

秦仕宇, 金博阳, 李倩倩, 等. 克氏原螯虾 *prx 6* 基因抗鲶爱德华氏菌感染的分子机制研究 [J]. 福建农业学报, 2024, 39 (11): 1228–1235.
QIN S Y, JIN B Y, LI Q Q, et al. Antimicrobial Function of Crayfish *prx 6* on *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39 (11): 1228–1235.

克氏原螯虾 *prx 6* 基因抗鲶爱德华氏菌感染的分子机制研究

秦仕宇¹, 金博阳¹, 李倩倩¹, 张明达¹, 文 静¹, 沈秀丽², 杜志强^{1*}

(1. 内蒙古科技大学生命科学与技术学院, 内蒙古 包头 014010; 2. 内蒙古科技大学图书馆, 内蒙古 包头 014010)

摘 要: 【目的】以克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 为研究对象, 探索过氧化物还原酶 6 (Peroxiredoxin 6, Prx6) 基因 (*prx 6*) 在抗细菌先天免疫应答过程中的作用机制, 为克氏原螯虾养殖过程病害问题的防治提供新思路。【方法】为了确定 *prx 6* 基因是否参与到克氏原螯虾抗细菌先天免疫过程, 检测鲶爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 免疫刺激后的克氏原螯虾血细胞、肝胰腺、鳃以及肠组织中 *prx 6* 的相对表达量。采用体外转录法制备 Prx 6 双链 RNA (double-strands RNA, dsRNA), 使用无菌注射器注射至克氏原螯虾血窦处, 通过 qRT-PCR 检测其干扰效果。随后, 通过 RNAi 试验分析鲶爱德华氏菌免疫刺激后克氏原螯虾的存活率, 并通过 qRT-PCR 检测克氏原螯虾内源抗菌肽 (antimicrobial peptides, Amps) 基因的变化情况。【结果】通过 qRT-PCR 试验, 发现经鲶爱德华氏菌刺激后克氏原螯虾各组织中 *prx 6* 基因的表达量上调, 表明其可能参与了克氏原螯虾抗鲶爱德华氏菌的先天免疫调节。为深入研究 *prx 6* 基因的免疫调节作用机制, 体外制备了 Prx 6 双链 RNA, 并注射 dsRNA 后检测克氏原螯虾肝胰腺中 *prx 6* 的相对表达量, 结果显示其表达水平被显著抑制。在 RNAi 试验中, 注射病原菌之后, 与 dsGFP 对照组相比, 克氏原螯虾的存活率显著下降, 证明 *prx 6* 在宿主抵抗病原菌感染过程中发挥了重要作用。进一步检测病原菌感染后克氏原螯虾抗菌肽基因的变化情况, 结果显示, 与 dsGFP 对照组相比较, 克氏原螯虾内源的抗菌肽基因 *ALF 4*、*ALF 1*、*crustin 1*、*crustin 2*、*lys* 和 *lectin 2* 表达量被明显抑制。推测 *prx 6* 基因可能通过调节抗菌肽基因的表达水平, 影响了克氏原螯虾对病原菌的抵抗能力, 进而导致存活率下降。【结论】*prx 6* 在克氏原螯虾对鲶爱德华氏菌的先天免疫中起重要作用, 可能通过调控抗菌肽的表达参与克氏原螯虾抵抗鲶爱德华氏菌的免疫应答过程。

关键词: 克氏原螯虾; RNA 干扰; 先天免疫; *prx 6* 基因; 抗菌肽基因; 鲶爱德华氏菌

中图分类号: S945.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2024) 11-1228-08

Antimicrobial Function of Crayfish *prx 6* on *Edwardsiella ictaluri*

QIN Shiyu¹, JIN Boyang¹, LI Qianqian¹, ZHANG Mingda¹, WEN Jing¹, SHEN Xiuli², DU Zhiqiang^{1*}

(1. School of Life Science and Technology, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia Autonomous Region 014010, China; 2. Library, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia Autonomous Region 014010, China)

Abstract: 【Objective】Function of peroxiredoxin 6 gene (*prx 6*) in the antimicrobial innate immune response mechanism of *Procambarus clarkii* against *Edwardsiella ictaluri* was studied. 【Methods】To confirm the involvement of *prx 6* in the immunological response, gene expressions in the haemocytes, hepatopancreas, gills, and intestines of the *P. clarkii* were examined. Double-strand RNA (dsRNA) of the antimicrobial peptide (Amp) gene in *P. clarkii*, *prx 6*, was prepared by *in vitro* transcription in crayfish blood sinusoids using sterile syringes with the effect verified by qRT-PCR analysis. In a challenge test, survival rate of the *E. ictaluri*-inoculated crayfish was determined by a RNAi assay with the changes in *prx 6* expression analyzed by qRT-PCR. 【Results】The upregulated expressions of *prx 6* in various crayfish tissues after the *E. ictaluri*

收稿日期: 2024-02-06 修回日期: 2024-09-10

作者简介: 秦仕宇 (1996—), 男, 硕士研究生, 主要从事无脊椎动物先天免疫研究, E-mail: 136379728@qq.com

* 通信作者: 杜志强 (1980—), 男, 博士, 教授, 主要从事无脊椎动物先天免疫研究, E-mail: nmdzq1981@163.com

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2024MS03051); 国家自然科学基金项目 (32060834); 内蒙古科技大学 2022 年基本科研业务费专项资金 (028)

stimulation indicated a positive association of the gene with the pathogenic invasion. Furthermore, an injection of the *in vitro* prepared dsRNA significantly suppressed the expression of *prx* 6 in the hepatopancreas confirming the response of the crayfish. The RNAi assay also showed a significant lower survival rate of the crayfish in the *E. ictaluri*-inoculation group than that in the dsGFP control indicating a significant effect of *prx* 6 in combating the bacterial infections. Additionally, in the challenge test some other endogenous Amp genes, such as *ALF* 4, *ALF* 1, *crustin* 1, *crustin* 2, *lys*, and *lectin* 2, were significantly downregulated in the *E. ictaluri*-inoculated crayfish in comparison with the dsGFP-inoculated counterparts. It was speculated that *prx* 6 contributed to the crayfish resistance to the infection by *E. ictaluri* through modulating Amp genes resulting in an improved survival. It was hypothesized that *prx* 6 participated in the innate immune response of crayfish against *E. ictaluri* through regulations on the endogenous Amp genes.

Key words: *Procambarus clarkii*; RNAi; innate immunity; *prx* 6; Amps; *E. ictaluri*

0 引言

【研究意义】克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)，俗称小龙虾，是我国重要的淡水经济养殖动物之一。在食品领域，因其独特的风味而被人们所喜爱。然而，由于淡水养殖环境的集约化，导致克氏原螯虾养殖过程中易发疾病，加之其半开放循环系统的身体构造，导致甲壳类细菌性疾病频发，严重影响了养殖业的经济效益^[1]。在科研领域，克氏原螯虾具有高度可用的基因组序列，因此成为了研究无脊椎动物先天免疫系统的理想模式生物^[2]。本研究通过分析克氏原螯虾 *prx* 6 基因潜在的参与抗细菌先天免疫反应的分子功能，一方面可以为水产养殖行业提供抗细菌新策略和疫苗开发新方向，另一方面可以进一步完善无脊椎动物抗细菌先天免疫的基础理论。【前人研究进展】在关于过氧化物还原酶 (peroxiredoxin, Prx) 的研究中，Kim 等首次从酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中鉴定出 *prx* 基因之后，研究人员又陆续在果蝇 (*Drosophila*)、秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、松江鲈 (*Trachidermus fasciatus*) 等生物中发现了 Prx 分子的不同亚型^[3-6]。在脊椎动物中，关于 Prx 的研究主要集中在肿瘤的形成与发生方面，相关研究表明 Prx 不仅可以通过清除肿瘤细胞中的 ROS 来促进癌细胞的存活，而且还可以保护肿瘤细胞免受电离辐射和化学治疗引起的额外应激反应^[7]。近十年，随着基因测序技术的不断发展，研究人员对 Prx 的基因分类以及在无脊椎动物中作用机制的探索进程得以加速。据目前研究结果表明，无脊椎动物 Prx 家族含有 6 种不同亚型，在遭受外界病原侵染的过程，6 种不同亚型的 *prx* 基因在宿主肝胰腺中不同程度上调表达，表明它们很有可能参与无脊椎动物抗细菌先天免疫的调节反应^[8]。例如，Zhao 等^[9]以斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 为研究对象，发现在受到非生物胁迫或者病原侵染的时候，斑节对虾体内 *prx* 基因

的表达量发生显著上调，同时体外试验证实了 Prx 重组蛋白具有抑菌活性。Weerachatanukul 等^[10]发现墨吉对虾 (*Banana prawn*) 传染性皮下及造血组织坏死病毒可以通过提高 Prx 的过氧化物还原酶活性来发挥强烈的免疫刺激作用。这些发现均表明 Prx 可以直接参与到机体对抗病原菌侵染的免疫应答过程，在无脊椎动物先天免疫系统中扮演着重要的角色；同时，近期研究发现 *prx* 基因可能作为一种信号传递的桥梁基因，调控了某些具体的免疫应答反应^[11]。例如，Ran 等^[12]发现凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 体内存在以 *prx* 4 为关键枢纽的信号级联反应过程，细胞内的 Prx 4 分子会分泌到细胞外，来介导病原菌结合到细胞膜的受体上，从而激活体内 JAK/STAT 信号通路，促使抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 基因发生转录，最终抑制病原菌的进一步侵染。McGinnis 等^[13]在果蝇中发现，Prx 的催化活性形式不仅可以作为细胞氧化还原和 H₂O₂ 通量变化的标志，还可以在适应性反应中发挥作用，最终激活果蝇体内的一些生理现象。Shao 等^[14]在犬新孢子菌 (*Neospora caninum*) 中发现，Prx 不仅可以维持菌内氧化还原系统的稳定，还可以作为一种毒力因子，在病原侵袭以及在宿主体内增殖的过程中扮演重要角色。这一发现表明 Prx 家族在生物体抵抗病原侵染的过程中发挥着重要作用，同时也是某些病原所利用的“工具”，这些研究结果为水产养殖业提供了一种新的抗菌免疫策略。【本研究切入点】过氧化物还原酶 Prx 分子的免疫活性在高等生物中研究较多，并且主要集中在医学研究领域，在低等生物中的研究结果较少，尤其在水生无脊椎动物中关于 Prx 分子的免疫调控作用少有报道。Prx 家族在免疫应答中已有相关研究，但是 *prx* 6 基因与抗菌肽基因的具体调节机制尚不清楚。【拟解决的关键问题】本研究基于前期转录组测序，通过 RNA 干扰技术人为降低克氏原螯虾体内 *prx* 6 基因的表达水平，旨在深入研究克氏原螯虾 *prx* 6 基因在鲶爱德华氏菌感染后参与机

体抵抗病原菌侵染的分子调控机制,重点探索其对抗菌肽基因的调节作用,揭示 *prx 6* 基因在克氏原螯虾抗病原菌侵染中的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从活跃且肢体完整的 6 月龄克氏原螯虾中选取体重在 (20 ± 2) g 的雄性克氏原螯虾,购买于包头市友谊海鲜市场水产店。试验正式开始之前,克氏原螯虾在恒温水箱进行预养,投喂线虫饵料每日 3 次,预养温度 $27 \sim 30$ °C,时间为 2 周。之后,筛选健康、有活力的克氏原螯虾进行分组饲养处理。试验所用菌株为鲎爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*),其 30% 甘油保存的菌株保藏于本实验室低温冰箱,实验前利用液体 LB 培养液在摇床中进行室温过夜活化。

1.2 试验方法

1.2.1 鲎爱德华氏菌刺激处理及 *prx 6* 的表达模式

试验设置包括鲎爱德华氏菌刺激组(试验组)和 $1 \times \text{PBS}$ 刺激组(对照组)。使用无菌 $1 \times \text{PBS}$ 将鲎爱德华氏菌按体积比 1:8 进行稀释,试验组克氏原螯虾在第二腹节处注射 100 μL 菌液,确保每只克氏原螯虾的细菌注射量为 2×10^7 CFU (colony forming units);对照组克氏原螯虾则注射等量无菌 $1 \times \text{PBS}$ 。分别于 0、12、24、36、48 h 进行解剖取样,每个时间选取 3 只以上存活克氏原螯虾的血淋巴(用于分离血细胞)、肝胰腺、鳃、肠组织。取 50 mg 组织进行总 RNA 提取、反转录合成 cDNA,于低温冰箱保存备用。

以上述 cDNA 为模板、克氏原螯虾 18S rRNA 为内参基因,采用 qRT-PCR 检测 4 个组织中 *prx 6* 基因的表达水平,所用引物序列如表 1 所示。qRT-PCR 程序为: 95 °C, 30 s; 95 °C, 5 s (40 个循环); 60 °C, 34 s (40 个循环); 95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s; 95 °C, 15 s。每个处理每个取样点设置 3 个生物学重复,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 算法计算目的基因的相对表达量。

1.2.2 克氏原螯虾 *prx 6* 双链 RNA 体外转录法合成

根据前期转录组获得的克氏原螯虾 *prx 6* 基因序列,设计干扰引物 *prx 6*-iF 与 *prx 6*-iR (表 1),以克氏原螯虾混合组织 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增干扰片段,使用程序如下: 94 °C, 3 min; 94 °C, 30 s; 54 °C, 45 s; 72 °C, 45 s; 72 °C, 5 min, 共 35 个循环。之后,通过琼脂糖凝胶电泳回收目的基因 DNA 片段,所用试剂为 DNA 胶回收试剂盒 (Takara),所获得的 DNA 样品保存于 -20 °C 冰箱中。

使用 *in vitro* Transcription T7 Kit 试剂盒 (Takara)

进行体外转录制备 *Prx 6* 双链 RNA (ds*Prx 6*),体外转录的反应体系包括: 5 μL RNase free H_2O 、4 μL $10 \times \text{Transcription buffer}$ 、4 μL A/U/C/GTP、1 μL RNase inhibitor、1 μL T7 RNA Polymerase 和 10 μL DNA 模板, 42 °C 水浴 2 h 后,加入 RNase free DNase I 4 μL ,继续水浴 30 min 去除残留 DNA 模板。转录 ds*Prx 6* 保存于 -80 °C 低温冰箱。GFP 双链 RNA (dsGFP) 也采用上述方法制备。

1.2.3 克氏原螯虾 *prx 6* 基因的 RNA 干扰 (RNAi) 试验

将 ds*Prx 6* 与 dsGFP 用 $1 \times \text{PBS}$ 稀释至 3000 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,利用无菌 $1 \times \text{PBS}$ 按照体积比 1:8 稀释鲎爱德华氏菌的过夜培养液,保存备用。试验包括 $1 \times \text{PBS}$ 组(对照组)、dsGFP+鲎爱德华氏菌刺激组(试验组 1)和 ds*Prx 6*+鲎爱德华氏菌刺激组(试验组 2),每组 30 只虾。试验中,每只克氏原螯虾血窦处注射 30 μL ds*Prx 6* 或 dsGFP,紧接着于第二腹节处注射鲎爱德华氏菌稀释液 100 μL (2×10^7 CFU),对照组注射 100 μL 无菌 $1 \times \text{PBS}$ 。分别在菌液注射后 0、12、24、36、48 h 进行克氏原螯虾解剖与肝胰腺组织取样,取样时间和方法同上。

为了验证干扰效果,以 dsGFP 组克氏原螯虾对应的肝胰腺为对样品,以克氏原螯虾 18S RNA 为内参基因,采用 qRT-PCR 检测 0、12、24、36、48 h 肝胰腺组织中 *prx 6* 基因的相对表达量。所用引物如表 1 所示,qRT-PCR 程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s、 60 °C 34 s,共 40 个循环; 95 °C 15 s; 60 °C 60 s; 95 °C 15 s。每个样品设置 3 个生物学重复,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 算法计算相对表达量。此外,在目的基因 *prx 6* 干扰效果检测有效之后,分别记录 0、2、6、12、24、36、48 h 时间点克氏原螯虾的存活情况,并进行统计分析。

1.2.4 RNAi 试验中克氏原螯虾肝胰腺总 RNA 的提取及 cDNA 反转录合成

RNAi 试验中,在每个时间点(细菌稀释液注射后 0、12、24、36、48 h)进行克氏原螯虾肝胰腺组织取样。分别取 50 mg 肝胰腺组织,使用 TRIZOL up 试剂盒(全式金生物技术有限公司)进行总 RNA 提取。在玻璃匀浆器中加入 1 mL TRIZOL 提取液以及 200 μL 预冷氯仿替代物,加入肝胰腺组织充分研磨,再通过离心、乙醇洗涤等步骤,加入 50 μL RNA Dissoving, 55 °C 水浴 10 min,即为总 RNA 提取液。使用 NANO Drop 2000 仪器进行浓度检测,再通过 1% 琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 产物的完整性。最后于 -80 °C 低温冰箱中保存。

使用 Prime Script TR Reagent Kit (Takara) 试剂盒通过两步法合成 cDNA,在无 RNA 酶的 200 μL 离

表 1 引物序列表
Table 1 Sequences of applied primers

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
<i>prx</i> 6-iF	GCGTAATACGACTCACTATAGGATGGTTAACTTAGGCGAT	扩增干扰片段
<i>prx</i> 6-iR	GCGTAATACGACTCACTATAGGGTCTATGGCTCTAAGAAT	
GFP-iF	GCGTAATACGACTCACTATAGGCGAGCTGGACGGCGACGTAAAC	
GFP-iR	GCGTAATACGACTCACTATAGGCTTGAAGTTCACCTTGATGCC	
<i>prx</i> 6-RT-F	CGGATCACTGGAGGGTCA AACA	扩增定量PCR片段
<i>prx</i> 6-RT-R	GCA ATTTTCATCCTCGGCATCA	
18S rRNA-RT-F	TCTTCTTAGAGGGATTAGCGG	
18S rRNA-RT-R	AAGGGGATTGAACGGGTTA	
<i>Pc-ALF</i> 4-RT-F	CCAGATCATCTCCACCGTCG	
<i>Pc-ALF</i> 4-RT-R	GTAGCCTTGAGCTTTTCCCA	
<i>Pc-ALF</i> 1-RT-F	CGAGAGGCTGTAGAGGATGC	
<i>Pc-ALF</i> 1-RT-R	CCCAGTTTGTTGATGATGAG	
<i>Pc-crustin</i> 1-RT-F	CAACTACCCTAACCACTCAAC	
<i>Pc-crustin</i> 1-RT-R	CCTCAGAGCTACGACAAATGAG	
<i>Pc-crustin</i> 2-RT-F	GGGAAGAAAAGCACAATGGT	
<i>Pc-crustin</i> 2-RT-R	GGTATGGAGGTCGAGACAGG	
<i>Pc-lys</i> -RT-F	GTCAACCCACCCTCAATAAC	
<i>Pc-lys</i> -RT-R	CTTGTAATCAGGGCGTA	
<i>Pc-lectin</i> 2-RT-F	TTGAATGTGCGTCCTGTGGT	
<i>Pc-lectin</i> 2-RT-R	ATTGCCATTACAGAGTGAAGAG	

心管中加入 5×PrimeScript TR Master Mix 2 μL、Total RNA 1 μL、RNase free dH₂O 7 μL，离心混匀之后利用 PCR 仪进行反转录反应，程序为：37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s，4 ℃ 保存。制备完成后保存于-80 ℃ 低温冰箱。

1.2.5 RNAi 试验中克氏原螯虾肝胰腺抗菌肽基因的表达模式研究

以上述各时间点（细菌稀释液注射后 0、12、24、36、48 h）克氏原螯虾肝胰腺 cDNA 为模板，利用 qRT-PCR 检测克氏原螯虾抗菌肽基因的相对表达量。内参基因为克氏原螯虾 18S RNA，所用抗菌肽基因的引物序列如表 1 所示，PCR 程序同 1.2.3。每个样品设置 3 个生物学重复，采用 2^{-ΔΔCT} 算法计算抗菌肽基的相对表达量。

1.3 数据统计分析

通过 GraphPad Prism 8 软件进行组内单因素方差显著性分析（one-way ANOVA），通过 *t* 检验分析组间差异水平，显著水平设置为 *P*<0.05，极显著水平设置为 *P*<0.01。

2 结果与分析

2.1 鲶爱德华氏菌免疫刺激后克氏原螯虾 *prx* 6 基因的表达模式

鲶爱德华氏菌侵染后，利用 qRT-PCR 检测克氏

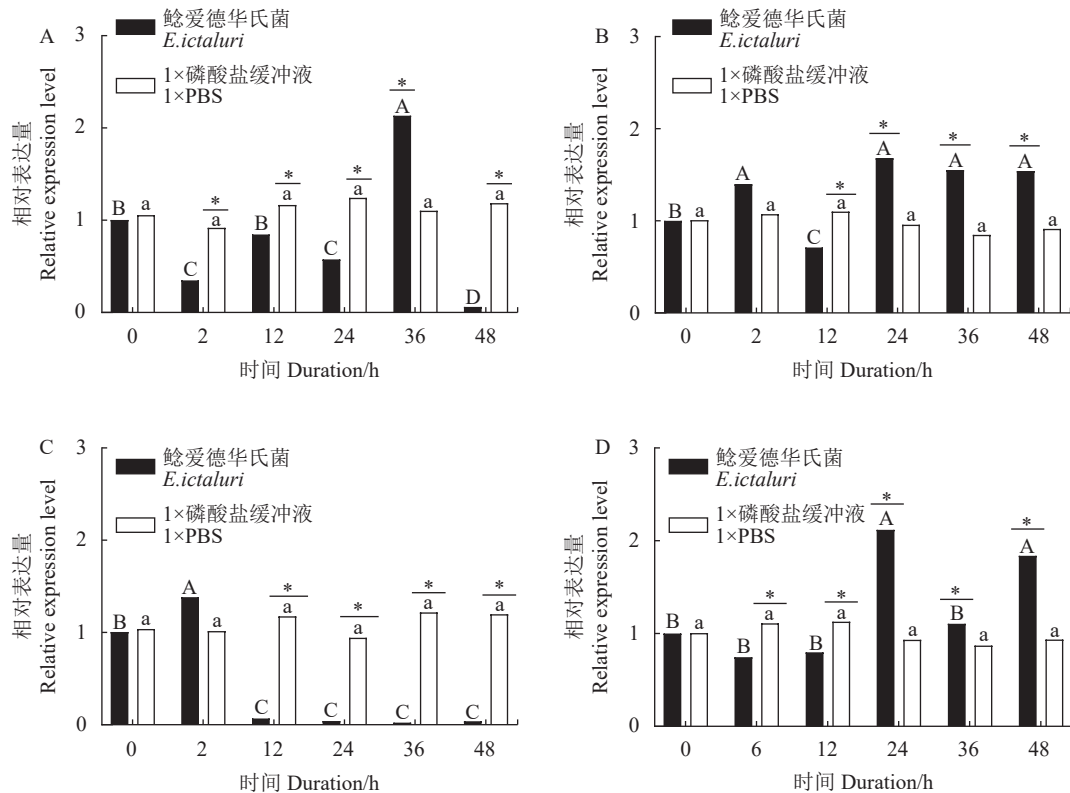
原螯虾血细胞、肝胰腺、鳃、肠组织中 *prx* 6 基因的相对表达量，结果（图 1）表明：在克氏原螯虾各组织中 *prx* 6 基因的表达量呈现先升高后降低的表达趋势，说明该基因参与了宿主抗细菌的免疫调节过程。此外，观察到 *prx* 6 在克氏原螯虾肝胰腺组织中表达显著上调，而且上调趋势持续时间较长，表明该基因在克氏原螯虾免疫器官中具有较好的表达效果。

2.2 *Prx* 6 双链 RNA 对克氏原螯虾内源 *prx* 6 基因的干扰效果

通过 RNAi 试验人为敲低克氏原螯虾 *prx* 6 基因表达量之后，利用 qRT-PCR 检测克氏原螯虾肝胰腺组织中 *prx* 6 基因的表达水平，结果如图 2 所示：相比较于 dsGFP 组的情况，dsPrx 6 组克氏原螯虾肝胰腺组织中 *prx* 6 基因的表达量显著降低。表明 *prx* 6 双链 RNA（dsPrx 6）可以有效干扰克氏原螯虾内源 *prx* 6 基因的表达水平，可用于后续研究。

2.3 RNAi 试验中鲶爱德华氏菌刺激后克氏原螯虾的存活率

RNAi 试验中，人为降低目的基因 *prx* 6 表达量、并且进行鲶爱德华氏菌免疫刺激之后，统计了克氏原螯虾的存活情况，结果如图 3 所示：对比于 dsGFP 组以及 1×PBS 组，在人为 RNAi 降低 *prx* 6 基因表达量之后，克氏原螯虾的存活率显著下降，表明克氏原螯虾 *prx* 6 基因在抵御鲶爱德华氏菌侵染过



A 为血细胞、B 为肝胰腺、C 为鳃、D 为肠。图中不同大写或小写字母分别代表同一处理不同时间点之间差异显著 ($P < 0.05$), *代表同一时间点不同处理组之间差异显著 ($P < 0.05$)。图 2 同。

A: hemocytes tissue; B: hepatopancreas tissue; C: gills tissue; D: intestines tissue. Data with different uppercase or lowercase letters represent significant differences at different time points within same treatment group; asterisk indicates difference between treatment groups at same time point at $P < 0.05$. Same for Fig. 2.

图 1 鲢爱德华氏菌刺激后克氏原螯虾 *prx 6* 基因的表达模式

Fig. 1 Expressions of *prx 6* in crayfish stimulated by *E. ictaluri*

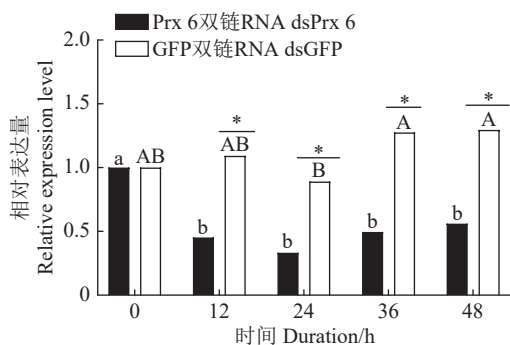


图 2 *Prx 6* 双链 RNA 干扰效果的检测结果

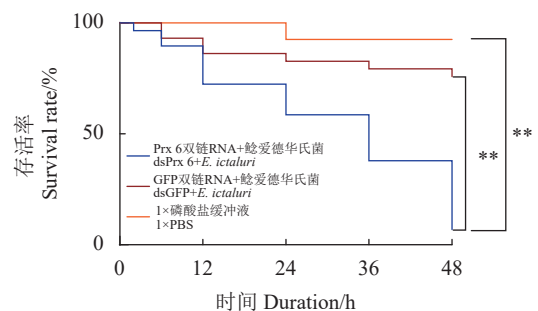
Fig. 2 Detection of interference by dsRNA of *Prx 6*

程中可能发挥重要作用。

2.4 RNAi 试验中鲢爱德华氏菌刺激后克氏原螯虾肝胰腺中抗菌肽基因的表达模式

为了进一步探究克氏原螯虾存活率下降的原因以及 *prx 6* 发挥调控作用的可能分子机制, 在 RNAi 试验中鲢爱德华氏菌刺激后, 选择克氏原螯虾重要免疫器官肝胰腺组织进行深入研究。同时, 选择克氏原螯虾 Toll 信号通路中部分抗菌肽基因进行基因表达量的检测, 这些抗菌肽基因包括 *ALF 4*、*ALF 1*、

crustin 1、*crustin 2*、*lys* 和 *lectin 2* 基因。qRT-PCR 检测结果如图 4 所示: 与 dsGFP 组相比较, *ALF 4*、*ALF 1*、*crustin 1*、*crustin 2*、*lys*、*lectin 2* 基因的上调趋势均被明显地抑制, 甚至发生了下调表达。推测 *prx 6* 基因可能通过影响抗菌肽基因的表达水平, 进而参与到克氏原螯虾抵抗鲢爱德华氏菌侵染的免疫应答过程。

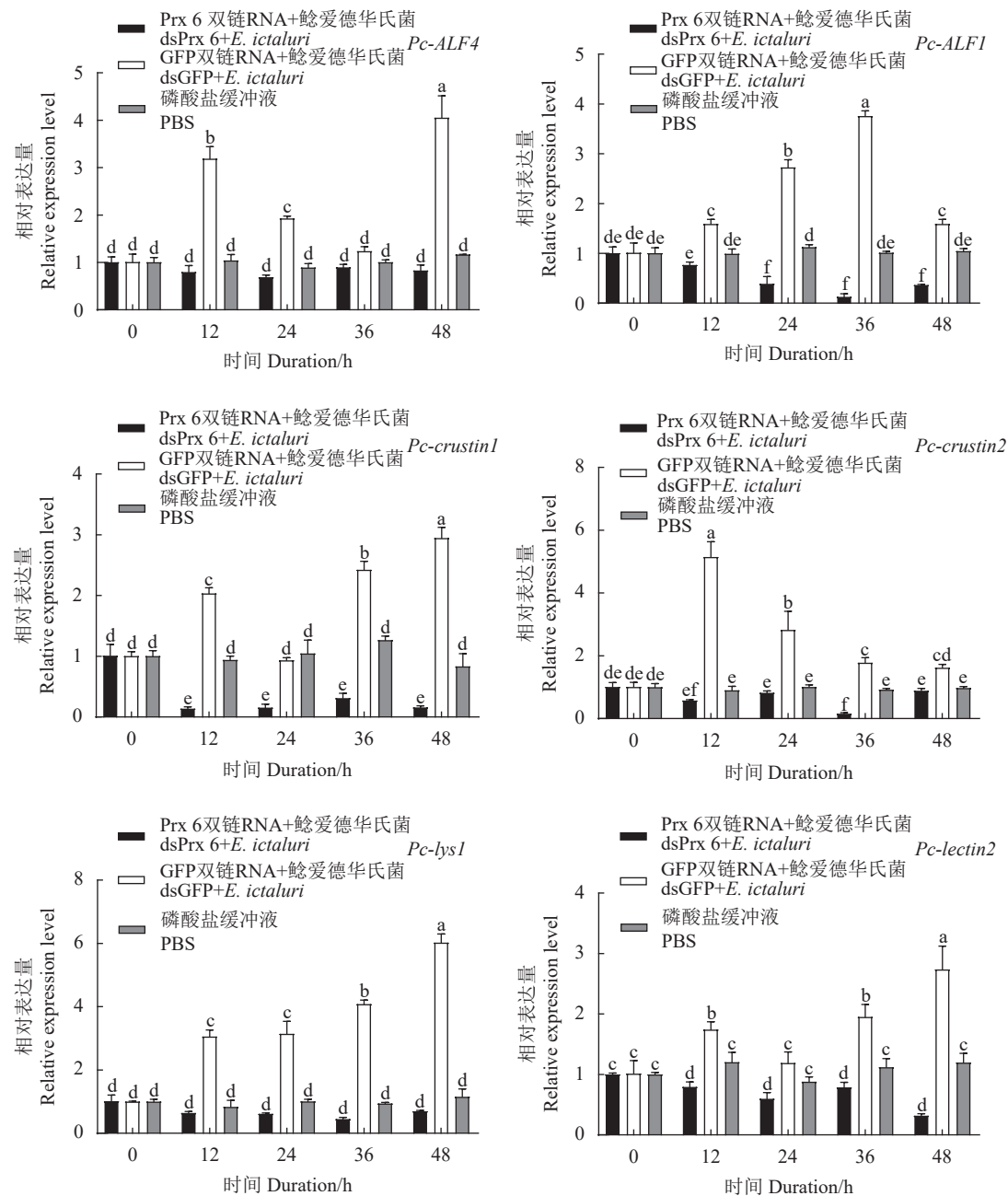


**表示差异极其显著 ($P < 0.01$)。

** indicates significant difference at $P < 0.01$.

图 3 RNAi 试验中鲢爱德华氏菌刺激对克氏原螯虾存活率的影响

Fig. 3 Survival rate of crayfish injected with *E. ictaluri* in RNAi assay



图中不同字母代表不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Data with different letters represent significant differences at $P < 0.05$.

图 4 RNAi 试验中克氏原螯虾肝胰腺抗菌肽基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expressions of Amp genes in crayfish hepatopancreas detected by RNAi assay

3 讨论

过氧化物还原酶是一种普遍存在于各种生物体的过氧化物家族分子。研究报道过氧化物还原酶参与绝大多数的生物过程，如氧化还原系统、凋亡、先天免疫、细胞命运的调控过程等，其中也包括了无脊椎动物的先天免疫^[15-18]。本研究对 *prx 6* 基因在抵抗鲶爱德华氏菌感染克氏原螯虾各组织中的表达情况进行检测，结果显示 *prx 6* 均有不同程度的上调表达趋势。相似的结果也在前人研究中出现。例

如，Huang 等^[19]发现在 LPS、PGN 和 Poly I:C 分别刺激后，克氏原螯虾各组织中 *prx 1* 基因在转录水平上都出现了不同程度的上调响应，在斑节对虾^[9]、墨吉对虾^[10]中的报道类似。表明 *prx* 家族基因会在病原侵入后被迅速激活，可能参与到低等生物的某些生物学过程。但关于过氧化物还原酶的分子调控机制目前并没有一致的明确结论。

本研究发现，在克氏原螯虾鳃组织中 *prx 6* 基因仅在细菌刺激的早期阶段出现了微弱的免疫响应，推测可能是由于试验中通过注射细菌模拟了水环境

中的细菌侵入克氏原螯虾体内,而鳃组织作为直接与外部环境接触的重要器官,可能是首先受到感染和免疫反应的部位。免疫系统通过识别和清除入侵的病原体来应对感染,从而导致 *prx* 6 基因在早期阶段表达。随着免疫反应的进行和病原体的清除, *prx* 6 基因的表达可能会逐渐减弱或消失。这可能是因为免疫系统成功控制了感染,也可能是由于其他免疫调节机制的参与。此外,研究结果显示:在克氏原螯虾肝胰腺组织中,鲶爱德华氏菌侵染之后, *prx* 6 基因出现了较为明显的上调响应趋势,而且响应时间持续较长。分析其原因,可能是因为肝胰腺作为低等水生生物活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生中心,同时也是生物体对抗病原菌的先天免疫反应的主要免疫器官^[20-21], *prx* 6 基因在克氏原螯虾肝胰腺组织中抵抗鲶爱德华氏菌侵染的免疫应答过程发挥了重要作用。同样地,在无脊椎动物中,肝胰腺也被认为与哺乳动物具有较高的功能类似性,其同样负责生物体的生理代谢与免疫调控^[22-23]。因而肝胰腺也经常被选择作为一个研究病原刺激后机体免疫响应的主要器官^[24]。

为了进一步探索克氏原螯虾 *prx* 6 基因先天免疫调控作用的分子机制,在体外制备了 *prx* 6 双链 RNA,进行 RNA 干扰试验人为降低 *prx* 6 基因的表达量。结果表明:相比于对照组, *prx* 6 基因的表达被显著抑制,干扰效果良好。后续 RNAi 试验中,鲶爱德华氏菌免疫刺激之后,与 dsGFP 组相比, RNAi 降低 *prx* 6 基因表达水平之后,克氏原螯虾对于鲶爱德华氏菌的抵抗力降低,其存活率显著下降。类似的结果在昆虫中也有报道,例如 Gul 等^[25]以柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 为研究对象,将其 *prx* 2 基因沉默之后感染病原菌,结果显示柞蚕的存活率显著下降。Supitcha 等^[26]以对虾 (*Penaeus vannamei*) 为研究对象,将 *prx* 4 沉默之后,对虾感染病原菌的存活率出现了下降趋势。上述研究结果进一步揭示了 *prx* 家族基因在抗细菌先天免疫中发挥的重要作用。

抗菌肽作为无脊椎动物主要的抗菌活性物质,在先天免疫系统中扮演了重要的角色。据目前研究报道显示,抗菌肽分子有可能是甲壳类动物中主要的广谱抗菌物质,例如,在宿主抵抗藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、鲶爱德华氏菌、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 等过程中均发挥了重要作用^[27-29]。Ren 等^[30]在凡纳滨对虾 (*L. vannamei*) 发现,降低 *prx* 2 基因表达量之后,白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 侵染的情况下,凡纳滨对虾

ALF、*crustin* 等抗菌肽基因的上调趋势被显著抑制。本研究检测了 *prx* 6 基因被 RNAi 降低表达量之后,鲶爱德华氏菌刺激的情况下,克氏原螯虾肝胰腺中 *ALF* 1、*ALF* 4、*crustin* 1、*crustin* 2、*lys* 以及 *lectin* 2 抗菌肽基因表达量的变化情况,结果显示:这些基因的表达水平均被明显抑制,推测 *prx* 6 可能通过调控抗菌肽相关基因的表达水平参与到克氏原螯虾抗细菌先天免疫当中。同时,这也与克氏原螯虾的存活率结果相互印证,即 RNAi 使 *prx* 6 表达量下降之后,抗菌肽相关基因表达水平也受到抑制,造成无法及时发挥杀菌作用,进而使克氏原螯虾的存活率下降。综合以上结果可以推测,在克氏原螯虾针对鲶爱德华氏菌侵染的免疫响应过程中, *prx* 6 基因可能通过影响信号通路相关的抗菌肽基因的表达水平,发挥免疫调控作用,对克氏原螯虾的存活率起到关键影响。

4 结论

本研究采用 RNAi 技术,降低克氏原螯虾 *prx* 6 基因的表达量,并且进行鲶爱德华氏菌免疫刺激之后,利用 qRT-PCR 检测了克氏原螯虾肝胰腺中信号通路相关的抗菌肽基因的相对表达量,结果显示:抗菌肽基因的表达量受到了明显抑制,推测 *prx* 6 可能通过影响信号通路从而调控了宿主的抗细菌先天免疫反应。本研究得到的初步结论可以为后续深入探索克氏原螯虾 *prx* 6 基因的生物学功能提供理论基础,同时也为水产养殖过程抗细菌免疫策略的制定提供了新靶点。

参考文献:

- [1] 张玲宏,张圆圆,郜小龙,等.河南小龙虾养殖产业现状分析与前景展望[J].中国水产,2023(7):46-49.
ZHANG L H, ZHANG Y Y, GAO X L, et al. Analysis of the existing circumstance and prospect of Henan crayfish culture industry [J]. *China Fisheries*, 2023(7): 46-49. (in Chinese)
- [2] TASSANAKAJON A, RIMPHANITCHAYAKIT V, VISETNAN S, et al. Shrimp humoral responses against pathogens: Antimicrobial peptides and melanization [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 80: 81-93.
- [3] KIM K, KIM I H, LEE K Y, et al. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(10): 4704-4711.
- [4] CUBAS-GAONA L L, DE FRANCISCO P, MARTÍN-GONZÁLEZ A, et al. *Tetrahymena* glutathione peroxidase family: A comparative analysis of these antioxidant enzymes and differential gene expression to metals and oxidizing agents [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(7): 1008.
- [5] XU L, YANG J, XU M, et al. Speciation and adaptive evolution reshape antioxidant enzymatic system diversity across the Phylum

- Nematoda [J]. *BMC Biology*, 2020, 18(1): 181.
- [6] LIU Y Y, CONG H Y, BI C H, et al. Molecular characterization and functional analysis of peroxiredoxin 1 (Prx1) from roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2024, 50(2): 513–526.
- [7] THAPA P, JIANG H, DING N, et al. The role of peroxiredoxins in cancer development [J]. *Biology*, 2023, 12(5): 666.
- [8] 李辉, 冯伟, 于俊杰, 等. 甲壳动物过氧化物还原酶基因的研究进展 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2021, 47 (3): 284–294.
- LI H, FENG W, YU J J, et al. Research progress of peroxiredoxin gene in crustaceans [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2021, 47(3): 284–294. (in Chinese)
- [9] ZHAO C, PENG C, FAN S G, et al. Novel 2-Cys Peroxiredoxin gene confers biotic and abiotic stress resistance in *Penaeus monodon* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 768–775.
- [10] WEERACHATYANUKUL W, POOLJUN C, HIRONO I, et al. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus-like particle (IHHNV-VLP) induces peroxiredoxin expression and activity in *Fenneropenaeus merguensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 121: 53–61.
- [11] AHN S J, MC DONNELL R J, CORCORAN J A, et al. Identification and functional characterization of the first molluscan neuromedin U receptor in the slug, *Deroceras reticulatum* [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 22308.
- [12] RAN X Q, GAO L, YAN M, et al. Peroxiredoxin 4 interacts with domeless and participates in antibacterial immune response through the JAK/STAT pathway [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 907183.
- [13] MCGINNIS A, KLICHKO V I, ORR W C, et al. Hyperoxidation of peroxiredoxins and effects on physiology of *Drosophila* [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(4): 606.
- [14] SHAO Y T, YUAN X D, DU B Y, et al. *Neospora caninum* peroxiredoxin 1 is an essential virulence effector with antioxidant function [J]. *Veterinary Parasitology*, 2024, 327: 110117.
- [15] DUARTE-JURADO A P, DE JESUS LOERA-ARIAS M, SAUCEDO-CARDENAS O, et al. Peroxiredoxin 5 overexpression decreases oxidative stress and dopaminergic cell death mediated by paraquat [J]. *Cells & Development*, 2023, 175: 203860.
- [16] CHEN P C, ZHONG X R, SONG Y L, et al. Triptolide induces apoptosis and cytoprotective autophagy by ROS accumulation via directly targeting peroxiredoxin 2 in gastric cancer cells [J]. *Cancer Letters*, 2024, 587: 216622.
- [17] FLYNN R J, MUSAH-EROJE M. Evasion of host immunity during *Fasciola hepatica* infection [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 2137: 107–115.
- [18] XIONG X Q, LI J, CHEN Z, et al. Peroxiredoxin 3 inhibits cardiac fibrosis in mice via NOX4-P38 signalling [J]. *Cell Journal*, 2023, 25(6): 391–398.
- [19] HUANG L, LIU Y, ZHANG X X, et al. Peroxiredoxin 1 of *Procambarus clarkii* govern immune responses during pathogen infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 138: 108828.
- [20] ZHANG Y Y, MI K H, XUE W, et al. Acute BPA exposure-induced oxidative stress, depressed immune genes expression and damage of hepatopancreas in red swamp crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 103: 95–102.
- [21] XU Z N, LIU A, LI S K, et al. Hepatopancreas immune response during molt cycle in the mud crab, *Scylla paramamosain* [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 13102.
- [22] ZHONG W J, CHEN C S, TAN S Y, et al. Identification of a novel crustacean vascular endothelial growth factor b-like in the mud crab *Scylla paramamosain*, and examination of its role in lipid accumulation [J]. *Aquaculture*, 2023, 575: 739793.
- [23] LI Y M, YE Y C, NA R H, et al. Polystyrene nanoplastics induce lipid metabolism disorder and alter fatty acid composition in the hepatopancreas of Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 906: 167616.
- [24] 田贵云, 姜虎成, 孙梦玲, 等. 噻虫嗪暴露对克氏原螯虾的病理损伤和生化反应的影响 [J]. 水产养殖, 2023, 44 (10): 18–22, 54.
- TIAN G Y, JIANG H C, SUN M L, et al. Effects of thiamethoxam exposure on pathological damage and biochemical reaction of *Procambarus clarkii* [J]. *Journal of Aquaculture*, 2023, 44(10): 18–22, 54. (in Chinese)
- [25] GUL I, ABBAS M N, HUSSAINI N, et al. Peroxiredoxin-2 gene in *Antheraea pernyi* modulates immune functions and protect DNA damage [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 256(Pt 2): 128410.
- [26] WANVIMONSUK S, JAREE P, KAWAI T, et al. Prx4 acts as DAMP in shrimp, enhancing bacterial resistance via the toll pathway and prophenoloxidase activation [J]. *iScience*, 2023, 26(1): 105793.
- [27] SCIEUZO C, GIGLIO F, RINALDI R, et al. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of the peptide fractions extracted from the hemolymph of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) [J]. *Insects*, 2023, 14(5): 464.
- [28] HAN H H, LI T, WANG Z L, et al. Improved stability and activity of a marine peptide-N₆NH₂ against *Edwardsiella tarda* and its preliminary application in fish [J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(12): 650.
- [29] SERNA-DUQUE J A, ESPINOSA-RUIZ C, ESTEBAN M Á. Hepcidin and piscidin modulation and antibacterial response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) infected with *Vibrio harveyi* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 139: 108899.
- [30] REN X C, LIU X P, LIU Q H. *Litopenaeus vannamei* peroxiredoxin 2-like is involved in WSSV infection by interaction with wsv089 and VP26 [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2022, 126: 104243.

(责任编辑：张梅)