

DOI: 10.12264/JFSC2024-0115

驱动蛋白基因调节克氏原螯虾血淋巴细胞的吞噬作用

杜国儒¹, 解伟¹, 左佳俊², 刘伟¹, 王雪惠³, 隋丽英¹

1. 天津科技大学海洋与环境学院, 海洋资源化学与食品技术教育部重点实验室, 亚洲区域卤虫参考中心, 天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津 300457;

2. 沈阳农业大学动物科学与医学学院, 辽宁 沈阳 110866;

3. 天津市水产研究所, 天津 300221

摘要: 为探究克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)免疫调节作用的分子机制, 本研究分析了与 3-羟基丁酸共培养的克氏原螯虾的血淋巴细胞转录组数据, 发现细胞骨架基因呈显著的差异表达, 推测其可能与克氏原螯虾的免疫调节相关。本研究对细胞骨架基因进行注释, 并验证了其对细胞免疫调节的影响。注释结果显示, 5 个细胞骨架基因中 4 个为驱动蛋白超家族(kinesin family, KIF)基因, 均含有 KISc 结构域, 且编码氨基酸以谷氨酸、亮氨酸为主, 蛋白质二级结构主要由 α -螺旋组成。各物种中除 kinesin-like protein 的保守结构域及保守基序数量、种类和位置有所差别, 其余 KIFs 基因大致相同。qRT-PCR 结果表明, KIFs 基因在克氏原螯虾的造血组织和鳃中表达量较高, 在眼柄、肌肉等组织中表达较低($P<0.05$)。RNAi 结果证明, 0.10 $\mu\text{g/g}$ 体重剂量 dsKIF11 的敲降效果最佳, 可将 KIF11 的表达量敲降至 8.01% ($P<0.05$); 与对照组相比, 随着 KIF11 基因的敲降, 血淋巴细胞对 FITC 标记的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和红色荧光微球的吞噬率分别下降 36.26% ($P<0.01$)和 41.94% ($P<0.01$)。上述结果表明 KIFs 基因保守性较高, 参与了血淋巴细胞的吞噬作用, 这一结果为深入研究 KIFs 基因在先天免疫中的功能和机制提供了依据。

关键词: 克氏原螯虾; 血淋巴细胞; 驱动蛋白; 吞噬作用; 免疫

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)07-0766-14

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)又称小龙虾, 隶属甲壳动物亚门、螯虾科、原螯虾属^[1]。其繁殖能力强, 蛋白含量高, 脂肪含量低, 是营养价值较高的动物性食品^[2], 也是我国重要的淡水养殖品种^[3]。克氏原螯虾的生存环境中存在多种能导致个体死亡并影响群体的病原体^[4-5]。副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)能引发虾类的急性肝胰腺坏死症, 导致克氏原螯虾的肝胰腺上皮细胞萎缩、坏死和脱落, 进而造成肝胰腺变薄和塌陷^[6], 威胁着克氏原螯虾的规模化养殖。因此, 认识克氏原螯虾的免疫能力, 研究其抵御副溶血弧菌的作用机制, 对实现克氏原螯虾的健康养殖有重要意义。

细胞免疫是虾蟹类动物应对病原入侵的重要防御机制, 主要依靠血淋巴细胞对外来异物的吞噬、凝集、包裹化、胞吐和形成结节等方式实现免疫应答过程^[7-9]。虾蟹类甲壳动物的血淋巴细胞可分为透明细胞(hyaline cells)、半颗粒细胞(semi-granular cells)和颗粒细胞(granular cells), 其中由透明细胞和半颗粒细胞介导的吞噬作用被认为是血淋巴细胞最重要的免疫防御机制^[10]。而吞噬作用与细胞膜的流动性有关^[11], 故推断细胞膜的生理状态变化可能调节了免疫细胞的免疫过程。

真核细胞骨架由微管(microtubule)、微丝(microfilament)及中间纤维(intermediate filament)组成, 是真核生物细胞中蛋白质之间搭建的网络

收稿日期: 2024-04-09; 修订日期: 2024-06-04.

基金项目: 天津市科技计划项目(22YFZCSN00200); 天津市海洋资源与化学重点实验室(天津科技大学)开放基金资助项目(202303).

作者简介: 杜国儒(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物信息学. E-mail: 21818020@mail.tust.edu.cn

通信作者: 隋丽英, 教授, 研究方向为卤水生态与生物资源利用. E-mail: suily@tust.edu.cn

结构体系^[12]。驱动蛋白是基于微管的运动蛋白, 参与细胞运动、细胞器的胞内运输以及细胞骨架重塑等过程^[13]。目前, 共发现有 14 种驱动蛋白超家族(kinesin family, KIF)^[14], 这些驱动蛋白通过调节微管动态^[15]和胞质分裂^[16]来调控机体免疫能力。Belabed 等^[17]研究表明, 异常表达的 kinesin-1 可以通过调节小鼠的树突状细胞的交叉呈递降低其抗肿瘤能力; 黄飞翔等^[18]和李涛等^[19]证明 *KIF18B* 和 *KIF14* 的表达与细胞的增殖和抗凋亡能力成正相关。另有研究推测细胞骨架蛋白驱动了神经元等细胞形状的高可塑性^[20], 以及驱动蛋白可以向细胞膜运输蛋白质等物质, 还具有和肌动蛋白相似的功能, 即影响细胞膜的张力和形态改变等^[21]。上述结果表明 *KIFs* 基因的异常表达不仅可影响机体免疫力, 还会影响细胞膜的功能, 进而影响机体对致病菌的耐受能力。

但在水生动物中对 *KIFs* 基因的研究较少, 仅在海水产鱼类褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)中被报道。研究发现 microRNA pol-miR-140-3p 的下调能诱导褐牙鲈 *KIF5A* 的表达, 以对抗副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*)感染, 证明在褐牙鲈中驱动蛋白也与机体免疫和抵抗病原感染有关^[22]。因此探究 *KIFs* 基因在克氏原螯虾先天免疫中的作用并明确其分子机制, 对免疫促进剂的开发和克氏原螯虾的健康养殖具有参考意义。

课题组前期将免疫促进剂 3-羟基丁酸(3-hydroxybutyrate, 3-HB)与克氏原螯虾分别共培养 0、3、6、12 和 24 h, 获得血淋巴细胞并进行 RNA 测序, 通过转录组数据分析获得了 5 个差异表达的细胞骨架基因^[23]。为探究其在先天免疫中的作用, 本研究对这 5 个细胞骨架基因进行生物信息学分析、组织分布分析和功能验证, 旨在初步阐明克氏原螯虾细胞骨架基因在细胞免疫中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及数据来源

克氏原螯虾购于农贸市场, 平均体重(23.53 ± 1.75) g, 平均体长(9.21 ± 0.50) cm。将挑选的健康克氏原螯虾置于 16~18 °C 养殖箱中, 喷水使之保

持湿润, 每天投喂 1 次, 暂养 1 周。

课题组前期已获得 3-HB 与克氏原螯虾共培养后的 RNA 数据, 并通过差异表达分析和富集分析, 获得了 5 个细胞骨架基因(Cluster-32372.74405、Cluster-32372.26862、Cluster-32372.109731、Cluster-32372.71950 和 Cluster-32372.87767)可能在 3-HB 调控的免疫过程中发挥作用^[23], 并开展如下研究。

1.2 细胞骨架基因生物信息学分析

1.2.1 细胞骨架基因氨基酸序列属性分析 使用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)在线工具对相关基因的理化性质及氨基酸组成进行分析。通过 SOPMA 在线程序(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对 5 个基因的二级结构进行预测, 利用网站 SMART (http://smart.embl.de/smart/set_mode.cgi?NORMA_L=1)预测基因的结构域。

1.2.2 细胞骨架基因序列比对及系统进化树构建 通过 NCBI 的 blastp 子程序下载以上 5 个基因的同源序列, 并利用 DNAMAN (v6)进行序列保守性比对, 再以 MEGA 10.2 软件采用邻接法(neighbor joining, NJ)构建系统发育树。参数设置: 替换模型设置为“Poisson model”, 缺口设置为“Pairwise deletion”, 校验参数设置为 bootstrap method=1000。并将在线工具 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>)统计分析获得的蛋白序列的保守性基序(基序数量上限为 10, 其他值均为默认值)和利用 NCBI 子程序 Batch CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)获得的保守结构域通过 TBtools-II 1.1.20 进行可视化。

1.3 基因组织分布

随机选取 15 尾健康的克氏原螯虾个体, 分别收集血淋巴细胞、肠道、肝胰腺、鳃、造血组织、肌肉及眼柄等组织, 以 5 个个体的相同组织作为 1 个混池。提取各组织总 RNA, 反转录后, 利用 qRT-PCR 检测相关基因在各个组织中的表达水平^[23]。

1.4 RNAi 实验

利用 Primer Premier 5.0 软件设计合成 *KIF11*、*KIF20*、*KIF23* 基因和增强绿色荧光蛋白(*EGFP*)基因的 dsRNA 引物(表 1), 采用文献报道的方法合成相应 dsRNA^[24]。分别设置对照组(*EGFP*

表 1 dsRNA 引物序列
Tab. 1 dsRNA primer sequence

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
dsEGFP-F	taatacgactcactatagggCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
dsEGFP-R	taatacgactcactatagggAGTTCACCTTGATGCCGTTCTT
dsKIF11-F	taatacgactcactatagggATTCTCTCAGCCTCCATT
dsKIF11-R	taatacgactcactatagggGTGCCAGCCACATTTACC
dsKIF20-F	taatacgactcactatagggAGCGTGGAGACTGTTAGA
dsKIF20-R	taatacgactcactatagggTTAGGAGGTTGAATAGAGC
dsKIF23-F	taatacgactcactatagggCAGTGTGAATCGGATGCT
dsKIF23-R	taatacgactcactatagggGCCAAGTCCACCAATGAA

dsRNA)和实验组(*KIF11*、*KIF20*、*KIF23* dsRNA), 每组 5 尾克氏原螯虾。用 CPBS 将 dsEGFP、dsKIF11、dsKIF20、dsKIF23 的浓度分别调整为 0.05、0.10、0.20 μg/g 体重剂量。随后将 dsRNA 溶液从第 2 腹节左侧腹面注入克氏原螯虾体内, 每尾虾注射 100 μL 后置于培养箱中暂养。注射 dsRNA 后每隔 12 h 从第 2 腹节抽取血淋巴液, 直至 72 h。离心收集血淋巴细胞提取 RNA, 应用 qRT-PCR 检测最佳干扰剂量与作用时效。并收集培养以 0.10 μg/g 体重剂量干扰克氏原螯虾后的血淋巴细胞, 用于吞噬率检测。

1.5 细菌培养及 FITC 标记

副溶血弧菌来源于自然资源部第三海洋研究所。使副溶血弧菌在含有酵母提取物 1.0 g/L、蛋白胨 5.0 g/L、牛肉膏 1.0 g/L 和 30 盐度稀释卤水 (pH 7.4~7.6) 的 2216E 培养基中以 28 ℃、150 r/min 培养至对数期。

收集 5 mL 对数期副溶血弧菌培养物, 并在 12000 g、4 ℃下离心 5 min (Eppendorf 5424R, Germany)。用 PBS 将细胞颗粒重悬浮并洗涤 3 次。用 DMSO 将 FITC 染液浓度调节成 5 mg/mL, 按照菌液 : FITC 混合液=25 : 1 的体积比混匀溶液, 避光孵育 24 h 后, 12000 g 离心 5 min, 弃上清。以 PBS 重悬并洗涤 5 次。

1.6 血淋巴细胞培养及 Hoechst 33342 标记

以 75%乙醇清洗消毒克氏原螯虾体表, 用 5 mL 无菌注射器以血淋巴与抗凝剂 2 : 3 的体积比吸取预冷柠檬酸 EDTA 抗凝剂后从第 2 腹节采集克氏原螯虾血淋巴, 立即在 1000 g、4 ℃下离心 5 min。弃上清后, 用 L-15 培养基(11415114, Life Technologies

Europe, USA)将血淋巴细胞颗粒重悬浮并调整密度至 10⁶ CFU/mL, 将培养基放置于 24 孔板上, 在 22 ℃下培养。将 Hoechst 按 1 μg/mL 剂量添加到贴壁生长的细胞中, 避光孵育 15 min 后用 L-15 培养基洗涤 3 次, 倒置荧光显微镜(Nikon, Japan)下观察被染色的血淋巴细胞。

1.7 基因功能验证

以最佳干扰剂量的 dsKIF11、dsKIF20、dsKIF23 及相应剂量的 dsEGFP 对克氏原螯虾进行体内注射, 48 h 后收集并培养血淋巴细胞, 待细胞爬片 (Thermo Fisher)生长后, 按照血淋巴细胞 : 副溶血弧菌/荧光微球=10 : 1 的体积比加入 FITC 标记的副溶血弧菌或 0.5 μm 荧光微球(fluorescent microsphere, Polysciences, USA)并充分混匀, 避光孵育 2 h 后清洗 3 次以去除未被吞噬的副溶血弧菌或荧光微球, 随后向贴壁生长的血淋巴细胞中加入 1 μg/mL Hoechst 以标记血淋巴细胞细胞核, 避光孵育 15 min 后用 L-15 培养基清洗 3 次以洗净染剂, 倒置荧光显微镜下观察并拍照、统计各组血淋巴细胞吞噬率, 每组血淋巴细胞选取 5 个视野进行统计, 每个视野下细胞数不少于 100。

1.8 数据处理

本研究采用 2^{-ΔΔC_t} 计算目的基因的 mRNA 表达水平。数据采用单因素方差分析(ANOVA), 采用 Levene 检验和 Duncan 多重比较检验。P<0.05 表示差异显著, P<0.01 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 细胞骨架相关基因的理化性质

5 个细胞骨架基因中, 4 个(Cluster-32372.74405、

Cluster-32372.26862、Cluster-32372.109731、Cluster-32372.71950)被注释为 *KIFs* 相关基因; 另一个基因(Cluster-32372.87767)被注释为螺旋-环-螺旋(helix loop helix)亮氨酸拉链转录因子 MiT 家族的转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB)。各基因编码蛋白注释信息、氨基酸数目及等电点见

表 2。氨基酸类型分析结果表明, 5 个基因中谷氨酸(Glu)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、丝氨酸(Ser)含量较高(图 1 a)。蛋白质二级结构分析结果显示, 5 个基因的结构相似, 主要由 α -螺旋、 β -折叠、无规则卷曲和延伸链构成, 且 α -螺旋和无规则卷曲是蛋白质二级结构的主要组成部分(图 1b)。

表 2 克氏原螯虾细胞骨架基因相关蛋白信息
Tab. 2 Cytoskeleton gene-related proteins information in *Procambarus clarkii*

基因编号 gene number	注释信息 annotation	氨基酸数目 number of amino acids	等电点 isoelectric point
Cluster-32372.26862	<i>KIF23</i>	874	9.16
Cluster-32372.74405	<i>KIF11</i>	1120	6.08
Cluster-32372.109731	<i>KIF20</i>	1866	5.35
Cluster-32372.71950	kinesin-like protein	3189	5.15
Cluster-32372.87767	TFEB	550	5.51

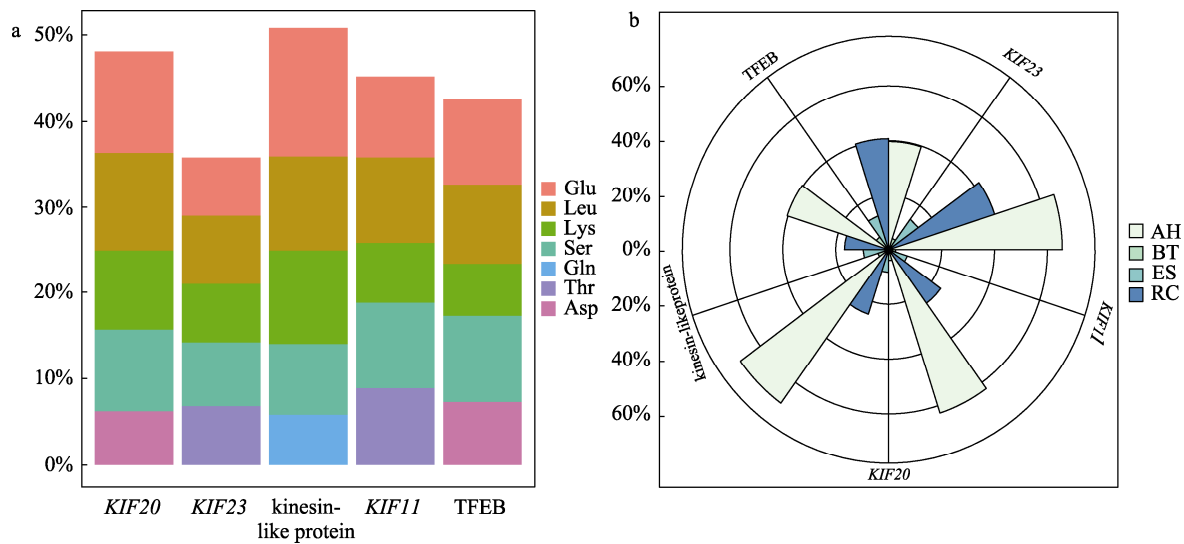


图 1 克氏原螯虾 5 个细胞骨架基因的理化性质
a. 主要编码氨基酸含量; b. 二级结构预测。

Fig. 1 Physicochemical properties of five cytoskeletal genes in *Procambarus clarkii*
a. Main coded amino acid content; b. Secondary protein structure prediction.

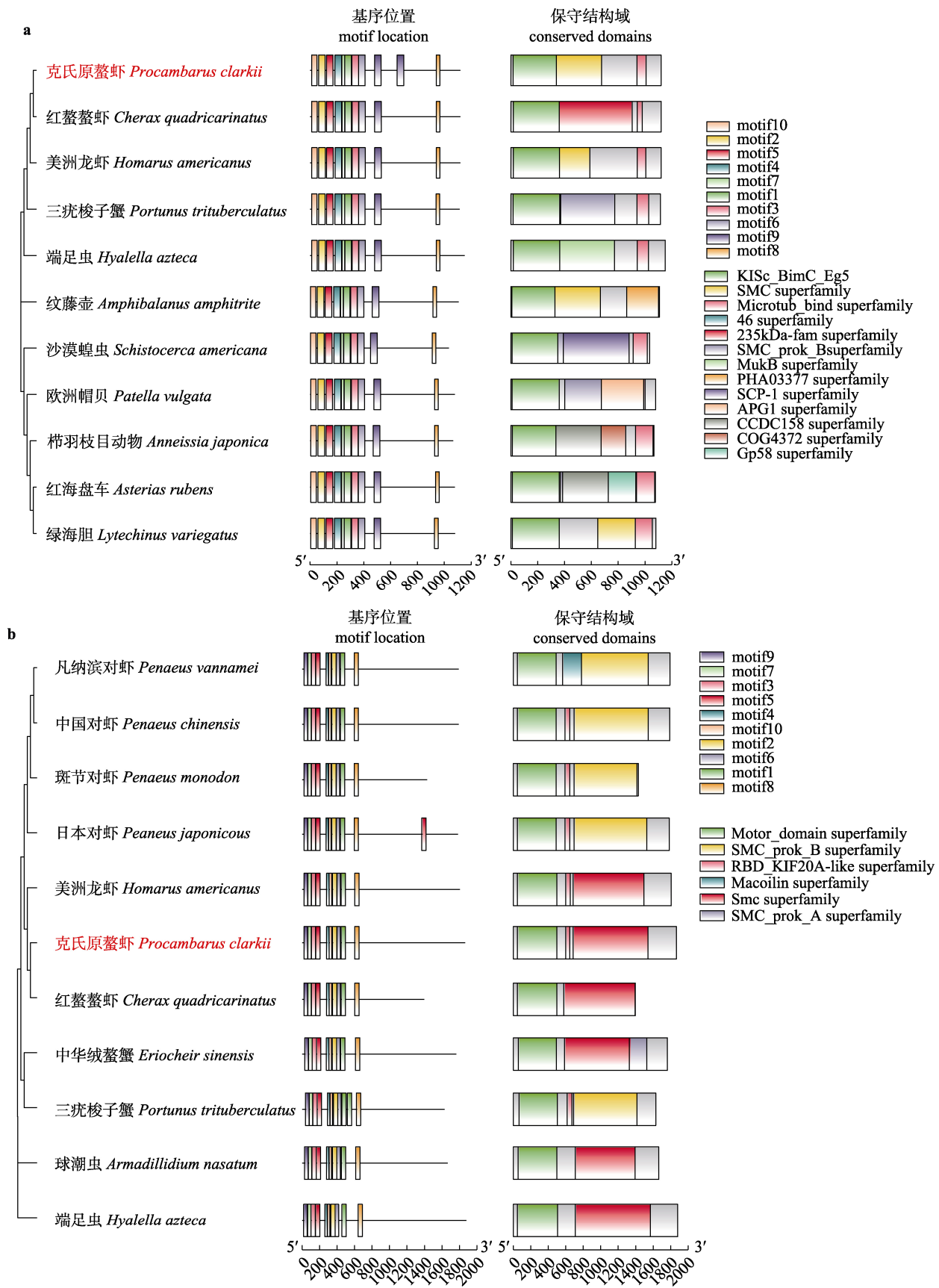
2.2 *KIFs* 基因同源性分析

蛋白结构域预测结果显示, *KIF23* (Cluster-32372.26862)、*KIF11* (Cluster-32372.74405)、*KIF20* (Cluster-32372.109731)和 kinesin-like protein (Cluster-32372.71950)均含有 1 个 KISc 结构域(附图 1)。利用 DNAMAN 软件对 5 个细胞骨架基因与其他 10 个物种对应基因的氨基酸组成进行比对, 发现 *KIF23*、*KIF20*、*KIF11* 这 3 组基因在 10 个物种中的同源性分别为 67.42%、48.22%和 46.61%; 而 TFEB 与 kinesin-like protein 在 10 个物种中的同源性仅为 36.21%与 21.70%。*KIF11* 氨基酸序列与红

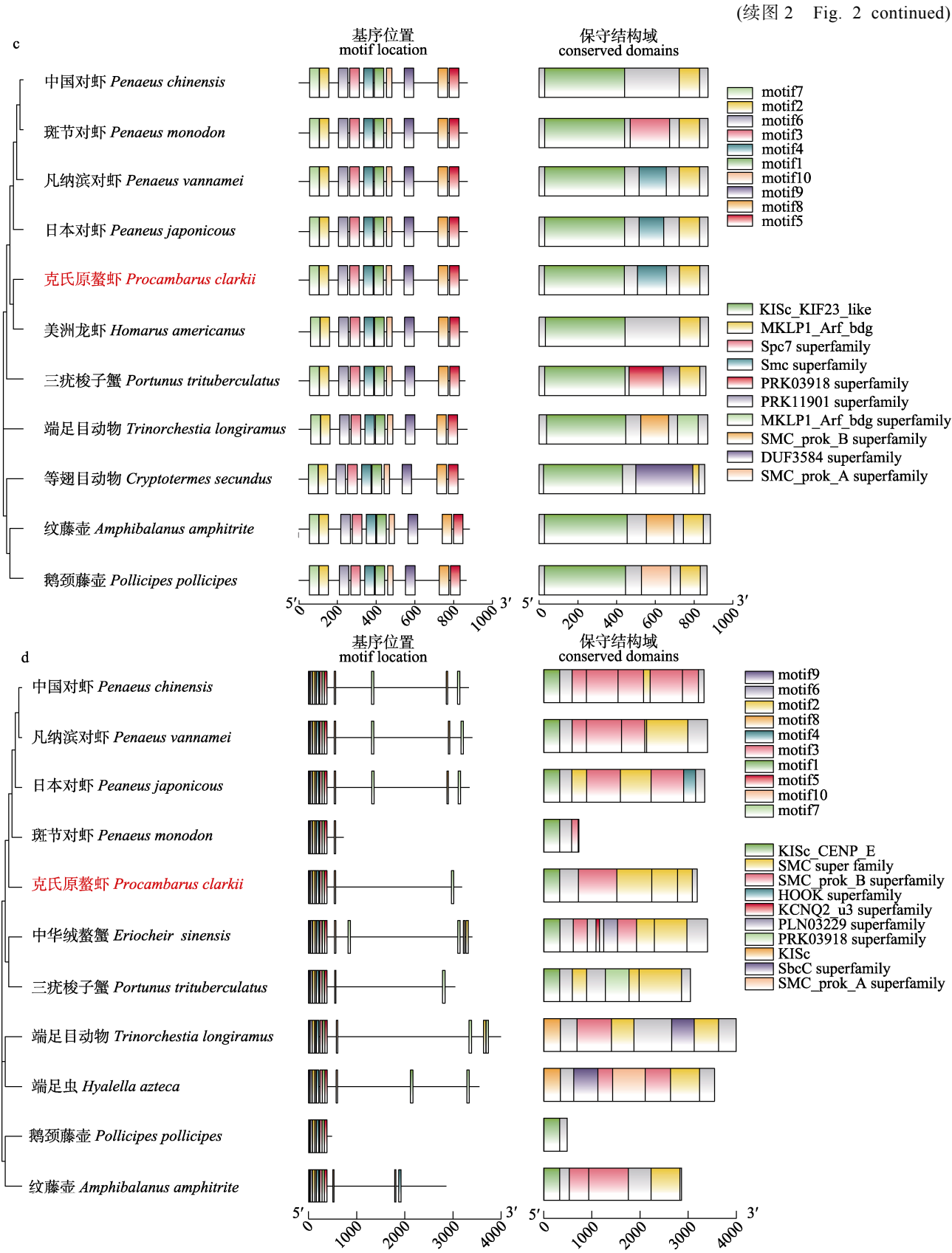
螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)的同源性更高, 同源性为 75.40%; *KIF23*、*KIF20* 和 TFEB 的氨基酸序列与美洲龙虾(*Homarus americanus*)的同源性更高, 分别为 77.13%、59.77%和 55.52%; kinesin-like protein 与日本对虾(*Penaeus japonicus*)的同源性最高, 为 36.46% (附图 2)。

2.3 *KIFs* 基因系统发育分析

利用 MEGA 10.0 对 5 个细胞骨架基因及同源性最高的 10 个物种的氨基酸序列应用邻接法建立系统发育树, 并通过 TBtools 软件将其与预测的 motif 及保守结构域分析结果相结合(图 2)。克



(待续 to be continued)



(待续 to be continued)

(续图 2 Fig. 2 continued)

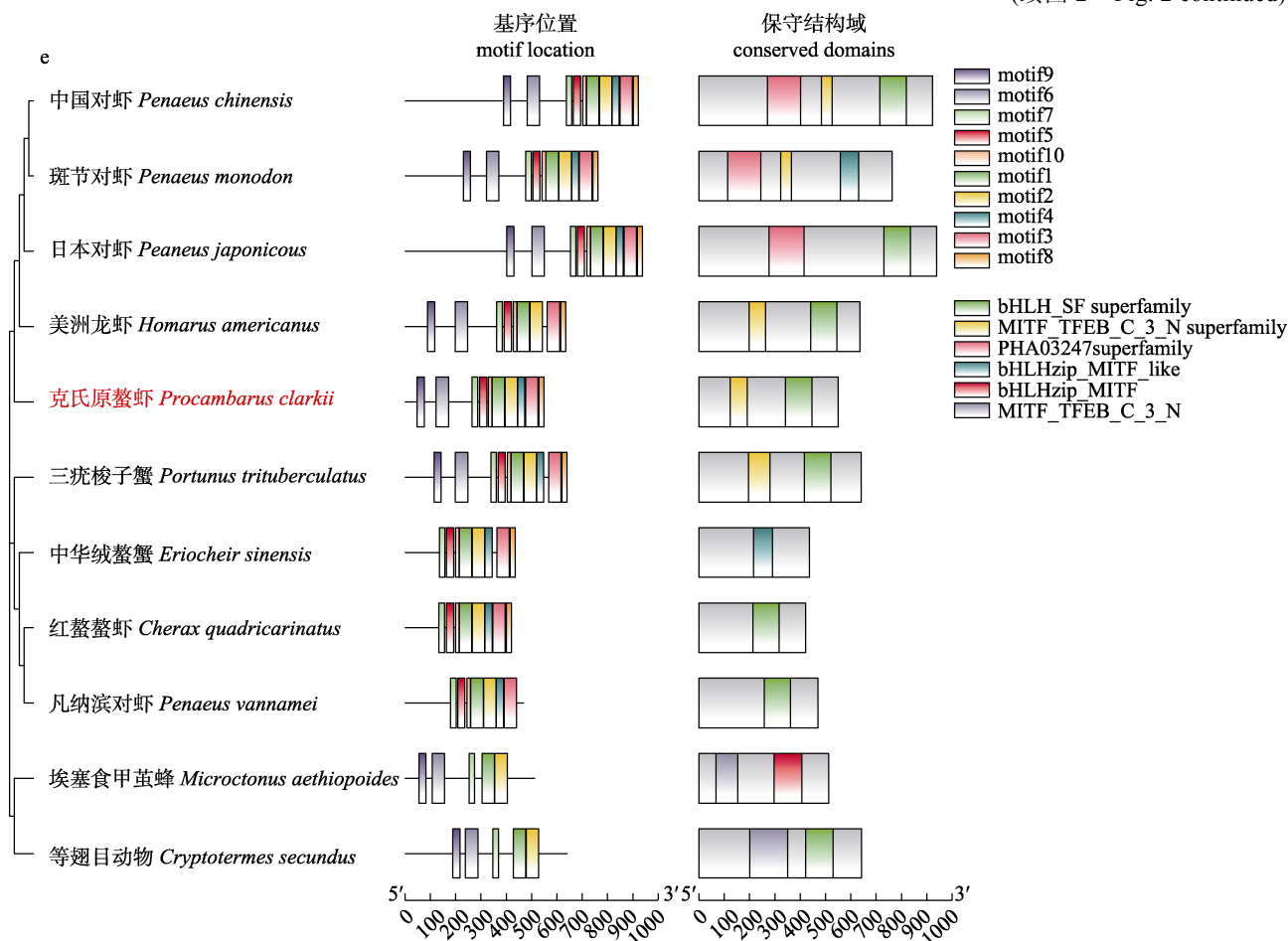


图 2 克氏原螯虾 5 个细胞骨架基因的系统发育分析

a. *KIF11*; b. *KIF20*; c. *KIF23*; d. Kinesin-like protein; e. TFEB.Fig. 2 Phylogenetic analysis of five cytoskeleton genes in *Procambarus clarkii*a. *KIF11*; b. *KIF20*; c. *KIF23*; d. Kinesin-like protein; e. TFEB.

氏原螯虾 *KIF11* 与 *KIF20* 均与红螯螯虾 *KIF11* 和 *KIF20* 聚为一支, 克氏原螯虾 *KIF23* 与美洲龙虾 *KIF23* 聚为一支, 而克氏原螯虾 kinesin-like protein 与 TFEB 则与中国明对虾 (*Penaeus chinensis*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 及美洲龙虾聚为一簇。通过 MEME 在线工具对以上 3 组序列进行保守型基序预测, 共鉴定 10 个不同的保守基序, 除 *KIF11* 组及 *KIF20* 组的 1 个同源基因外, 3 组 *KIFs* 基因含有相同的 motif 数量, 保守结构域的位置和种类差异较小, 相对保守, kinesin-like protein 和 TFEB 两组基因 motif 的数量有部分差异, 且保守结构域的位置和种类差异较大。

2.4 细胞骨架相关基因的组织分布

克氏原螯虾各组织中细胞骨架相关基因的表达水平分析结果显示, *KIF23*、kinesin-like protein 和 *KIF20* 在造血组织中表达量最高 ($P < 0.05$); *KIF11* 和 TFEB 在鳃、造血组织中的表达量最高 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.5 *KIFs* 基因最佳敲降剂量及作用时效探究

分组对克氏原螯虾注射 dsRNA, 48 h 后抽取血淋巴液, 离心收集血淋巴细胞并提取 RNA, 反转录后检测基因表达水平。结果显示, 0.05~0.20 $\mu\text{g/g}$ 体重剂量的 ds*KIF11*、ds*KIF20* 和 ds*KIF23* 均可极显著敲降 *KIF11*、*KIF20* 和 *KIF23* 的表达 ($P < 0.01$)。与对照组相比, ds*KIF11* 的最佳干扰剂量为 0.10 $\mu\text{g/g}$

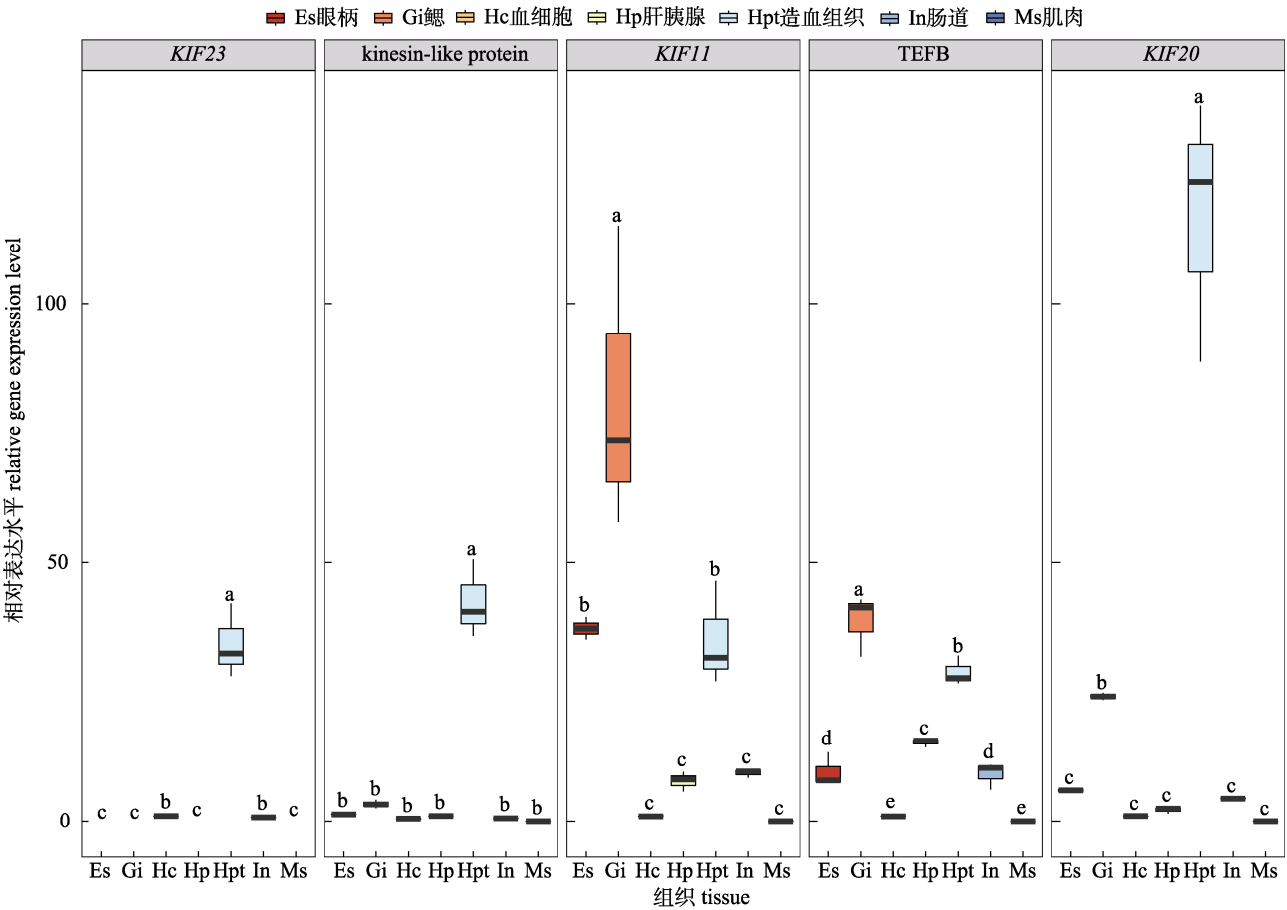


图 3 5 个细胞骨架基因在克氏原螯虾中的组织表达分析
同一基因不同字母表示组织间存在显著差异($P < 0.05$).
Fig. 3 Tissue distribution of five cytoskeleton genes in *Procambarus clarkii*
Different letters on the same gene indicate significant differences between tissues ($P < 0.05$).

体重剂量, 可将 *KIF11* 表达量敲降至 8.01% ($P < 0.01$); ds*KIF20* 和 ds*KIF23* 的最佳干扰剂量均为 0.05 $\mu\text{g/g}$ 体重剂量, 可分别将 *KIF20* 和 *KIF23* 表达量敲降至 30.45% 和 18.07% ($P < 0.01$)(图 4)。

对克氏原螯虾注射 0.10 $\mu\text{g/g}$ 体重剂量的 ds*KIF11* 及 dsEGFP 后, 每隔 12 h 取螯虾血淋巴细胞直至 72 h, 提取 RNA 并反转录检测 *KIF11* 表达水平。结果显示, 0.10 $\mu\text{g/g}$ 体重剂量的 ds*KIF11* 从 48 h 起显著敲降 *KIF11* 表达($P < 0.05$), 且可持续至 72 h。注射 ds*KIF11* 12~72 h 后 *KIF11* 表达水平分别为相应时间点注射 dsEGFP 组的 213.01%、94.30%、88.58%、6.12% ($P < 0.05$)、11.31% ($P < 0.05$) 和 17.97% ($P < 0.05$)(图 5)。

2.6 *KIFs* 基因的敲降显著降低血淋巴细胞的吞噬作用

在倒置荧光显微镜下分别在激发光波长为

346、495 及 535 nm 观察到 FITC 标记的副溶血弧菌显现绿色、荧光微球显现红色、Hoechst 33342 标记的细胞核显现蓝色(图 6)。蓝色的细胞核周围环抱着绿色副溶血弧菌和红色荧光微球, 说明细胞核对外源入侵物质正在进行或已经吞噬。

吞噬率统计结果显示, 注射 dsRNA 48 h 后 dsEGFP 组克氏原螯虾血淋巴细胞对副溶血弧菌和荧光微球的吞噬率分别为 $(16.96 \pm 1.08)\%$ 和 $(22.46 \pm 2.18)\%$ (图 7); ds*KIF11* 组血淋巴细胞对副溶血弧菌和荧光微球的吞噬率分别为 $(10.81 \pm 1.66)\%$ 和 $(13.04 \pm 1.31)\%$, 均极显著低于 dsEGFP 组($P < 0.01$); ds*KIF20* 组血淋巴细胞对副溶血弧菌和荧光微球的吞噬率分别为 $(14.61 \pm 0.65)\%$ 和 $(18.09 \pm 0.74)\%$, 其中对荧光微球的吞噬率显著低于 dsEGFP 组($P < 0.05$); ds*KIF23* 组血淋巴细胞对副

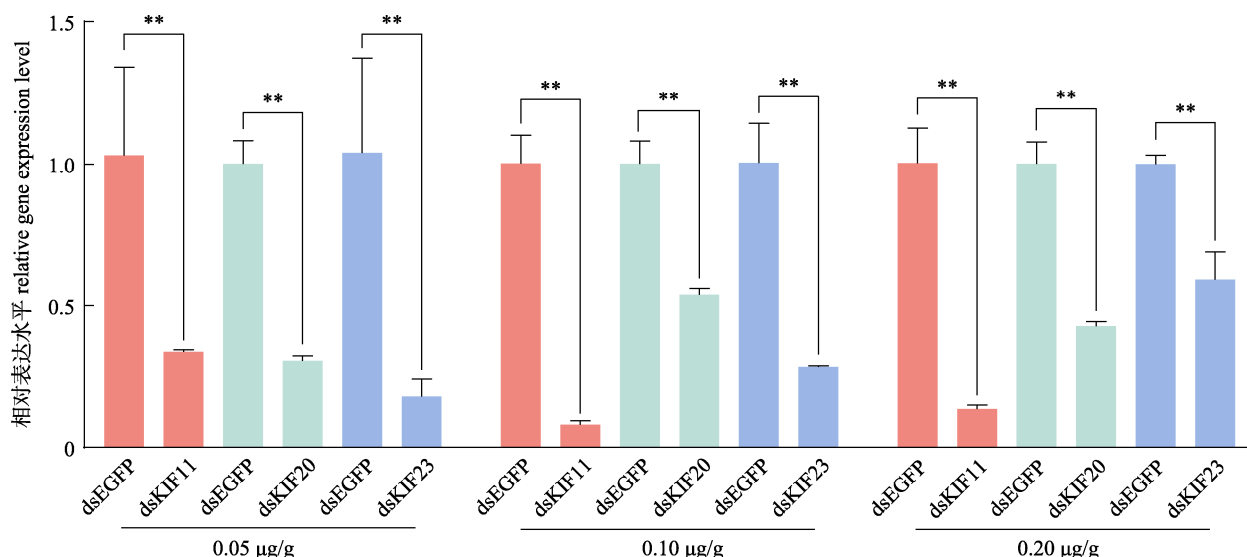


图 4 克氏原螯虾 *KIF11*、*KIF20* 及 *KIF23* 基因的最佳敲降剂量探究

**表示差异极显著($P < 0.01$).

Fig. 4 Investigation of the optimal knockdown dose of *KIF11*, *KIF20* and *KIF23* genes in *Procamburus clarkii*

** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

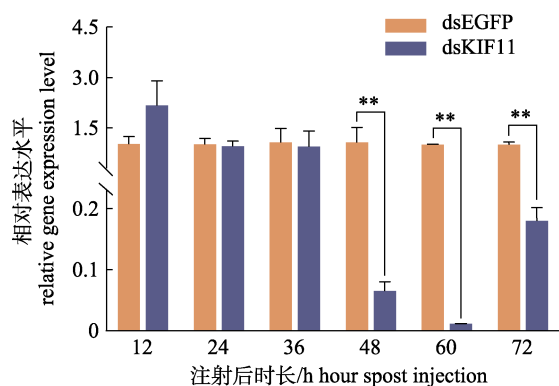


图 5 注射 0.10 µg/g 体重剂量 dsKIF11 后 12、24、36、48、60 和 72 h 时克氏原螯虾 *KIF11* 的相对表达水平

**表示差异极显著($P < 0.01$).

Fig. 5 Relative expression levels of *KIF11* after injection of 0.10 µg/g body weight dose of dsKIF11 in *Procamburus clarkii* at 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h

** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

溶血弧菌和荧光微球的吞噬率分别为 $(12.66 \pm 1.20)\%$ 和 $(16.37 \pm 1.68)\%$, 均显著低于 dsEGFP 组 ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 *KIFs* 基因具有较高保守性

本研究在 5 个克氏原螯虾血淋巴细胞的细胞骨架基因中发现了 4 个 *KIFs* 基因, 其中谷氨酸和亮氨酸是最丰富的氨基酸种类, α -螺旋和 β -折叠

是构成该蛋白二级结构的主要成分。这一结果与其他 *KIFs* 基因相关研究结果相似, 即 α -螺旋和 β -折叠是组成驱动蛋白马达结构域的主要二级结构^[25], 且马达结构域中包含着氨基酸结合位点和微管结合位点, 其中至少有 35% 氨基酸序列相同^[26]。系统进化树结果显示, 所鉴定的 4 个 *KIFs* 基因均与虾、蟹等动物聚为一簇, 而与昆虫和端足动物门的动物遗传距离较远, 表明这些基因的进化与动物进化过程基本一致。*KIF11*、*KIF20* 和 *KIF23* 基因与 kinesin-like protein 不同, 所含的保守基序数量较为一致, 保守结构域的位置和种类较为相似。研究结果进一步证明了 *KIFs* 基因的同源性, 推测高度同源的氨基酸组成及相对保守的结构域是 *KIFs* 基因行使分子马达功能的基础^[27-28], 最终通过影响细胞迁移来调控机体的免疫能力。

3.2 *KIFs* 基因的组织分布及敲降后对血淋巴细胞吞噬作用的影响

本研究中, 克氏原螯虾血淋巴细胞 5 个细胞骨架基因在克氏原螯虾的多个组织中均有表达, 这可能与细胞骨架基因参与细胞分裂、减数分裂纺锤体的组装和胞内运输等功能相关^[29]。*KIFs* 基因在造血组织中的表达水平相对较高, 这一表达特征与日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的 C

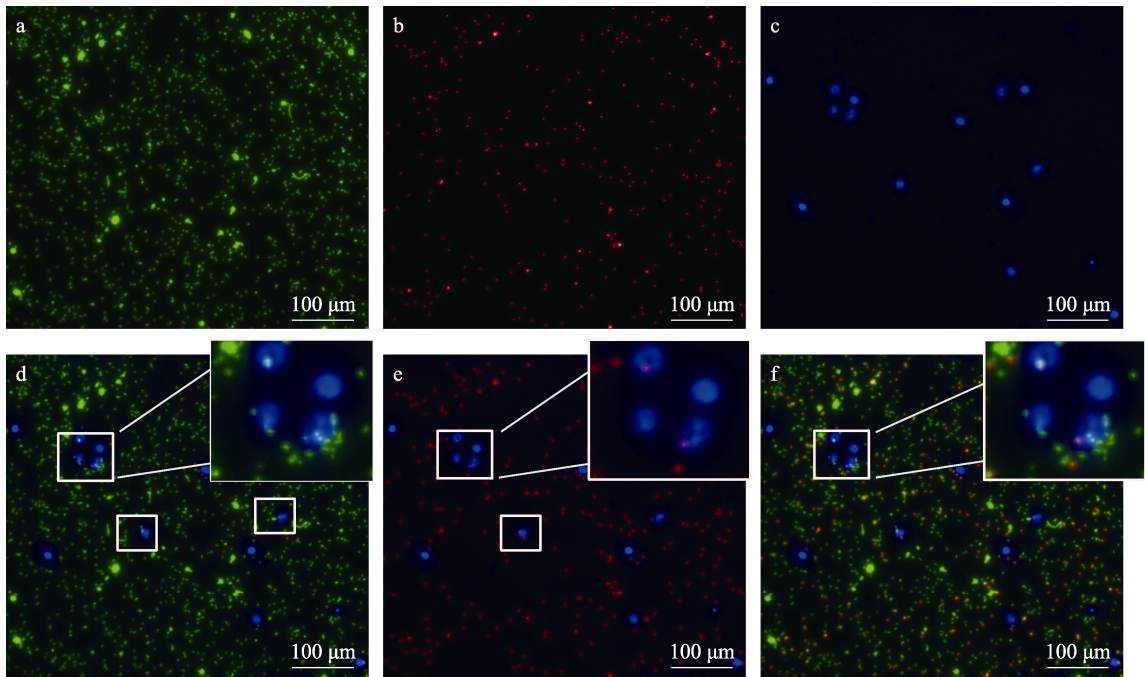


图 6 荧光显微镜下克氏原螯虾血淋巴细胞吞噬副溶血弧菌及荧光微球

a. 副溶血弧菌; b. 荧光微球; c. 血淋巴细胞; d.副溶血弧菌与血淋巴细胞, 白色方框指示位置为吞噬副溶血弧菌的血淋巴细胞; e. 荧光微球与血淋巴细胞, 白色方框指示位置为吞噬荧光微球的血淋巴细胞; f. 副溶血弧菌、荧光微球与血淋巴细胞, 白色方框指示位置为同时吞噬副溶血弧菌及荧光微球的血淋巴细胞。

Fig. 6 Phagocytosis of *Vibrio parahaemolyticus* and fluorescent microspheres by *Procambarus clarkii* hemocytes observed under fluorescence microscopy

a. *Vibrio parahaemolyticus*; b. Fluorescent microspheres; c. Hemocytes; d. *V. parahaemolyticus* and hemocytes, the white box indicates phagocytosis of *V. parahaemolyticus*; e. Fluorescent microspheres and hemocytes, the white box indicates the phagocytosis of fluorescent microspheres; f. *V. parahaemolyticus*, fluorescent microspheres and hemocytes, the white box indicates phagocytosis of fluorescent microspheres and *V. parahaemolyticus*.

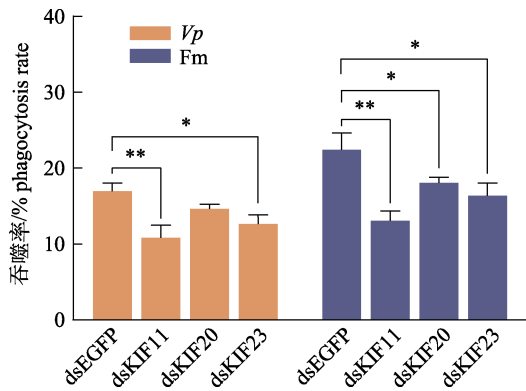


图 7 克氏原螯虾 *KIFs* 基因敲降后血淋巴细胞对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, *Vp*)及荧光微球 (fluorescent microspheres, *Fm*)的吞噬率

*表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$).

Fig. 7 Phagocytosis of *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*) and fluorescent microspheres (*Fm*) by hemocytes after *KIFs* gene knockdown in *Procambarus clarkii*

* indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

型凝集素结构域家族 3 基因(*Mnlec3*)的表达模式相似, 该基因有益于甲壳动物对病原识别及识别后的免疫反应^[30]。提示在免疫组织中, *KIFs* 基因可能与 *Mnlec3* 具有功能相关性, 即有益于调节克氏原螯虾抵抗病原菌的能力。

细胞免疫是甲壳动物抵御病原感染的主要方式之一, 血淋巴细胞可通过不同的吞噬方式清除外来病原^[31], 其吞噬能力也是衡量机体健康状况的重要指标^[32], 而体外培养的原代血淋巴细胞也常用于直接检测其吞噬能力。本研究发现, RNAi 技术显著降低了 3 个 *KIFs* 基因的表达, 干扰效率为 70%~90%, 其中 dsKIF11 的干扰效果最为明显, 敲降效率达到 91.99%。随着 *KIF11* 被敲降, 克氏原螯虾血淋巴细胞对副溶血弧菌和荧光微球的吞噬率分别降低了 36.26%和 41.94%, 提示 *KIF11* 通过保证血淋巴细胞的吞噬能力, 维持克氏原螯

的自身免疫。这与对 *SsClqDC* 基因的研究结果相似。该基因的敲降显著降低了毛蚶(*Scapharca subcrenata*)对副溶血弧菌的吞噬作用,导致毛蚶的血细胞凋亡数和个体死亡率显著升高^[33]。推测克氏原螯虾血淋巴细胞吞噬能力的下降与 *KIFs* 基因直接参与细胞的细胞骨架塑造等过程相关^[34]。细胞骨架对支撑细胞形态、维持细胞功能有重要意义^[35-36]。*KIFs* 基因与肌动蛋白基因是细胞骨架的重要组成部分,两者相互协作,以维持细胞结构正常的动态变化^[37]。且对肌动蛋白基因的敲降影响了细胞骨架对细胞膜张力和形态改变的调节作用^[21],推测 *KIFs* 基因的敲降亦能损伤细胞功能,降低血淋巴细胞对副溶血弧菌及荧光微球的吞噬能力。

参考文献:

- [1] Wei Q S. Discussion on the name of river (chela) shrimp[J]. Chinese Journal of Zoology, 1989, 24(6): 50-51. [魏青山. 关于河(螯)虾类名称的商榷[J]. 动物学杂志, 1989, 24(6): 50-51.]
- [2] Wang R. Nutrient health food function of red swamp crawfish *Procambarus clarkii* and the related food research and development[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2008, 35(1): 24-27. [王蕊. 克氏原螯虾的营养保健功能及相关食品的研究与开发[J]. 水产科技情报, 2008, 35(1): 24-27.]
- [3] Dong Y F, Li J T, Zhang X X, et al. A review: Research advances on seedling breeding of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(4): 68-74. [董扬帆, 李军涛, 张秀霞, 等. 克氏原螯虾繁殖生物学与苗种培育技术研究进展[J]. 水产学杂志, 2020, 33(4): 68-74.]
- [4] Longshaw M. Diseases of crayfish: A review[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, 106(1): 54-70.
- [5] Zhao J M, Tang X Q, Zhan W B. Interaction between WSSV envelope protein VP110 and binding proteins on the gills of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 10-18. [赵建梅, 唐小千, 战文斌. 对虾白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP110 在中国明对虾鳃细胞中结合蛋白的鉴定与特性[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 10-18.]
- [6] Zhou J, Zhao H, Huang Z P, et al. Differential transcriptomic analysis of crayfish (*Procambarus clarkii*) from a rice coculture system challenged by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2020, 36: 100741.
- [7] Wang Q Y, Li H, Zhou K M, et al. *Rab7* controls innate immunity by regulating phagocytosis and antimicrobial peptide expression in Chinese mitten crab[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 95: 259-267.
- [8] Li F, Chang X F, Xu L M, et al. Different roles of crayfish hemocytes in the uptake of foreign particles[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 77: 112-119.
- [9] Wu F L, Wang Y, Shang Y Y, et al. Current progress of research on classification and immunity of hemocytes in aquatic invertebrates: A review[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(6): 696-704. [吴芳丽, 王月, 尚跃勇, 等. 水生无脊椎动物血淋巴细胞分类及免疫研究进展[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(6): 696-704.]
- [10] Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. Aquaculture, 2000, 191(1-3): 45-52.
- [11] Noutsi P, Gratton E, Chaieb S. Assessment of membrane fluidity fluctuations during cellular development reveals time and cell type specificity[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0158313.
- [12] Dolati S, Kage F, Mueller J, et al. On the relation between filament density, force generation, and protrusion rate in mesenchymal cell motility[J]. Molecular Biology of the Cell, 2018, 29(22): 2674-2686.
- [13] Moujaber O, Stochaj U. The cytoskeleton as regulator of cell signaling pathways[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2020, 45(2): 96-107.
- [14] Lawrence C J, Dawe R K, Christie K R, et al. A standardized kinesin nomenclature[J]. The Journal of Cell Biology, 2004, 167(1): 19-22.
- [15] Daire V, Pöus C. Kinesins and protein Kinases: key players in the regulation of microtubule dynamics and organization[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011, 510(2): 83-92.
- [16] Liang Y J, Yang W X. Kinesins in MAPK cascade: How kinesin motors are involved in the MAPK pathway?[J]. Gene, 2019, 684: 1-9.
- [17] Belabed M, Mauvais F X, Maschalidi S, et al. Kinesin-1 regulates antigen cross-presentation through the scission of tubulations from early endosomes in dendritic cells[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1817.
- [18] Huang F X, Xiang T X, Ren G S. High expression of kinesin KIF18B in estrogen receptor-positive breast cancer enhances cell proliferation and apoptosis resistance and predicts poor prognosis[J]. Journal of Third Military Medical University, 2019, 41(18): 1738-1743. [黄飞翔, 向廷秀, 任国胜. 驱动蛋白 KIF18B 对 ER⁺乳腺癌细胞增殖、凋亡的影响及其临

- 床意义[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(18): 1738-1743.]
- [19] Li T, Zhang C, Yang Q Z. Mechanism of miR-186-5p targeting kinesin family member 14 to induce apoptosis of medulloblastoma Daoy cells[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2022, 38(15): 1782-1786. [李涛, 张翠, 杨清志. miR-186-5p 靶向驱动蛋白分子 14 诱导髓母细胞瘤 Daoy 细胞凋亡的机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(15): 1782-1786.]
- [20] Steward O, Wallace C S, Lyford G L, et al. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites[J]. Neuron, 1998, 21(4): 741-751.
- [21] Simon C, Caorsi V, Campillo C, et al. Interplay between membrane tension and the actin cytoskeleton determines shape changes[J]. Physical Biology, 2018, 15(6): 065004.
- [22] Park E G, Kim W R, Lee Y J, et al. Downregulated pol-miR-140-3p induces the expression of the kinesin family member 5A against *Streptococcus parauberis* infection in olive flounder[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 126: 178-186.
- [23] Duan H, Zuo J J, Pan N M, et al. 3-Hydroxybutyrate helps crayfish resistant to *Vibrio parahaemolyticus* infection in versatile ways[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 132: 108444.
- [24] Han X K, Ouyang X M, Li K, et al. Examination of the effects of Nanos gene knockdown on fecundity and reproductive modes in the brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*[J]. Aquaculture, 2023, 572: 739537.
- [25] Kull F J, Vale R D, Fletterick R J. The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins[J]. Journal of Muscle Research and Cell Motility, 1998, 19(8): 877-886.
- [26] Woehlke G, Schliwa M. Walking on two heads: The many talents of kinesin[J]. Nature Reviews: Molecular Cell Biology, 2000, 1(1): 50-58.
- [27] Huang X D, Liu F, Zhu C L, et al. Suppression of KIF3B expression inhibits human hepatocellular carcinoma proliferation[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2014, 59(4): 795-806.
- [28] Cheng B B, Yan L X, Huang B H, et al. Molecular regulation of chromosomal localization of kinesin KIF4A[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2023, 45(3): 436-442. [程蓓蓓, 闫鲁霞, 黄百海, 等. 驱动蛋白 KIF4A 染色体定位的调控机制[J]. 中国细胞生物学学报, 2023, 45(3): 436-442.]
- [29] Wang Q Y, Wang Y J, Zhu C J. Advances in the study of kinesin KIF14 in relation to mitosis and tumor[J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2023, 30(2): 167-172. [王秋宇, 王雅洁, 朱长军. 驱动蛋白 KIF14 与有丝分裂及肿瘤关系的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(2): 167-172.]
- [30] Sun S M, Fu H T, Xuan F J, et al. Molecular cloning, prokaryotic expression and localization analysis of C-type lectin 3 (MnLec3) cDNA from *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(11): 2317-2326. [孙盛明, 傅洪拓, 宣富君, 等. 日本沼虾 C 型凝集素结构域家族 3 的 cDNA 克隆、原核表达和定位分析[J]. 水产学报, 2019, 43(11): 2317-2326.]
- [31] Li F H, Xiang J H. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(4): 973-980.
- [32] Liu J, Zhai B, Xu T, et al. A functional analysis of the haemocyte phagocytosis of clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2024, 46(1): 90-97. [刘静, 翟冰, 徐涛, 等. 菲律宾蛤仔血细胞吞噬作用的功能分析[J]. 海洋湖沼通报, 2024, 46(1): 90-97.]
- [33] Peng Q, Wang J J, Wang C D, et al. A novel C1q domain-containing gene (*SsC1qDC*) from *Scapharca subcrenata* participates in the immune defense against pathogen infection[J]. Marine Sciences, 2023, 47(9): 40-52. [彭强, 王进京, 王春德, 等. *SsC1qDC* 基因在毛蚶免疫防御中的作用[J]. 海洋科学, 2023, 47(9): 40-52.]
- [34] Moujaber O, Stochaj U. The cytoskeleton as regulator of cell signaling pathways[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2020, 45(2): 96-107.
- [35] Miano J M, Fisher E A, Majesky M W. Fate and state of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. Circulation, 2021, 143(21): 2110-2116.
- [36] Sorokin V, Vickneson K, Kofidis T, et al. Role of vascular smooth muscle cell plasticity and interactions in vessel wall inflammation[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 599415.
- [37] Howard J. Molecular motors: Structural adaptations to cellular functions[J]. Nature, 1997, 389: 561-567.

Kinesin-related genes regulate phagocytosis in *Procambarus clarkii* hemocytes

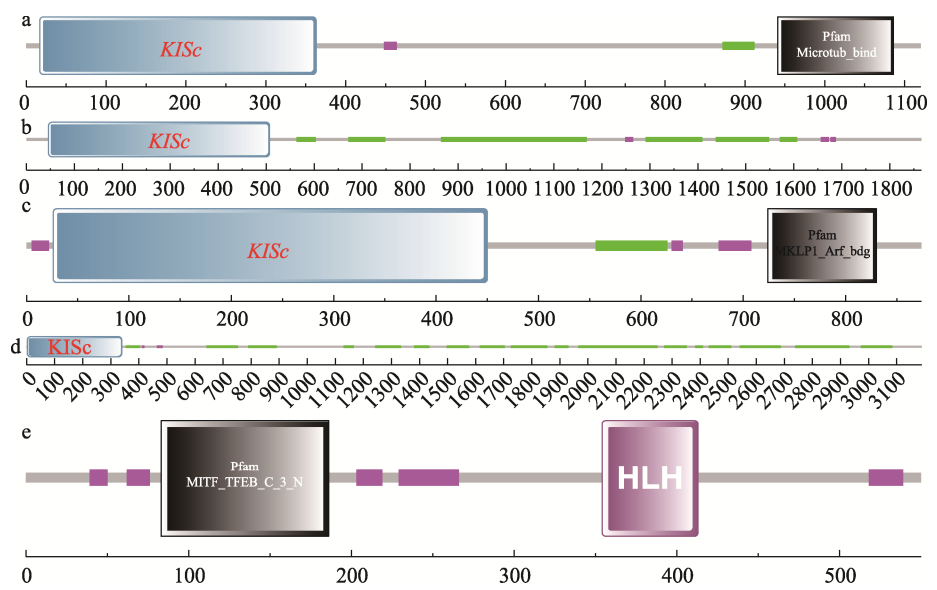
DU Guoru¹, XIE Wei¹, ZUO Jiajun², LIU Wei¹, WANG Xuehui³, SUI Liying¹

1. Key Laboratory of Marine Resource Chemistry and Food Technology (TUST), Ministry of Education; Asian Regional Artemia Reference Center; Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry; College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;
3. Tianjin Fisheries Research Institute, Tianjin 300221, China

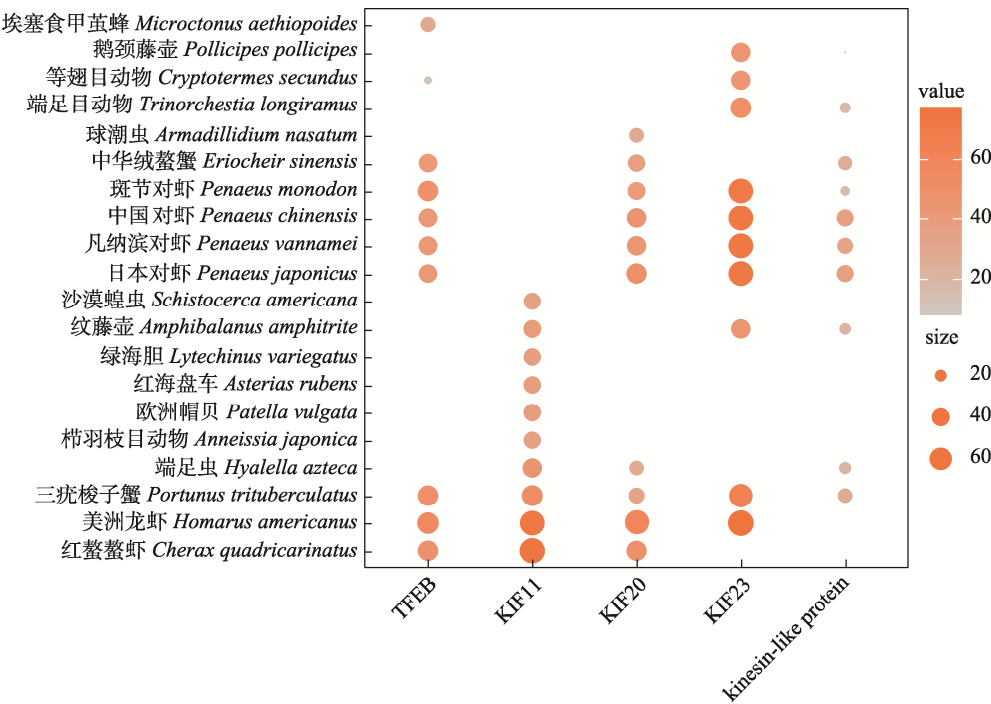
Abstract: *Procambarus clarkii* is an economically important aquaculture species in China, and pathogens, especially *Vibrio parahaemolyticus*, have caused significant economic losses in large-scale farming. However, the mechanism of the immune system response to pathogen invasion remains unclear. To delve into the molecular mechanisms behind the immune regulation of the *Procambarus clarkii*, this study analyzed the transcriptome data of its hemocytes that had been co-cultured with 3-hydroxybutyrate. By analyzing the transcriptome data of hemocytes from *P. clarkii* co-cultured with 3-hydroxybutyrate, significant differential expression of cytoskeleton genes was observed, suggesting a potential association with immune regulation in *P. clarkii*. This study annotated and classified cytoskeleton genes and validated their impact on cellular immune regulation. The annotation results showed that out of five cytoskeleton genes, four belonged to the kinesin family (KIF). All contained KISc domains, and they encoded amino acids primarily composed of glutamate and leucine. The secondary protein structure was mainly composed of α -helices. The genes encoding KIFs were generally similar across species, except for variations in the number, type of conserved motifs, and gene structure among kinesin-like-protein genes in different species. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction results showed that the expression levels of KIFs were higher in the hemopoietic tissues and gills of *P. clarkii* than in tissues such as eyestalks and muscles ($P < 0.05$). RNA interference results demonstrated that the optimal knockdown effect was achieved with a dose of 0.10 $\mu\text{g/g}$ body weight of dsKIF11, reducing the expression level of *KIF11* to 8.01% of its normal level ($P < 0.05$). Moreover, compared to the control group, after the knockdown of the *KIF11* gene, the phagocytic rates of hemocytes towards green-fluorescence-labeled *V. parahaemolyticus* and red fluorescent microspheres decreased by 36.26% ($P < 0.01$) and 41.94% ($P < 0.01$), respectively. The abovementioned results indicate that KIFs exhibit high conservation and are involved in the phagocytic activity of hemocytes. This finding provides a basis for further investigation of the function and mechanism of KIFs in innate immunity.

Key words: *Procambarus clarkii*; hemocyte; kinesin; phagocytosis; immune

Corresponding author: SUI Liying. E-mail: suily@tust.edu.cn



附图 1 克氏原螯虾细胞骨架基因编码蛋白的保守结构域
a. *KIF11*; b. *KIF20*; c. *KIF23*; d. kinesin-like protein; e. TFEB.
Appendix 1 Conserved structural domains of cytoskeletal gene encoding protein in *Procambarus clarkii*
a. *KIF11*; b. *KIF20*; c. *KIF23*; d. kinesin-like protein; e. TFEB.



附图 2 克氏原螯虾细胞骨架基因编码蛋白与其他物种的氨基酸序列比对
Appendix 2 Amino acid sequence comparison of cytoskeletal gene encoding protein in *Procambarus clarkii* with those of other species