (ko04960) and the progesterone-mediated oocyte maturation pathway (ko04914) were significantly enriched. Additionally, the PPAR signaling pathway (ko03320) and the fatty acid degradation pathway (ko00071) were significantly enriched in both the NS *vs.* NH group and the NS *vs.* CH group. The results showed that high nitrite concentrations significantly inhibited the expression levels of glucose-6-phosphate isomerase, trehalose transporter, UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, glutamine synthetase, and other key genes related to chitin synthesis. In addition, the expression levels of genes related to chitin degradation (chitinase, chitotriase, neutral α-glucosidase) in the NS group were significantly increased. According to the results of GO enrichment analysis, under nitrite stress, hydrolase in the NS group, hydrolyzed O-glycosylated compounds (GO: 0004553), hydrolase, acting on glycosylated bond (GO: 0016798) related gene expression were upregulated, which may lead to a decrease in cuticle chitin content. In addition, GO enrichment analysis showed that, compared with the CH group, NS differentially expressed genes in pre-ribosomes (GO: 0030684), nucleolus (GO: 0005730), cell modification of amino acid metabolism (GO: 0006575), rRNA metabolism (GO: 0016072), and rRNA processing (GO: 0016072). Significant enrichment, such as that observed for long alcohol diphosphate oligosaccharide glycosyltransferase (RPN), translation initiation factor 2 (EIF2), may lead to stratum corneum disorganization. In addition, genes related to mineral absorption (calintegrin binding protein, high affinity copper uptake protein, ferritin, etc.) and calreticulin genes were significantly down-regulated in the NS group, which may directly affect exoskeleton sclerosis. KEGG enrichment analysis showed that, compared with the other two groups, the differentially expressed genes in the NS group were significantly enriched in the PPAR signaling pathway (ko03320) and the fatty acid degradation pathway (ko00071). Specifically, the genes related to lipid metabolism were down-regulated in the NS group, which may lead to the absence of extra energy for exoskeleton hardening. Physiological indexes demonstrated that the activities of chitinase and β-N-acetylglucosaminase in the NS group were significantly higher than those in the NH group and the CH group (P<0.05). Conversely, trehalase activity in the CH group surpassed that of the NS group, while Ca^{2+}-ATPase activity was notably higher in the CH group compared to the NH group (P<0.05). The content of Ca^{2+} in the hepatopancreas in the NH group was significantly higher than that in the NS and CH groups (P<0.05). These results indicate that high nitrite levels in water may affect exoskeleton hardness of *P. vannamei* through a comprehensive mechanism, including reduction of chitin content, damaging cuticle conformation, and reducing mineral deposition. This study provides a theoretical basis for further exploring the effect of nitrite on shrimp exoskeleton.

Key words *Penaeus vannamei*; Nitrite; Exoskeleton; Chitin; Mineral