

DOI: 10.12264/JFSC2024-0305

大口黑鲈细胞角蛋白 8 基因的分子克隆与表达分析

岳荣艳¹, 瞿风雨¹, 吴海清¹, 林仕梅^{1,2}, 陈拥军^{1,2}, 罗莉^{1,2}, 周兴华^{1,2}, 何远法^{1,2}

1. 西南大学水产学院, 水产动物营养与饲料实验室, 重庆 400715;

2. 西南大学, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715

摘要: 细胞角蛋白 8 (cytokeratin 8, CK8) 是一种细胞骨架蛋白, 属于角蛋白家族成员, 在调控上皮细胞黏附与运动、介导免疫反应等过程中发挥重要作用。为了探究 *ck8* 基因在大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 免疫反应中的作用, 本研究利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆获得大口黑鲈 *Msk8* 基因的全长序列 2424 bp, 其中 5' 非编码区有 570 bp, 3' 非编码区有 195 bp, 开放阅读框有 1659 bp, 可编码 552 个氨基酸, 预测其分子量为 61.30 kD, 理论等电点为 5.17。系统进化树中大口黑鲈与小口黑鲈 (*Micropterus dolomieu*) CK8 蛋白序列聚为一支, 显示了较高的同源性 (99.10%)。荧光定量 PCR 分析显示, *Msk8* 在健康大口黑鲈 9 个组织中均有表达 ($P < 0.05$), 其表达量由高到低依次是心脏、肌肉、鳃、肾脏、肝脏、后肠、前肠、中肠和脾脏。经脂多糖免疫刺激后, *Msk8* 在大口黑鲈心脏、肌肉和后肠组织中的表达量均呈时序性变化 ($P < 0.05$), 心脏和肌肉中均在 6 h 出现表达高峰, 后肠中于 48 h 出现表达高峰。此外本研究发现, 大口黑鲈经高水平豆粕饲料响应后, 豆粕替代 50% 鱼粉组的 *Msk8* 基因表达水平显著低于鱼粉组 ($P < 0.05$)。本研究通过 LPS 刺激和营养调控实验初步探讨了 *Msk8* 在鱼体炎症反应中的作用。

关键词: 大口黑鲈; 细胞角蛋白 8; 脂多糖; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)02-0128-11

细胞角蛋白家族在细胞生物学中扮演着至关重要的角色, 它们不仅构成了细胞的骨架, 还在细胞信号传导中起着核心作用^[1]。细胞角蛋白 8 (cytokeratin 8, CK8), 属于 II 型角蛋白家族, I 型和 II 型角蛋白在上皮细胞的细胞质中聚合形成中等大小的细丝, 其产物通常与角蛋白 18 形成二聚体, 为简单单层上皮细胞中的中间丝提供结构支持^[2]。中间丝 (intermediate filaments, IFs) 是大多数真核细胞的细胞骨架和核膜的主要组成部分^[3], 它们在细胞极化、迁移以及细胞对机械和氧化应激的响应中发挥着关键作用^[4]。

目前 CK8 在其他领域研究较多, 包括人类 (*Homo sapiens*) 癌症^[5]、小鼠 (*Mus musculus*) 喉鳞状细胞癌^[6]、大鼠 (*Rattus norvegicus*) 乳腺癌^[7]等, 揭

示了 CK8 在维持细胞结构完整性以及在信号转导和细胞分化中的重要作用。在小鼠中有研究表明, CK8 能通过抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 多泛素化来限制 Toll 样受体激活, 进而抑制 Toll 样受体对 NF- κ B 的激活, 缓解炎症的发生^[8], 也能通过调节结肠通透性和肠道微生物群组成稳态以避免小鼠发生结肠炎和直肠癌^[9]。哺乳动物中 CK8 靶向负调控 NF- κ B 通路介导炎症反应, 对于维持肠道上皮屏障功能和结构完整具有重要的作用^[10], 而鱼类中的 CK8 生物学功能尚不清楚。笔者前期研究发现, 珍珠龙胆石斑鱼 (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) 豆粕型肠炎中 NF- κ B 信号通路被显著上调, 且 *ck8* 基因表

收稿日期: 2024-10-11; 修订日期: 2024-11-07.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32202951); 中央高校基本科研业务费项目 (SWU-KQ22069).

作者简介: 岳荣艳 (1999-), 女, 硕士研究生, 从事水产动物营养与饲料研究. E-mail: y18839407215@163.com

通信作者: 何远法, 副教授, 从事水产动物营养与饲料研究. E-mail: heyuanfa2022@swu.edu.cn

达水平被显著下调^[11], 表明了鱼类中的细胞骨架蛋白与 NF- κ B 信号通路有关联。基于此, 笔者提出鱼类中 *ck8* 可能参与调控 NF- κ B 炎症通路的假设。本研究选择大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) 为研究对象, 旨在克隆大口黑鲈 *ck8* 基因, 并对该基因及其氨基酸序列特征进行深入的生物信息学分析。此外还研究了该基因在大口黑鲈健康组织及脂多糖 (LPS) 刺激后的表达和高豆粕水平下的响应情况。该研究为缓解大口黑鲈肠道炎症提供了分子层面的见解, 也为鱼类养殖病害管理提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验幼鱼购买于三峡生态渔业股份有限公司, 暂养于西南大学水产学院地下室养殖缸中, 暂养期间投喂商业饲料(成都通威有限公司), 每天两次, 饱食投喂, 养殖期内, 溶氧量>6 mg/L, 氨氮<0.2 mg/L, 温度为 28~30 ℃。选取 6 尾健康的大口黑鲈, 体重(10±0.2) g, 使用 MS-222 进行麻醉, 在冰盘上解剖鱼体, 取其大脑、头肾、肝脏、肌肉、前肠、中肠、后肠、脾脏、鳃、皮肤、心脏组织样品于液氮中保存, 所有动物福利和实验过程均遵循西南大学动物伦理委员会的相关规定。

1.2 实验方法

1.2.1 *Mscck8* 基因的全长 cDNA 克隆及序列特征分析 利用大口黑鲈基因组注释到的序列, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 条特异性引物(表 1), 由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。采取大口黑鲈肠道和肝脏组织样本进行 RNA 提取, 使用 Fermentas 公司的 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 进行 cDNA 第一链的合成, 随后进行序列扩增, 跑胶将目的片段切下进行纯化回收, 回收产物放-20 ℃保存。按照 PMD-18vector 1.0 μ L, PCR 回收产物 7.0 μ L, T4 Ligase buffer 1.0 μ L, T4 DNA ligase 1.0 μ L 反应体系连接过夜。使用感受态细胞(DH5a, 转导生物公司, TD-CPT02)对连接产物进行转化, 菌落培养, 挑选阳性单菌落。按照扩增程序扩增, 扩增后的产物进行电泳跑胶, 挑出符合预期条带大小的进行克隆, 送往生工生

物工程有限公司测序。5'RACE 和 3'RACE 实验利用已知的序列设计特异性引物, 合成目的基因第一链 cDNA, 扩增后进行凝胶电泳, 对目的条带进行切胶纯化回收。纯化后的 PCR 产物直接测序或与 pMD18T 进行连接, 转化后送至上海生工测序。将得到的 3'端、5'端片段与中间片段测序结果进行拼接获得大口黑鲈 *Mscck8* 基因序列全长。

表 1 基因克隆和序列验证的 PCR 引物
Tab. 1 Primers used for gene cloning and sequence verification

名称 name	序列(5'-3') sequence
特异性引物 specific primers	
B971XF1	TGTGAACATGTCTGTCAGAG
B971XR1	TCATTCTCAGCCACAGC
5' RACE 引物 5'race primers	
B983-1 (GSP1)	CACGACCACCGTAGCC
B983-2 (GSP2)	AAGGAGCGGCTGCTAAAG
B983-3 (GSP3)	CTCCTGGAGGACGACACA
3' RACE 引物 3'race primers	
C606-1 (GSP1)	TCCATGAACTACAATGCCTA CGGCC
C606-3 (GSP2)	AGCACCACAGTCACCAAGAC AGAG
qPCR 引物 qPCR primers	
<i>Mscck8</i> -F	TACGCTTCCTGGAACAGCAG
<i>Mscck8</i> -R	GCTTCGAACATGGCATCGAC
<i>eef1a1</i> -F	GTTGCTGCTGGTGTGGTGAG
<i>eef1a1</i> -R	GAAACGCTTCTGGCTGTAAGG

1.2.2 生物信息学分析 利用以下网站进行分析, 对测序的结果进行生物信息学分析。开放阅读框: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>, 氨基酸的理化性质: <https://web.expasy.org/protparam/>, 亲疏水性: <https://web.expasy.org/protscale/>, 预测信号肽: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, 预测跨膜结构: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>, 保守结构域: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, 预测二级结构: https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html, 预测三级结构: <https://swissmodel.expasy.org/interactive>, 多序列比对, 利用 MEGA 11 软件构建进化树。

1.3 *Mscck8* 在大口黑鲈组织内的表达分析

将提取的组织加入研磨珠研磨, 研磨后加入

裂解液(TRIZol)裂解,加入氯仿离心取上清,后加入异丙醇形成白色絮状物,离心去液体获得沉淀,加入与 TRIZol 等量的乙醇清洗沉淀,清洗之后在超净台干燥,加入 50 μL 的无酶水溶解,用超微分光光度计测 RNA 浓度。加入 2 μL gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 试剂,2 μL 总 RNA 含量低于 1 μg 的母液,加入无酶水制成 10 μL 的体系,第一步为去除 gDNA,第二步为反转录,均在 PCR 仪中完成。荧光定量 PCR 体系为 20 μL ,操作均按照说明书进行。采用 Excel 对结果进行处理,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算,借助 SPSS 软件对计算结果进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。

1.4 脂多糖注射试验

选取 11 g 左右的健康大口黑鲈 100 尾,均等地放入 2 个养殖缸中,分别为对照组(PBS 组)和实验组(LPS)。脂多糖注射浓度参考早期实验^[12],剂量按照大口黑鲈体重设定,剂量为 2 mg/kg,取样时间分别为 0、6、12、24、48、72 h,每个时间点,每个组各取 6 尾,取样部位为心脏、鳃、后肠、肌肉,放-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于 mRNA 的提取和基因表达分析。如上利用荧光定量 PCR 检测目的基因的表达变化。

1.5 饲料高水平豆粕对大口黑鲈 *Mscck8* 基因表达的影响

以鱼粉、豆粕、鸡肉粉、血浆蛋白粉、猪肉粉、花生麸为蛋白源,鱼油、豆油为脂肪源,设置两个实验组,对照组为鱼粉组(CON),实验组(SBM)为豆粕替代 50%鱼粉蛋白组,配制两种等氮(49%)等脂(10.27%)饲料。选取初始重为 11 g 左右健康大口黑鲈幼鱼,每组设置 3 个重复,每个重复 20 尾,养殖 8 周。养殖期间,水体溶解氧> 6 mg/L,氨氮<0.2 mg/L,温度为 28~30 $^{\circ}\text{C}$ 。养殖结束后,取后肠组织放-80 $^{\circ}\text{C}$,用于 *Mscck8* 基因表达分析。

1.6 数据处理

基因表达结果使用 Excel 处理,使用 SPSS 对结果进行方差齐性检验和单因素分析(one-way ANOVA)及独立方差 t 检验(t test), $P<0.05$ 表示差异显著。所有数据均以平均值 $\pm$ 标准误表示。使用

GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 大口黑鲈 *Mscck8* 基因序列分析

根据克隆结果得出 *Mscck8* 基因序列及氨基酸序列(图 1),该序列结果与 NCBI 上 *Mscck8* 的序列完全一致。分析得出,全长序列 2424 bp,其中 5' 非编码区有 570 bp,3'非编码区有 195 bp,开放阅读框(ORF)为 1659 bp,共编码 552 个氨基酸,预测得出编码蛋白的理化性质见表 2,理论分子质量为 61.30 kD 理论等电点(isoelectric point)为 5.17,脂肪指数为(aliphatic index) 75.65,不稳定指数(instability index)为 52.09,总体平均亲水性(average hydrophilicity)为-0.582。进一步分析其亲疏水性由图 2 可知,其亲水性区域占比较大。其跨膜结构域预测显示其不存在跨膜结构(图 3),该序列不存在信号肽(图 4)。

2.2 大口黑鲈 *MsCK8* 蛋白结构预测

二级结构预测如图 5 所示,结果显示其 α -螺旋(alpha helix)由 343 个氨基酸组成,占比为 62.14%,延伸链(extended strand)由 55 个氨基酸组成占比 9.96%, β -折叠(beta turn)由 18 个氨基酸组成,占比为 3.26%,无规则卷曲(random coil)由 136 个氨基酸组成占比 24.64%。

2.3 多序列比对及进化树

不同物种间的比对结果如图 6 所示,结果显示大口黑鲈与小口黑鲈具有较高相似度,为 99.28%。其次是鳊(*Siniperca chuatsi*),相似度为 92.04%,与乌鳢(*Scatophagus argus*)的相似度结果为 89.51%。用 NJ 法构建进化树,进化树结果显示(图 7)大口黑鲈的 CK8 蛋白序列与小口黑鲈的 CK8 蛋白序列最为相近,其次是鳊。大口黑鲈 *MsCK8* 蛋白的三级结构与小口黑鲈的 CK8 三级结构极为相似(图 8)。

2.4 *Mscck8* 基因在大口黑鲈组织内的表达

Mscck8 基因的组织表达结果如图 9 所示,心脏中的表达量最高($P<0.05$),肌肉组织的表达量次之($P<0.05$),随后是鳃中的表达。肠道组织中,后肠中的 *Mscck8* 基因表达量高于前肠和中肠($P>0.05$)。

ACGGTGGGAGCGTGGCGAGGCGTACTGTGGTTTCGGGGCCGGGGTAGGGGCCGTGCACTGTTCTTGCCTGGTGATCTGCCTGAATCTCCTCTCGACAGTCTCTCCTCTACACAGCTCTCGTGCTACAGAGCTCCCTCTGTGTAAG
 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
 ATGTCGTCTCAGAGCCATGAAGACCAACCTTCTCCACTGTGCTGCTCCAGGAGGCCATCCAGAGCCTTTAGACGCCGCTCCTCTCCGGCTACGGTGGTGGTGGTGGCAGTGGCAGGCAGAGCTACGCTGTCGCGACGCTCAT
 1 M S V R A M K T T T F S T V S S S R S P S Q S F S S R S F S G Y G G R G V G S G R Q S Y A V R S S Y
 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGGGGAGTGGCAGCAGTGGTGCACCTGTGGCGGTTGGGGGGTTAAGATGGCTGGTGGGTATGTTGCTGGGGGGTCTGGCAAAAGAGGAGGTGGAGTAGAGTTTGCTATCTGGGCTTTGGTGGAGGTGTGGGAGGTGGCATGGCCAA
 151 G G V G S S G A T V G V G G F K M A G G Y V A G G S G Q R G G G V E F G Y L G F G G G V G G G M A N
 51
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450
 GAAATGATGGCCCATCACAGCGGTGACTGTGAACAAGAGCTGCTGGCCGCCCTTGAACCTGGAGATTGCCACCCATCCAGGTGATCCGACACCCAGGAGGAAGAACAGATCAAGACCTGAAACACCGCTTGGCTTCTTATTTGAC
 301 E M M A P I T A V T V N K S L L A P L N L E I D P T I Q V I R T Q E K E Q I K T L N N R F A S F I D
 101
 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 AAGTAGCTCTCTGGAGCAGCAAAAATGCTTGAAGACCAAGTGGAACTTCTCAGGAACACACACCTCTCGCTCCAACGTGGATGCCATGTTGCAAGCTACATTTGCCAACTTGGCTAAGCAGCTAGACAACTTGGGTCAAGAA
 451 K V R F L E Q Q N K M L E T K W K L L Q E Q T T S R S N V D A M F E A Y I A N L R K Q L D N L G H E
 151
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750
 AAGTCAAACTAGAGTCCGACCTTACCACGACTGGCTGGCTGTTGAAGACTTCAAAGCAAGTATGAGGATGAGATCAACAAGCGAAATGAGTGTGAGAACTTTGTCTCTCA GAAAGAAGGACACTGTGACGCTATATGATCAAA
 601 K V K L E S D L Y H M T G L V E D F K S K Y E D E I N K R N E C E N N F V L T K K D T D A A Y M I K
 201
 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 GTGGAGCTGGAAGCCAACTGGATGGACTCTCTGATGAAATGAGTTCTGAGGCAGATCTCGATGCGAAGATTCATGAGCTGACGGGTGAGTCAAGGACACATCCGTTGTGGTGGAGATGGACACACCGCGTAACCTAGACATGGAT
 751 V E L E A K L D G L S D E I E F L R Q I F D A E I H E L Q G Q I K D T S V V V E M D N S R N L D M D
 251
 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 GGCATCGTCTGAAGTCGTCGCCGATTAAGACATCGCCAACTGACGAGCCGAGGCTGAGTATGTTACGAGACTAAGTATGAAGAAATGCAGCAGTCAGCAGGCAGATATGTTGACGACTGAAGTATCTCAAGGCTGAGATC
 901 A I V A E V R A Q Y E D I A N R S R A E A E S W Y Q T K Y E E M Q Q S A G R Y G D D L K S S K A E I
 301
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GCTGACATGAACCGCAAGATATTGAGGCTCCAGTCTGAAATGACATGGTTAAATCACAGCGAAGACGTTTGAAGCTCAAAATTCGACAGAGCTGAGGAGCGTGGTGAGCTGGCAGTGAAGGATGCTAAACTCCGATCAGACAGCTGGAG
 1051 A D M N R K I L R L Q S E I D M V K S Q R N S L E A Q I A E A E E R G E L A T G A A K L R I R D L E
 351
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350
 GAAGCTCTCCAGGAGCGAAGCAGGATATGGCCCTGCAAGTCCCGAATACACAGGAATCATGAAATTTGAAGCTGGCTCTGGACATAGAGATGGCCACTACAGGAATCTGCTGAAGGAGGAGGACAGGTAGCAATTTGAATCAAG
 1201 E A L Q R A K Q D M A L Q V R Q Y Q E L M N L K L A L D I E I A T Y R K L L E G E E D R L A I G I K
 401
 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 ACCAATGTATCCAAGCAAACTCCATGAATACATGCTACGGCTGGAGAGCTCCCGAACCCGCTCTACGTGAGCCGCTCCTTTGATGGAGTCAAGGCTAGCAGTGGTTCTGCTGCTCGCCCTCGAGGGGCAACGTTGAAGACACC
 1351 T T V S K Q T S M N Y N A Y G L E S S R T P S Y S R S F D G V K A S S G S A A A L E G A T L K S T
 451
 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650
 ACAGTCAACCAAGCAGAGACTGTGATGATCAAGACTGAGGAGAAGACCGAGAGGTGAAGAAGGAAGAGGACGACAGCATGCGACAACCGAGGAGTTAACTGCTGTGCAAGCA AGGACGAGGACCAAGTGAACCTGAGGCTGTGGCT
 1501 T V T K T E T V M I K T E E K T E E V K K E E Q Q H A A T E E L T A V Q T K E Q D Q V K P E A V A
 501
 1651 GAGGAATGA
 551 E E *
 AGCTTTTCCCTCCCCGGTGTGTCAGATTATGATGGTCTGGAGGTTAAAAAGCAAGACTACTCTACATTATATCCAGTTCTTAAATCATTGTTTCCAAGTGGCTTCAACAAATAATGTCGTGTGTTTCTACTGTGAAGAAT
 GCAAATGGACATGCTTTTGTCCAGCTTTCTGAAACCTTTGTCAACTGTGGATTGAGTGTGTCAGGACTACTGCACCATCACTGGTTTACCAGCAGGTGGCACTATTGTATGTTTTCCTGCTGCTCCATATTGTCTTCATCAAGC
 ACTGTGCACAGCAACCTGTAATTCACAGTCTAGCCTAATATTCATCTGATAGGAGACATTTGGGGAGCAATAAATCTGCCGTAACAAACCTTTCTATGCTAAACCTGCTGTACCTAAACAGTAAAGTAAAGTGAAATCAGTCAAGAA
 TCTTAATAAATCTTGAAGAAACCTTTTCCATGTTATCTGTTGGACACCCCTGAGGCTGCTGTGCTCAACATAAATCTTCTCCACAGCTCATAGACAAGAAAAA

图 1 *MscK8* 基因 ORF 序列及其预测的编码氨基酸序列

灰色区域为非编码区,下加波浪线的密码子(ATG 和 TGA)为起始密码子和终止密码子。

Fig. 1 Open reading frame and predicted expressed amino acid sequences of *MscK8*

The gray area is the non-coding area, and the codons (ATG and TGA) marked with wavy lines are the start and stop codons.

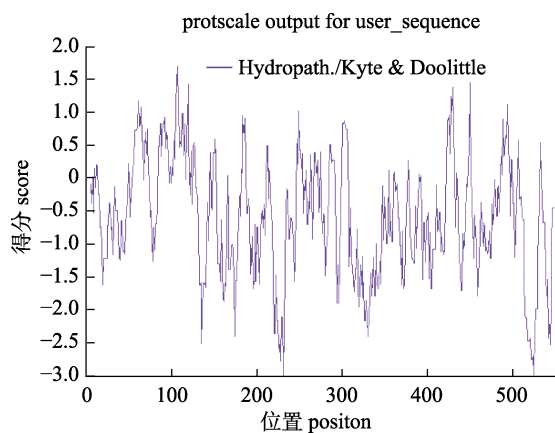


图 2 MsCK8 蛋白亲疏水性预测

Fig. 2 Hydrophobicity and hydrophilicity prediction of MsCK8

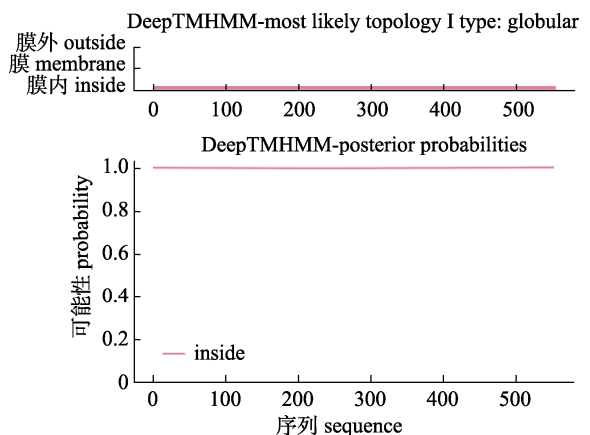


图 3 MsCK8 蛋白的跨膜结构域预测

Fig. 3 Prediction of transmembrane domain of MsCK8

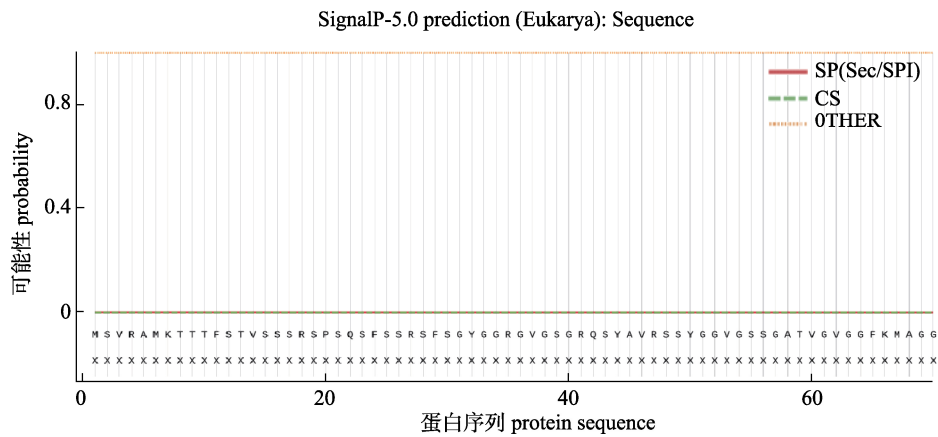


图 4 MsCK8 信号肽结构预测

Fig. 4 Prediction of the signal peptide structure of MsCK8

表 2 MsCK8 的理化性质分析统计

Tab. 2 Analysis and statistics of physical and chemical properties of MsCK8

<i>Mscck8</i> 编码蛋白相关指标 <i>Mscck8</i> expressed protein index	数据 data
序列分析 sequence analysis	
分子质量(molecular mass)	61297.75 ku
等电点(isoelectric point)	5.17
脂肪指数(aliphatic index)	75.65
不稳定指数(instability index)	52.09
平均亲水性(mean hydrophilicity)	-0.582
二级结构 secondary structure	
α-螺旋(alpha helix)	343
延伸链(extended strand)	55
β-折叠(beta turn)	18
无规则卷曲(random coil)	136

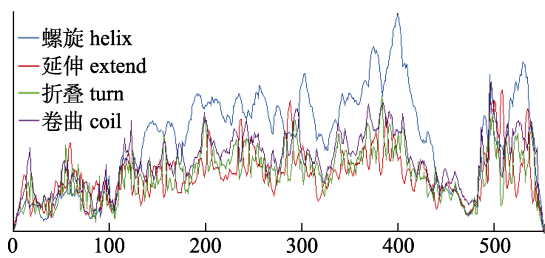


图 5 MsCK8 蛋白二级结构预测

Fig. 5 Secondary structure prediction of MsCK8

2.5 脂多糖刺激后 *Mscck8* 基因的时序表达结果

经 LPS 腹腔注射到大口黑鲈体内后, 6 个不同时间段的表达结果见图 10。肌肉和心脏组织中的 *Mscck8* 基因表达在 6 h 达到峰值, 然后逐渐降低恢复到正常水平($P<0.05$)。后肠中 *Mscck8* 的表达量

逐渐升高($P<0.05$), 在 48 h 达到峰值后 24 h 内仍保持高水平表达量($P>0.05$)。鳃组织内 *Mscck8* 基因的表达式是先降低后升高再降低, 然而各时间点之间未表现出显著差异($P>0.05$)。

2.6 高水平豆粕响应下大口黑鲈 *Mscck8* 基因的表达变化

高水平豆粕响应下, SBM 组相较于 CON 组, *Mscck8* 基因表达量显著降低(图 11)。

3 讨论

3.1 *Mscck8* 基因生物信息学分析

本研究基于 NCBI 数据库预测对大口黑鲈 *Mscck8* 基因(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_038697849.1)进行了克隆鉴定, 并预测了 *Mscck8* 的氨基酸序列, 其中开放阅读框(ORF)为 1659 bp, 共编码 552 个氨基酸, 预测得出编码蛋白的理论分子质量为 61.30 kD。其三级结构显示大口黑鲈与小口黑鲈 *ck8* 基因结构相似度极高。多序列比对与进化树结果表明, *ck8* 的蛋白序列和结构域在鱼类中较为保守, 且大口黑鲈蛋白序列与小口黑鲈蛋白序列相似度最高为 99.10%, 分子系统进化分析显示, 大口黑鲈与小口黑鲈亲缘关系最近, 相似指数为 100%, 以上结果说明大口黑鲈 *Mscck8* 具有高保守性。

3.2 大口黑鲈 *Mscck8* 基因组织表达分析

Mscck8 在大口黑鲈各组织内均有表达, 其中在心脏组织中表达量最高, 肌肉组织中表达次之, 鳃组织中表达量位于第三。心脏组织中, CK8 和

[illegible]

Fig. 6 Comparative analysis of CK8 amino acid sequences across different species

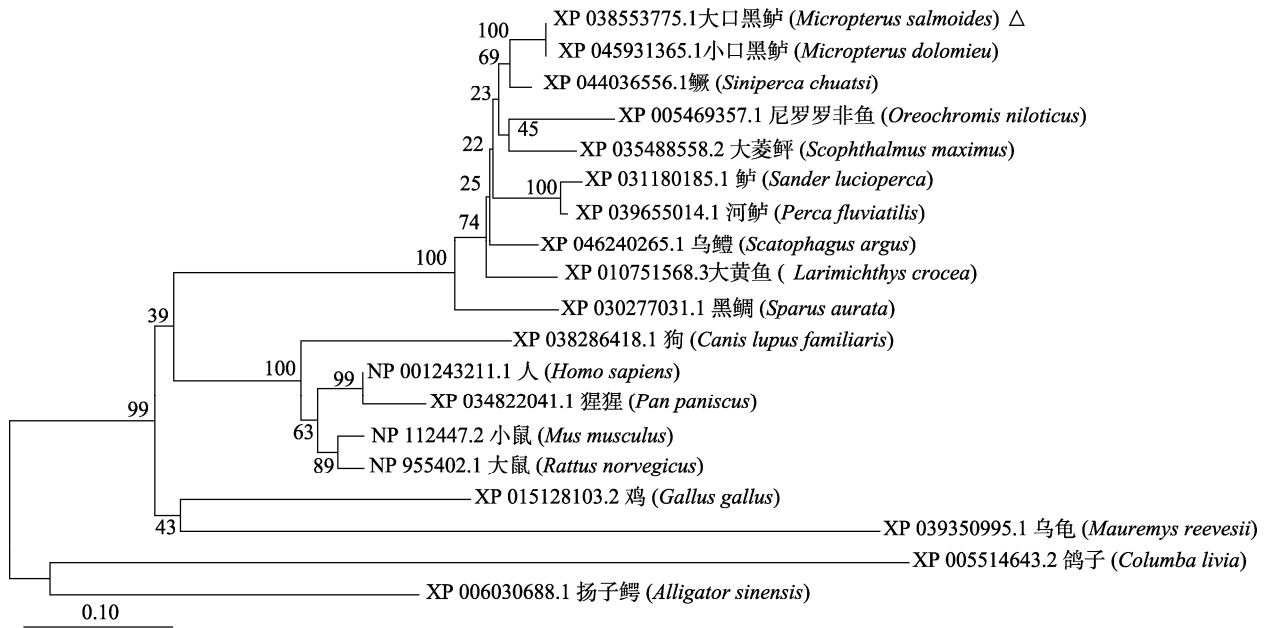


图 7 基于邻接法构建的 CK8 系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of CK8 based on neighbor-joining method

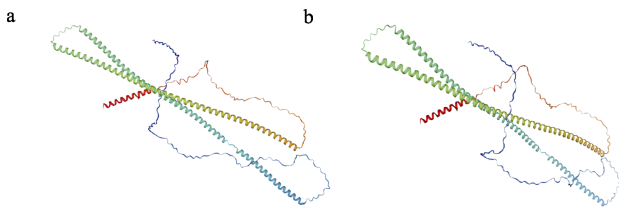
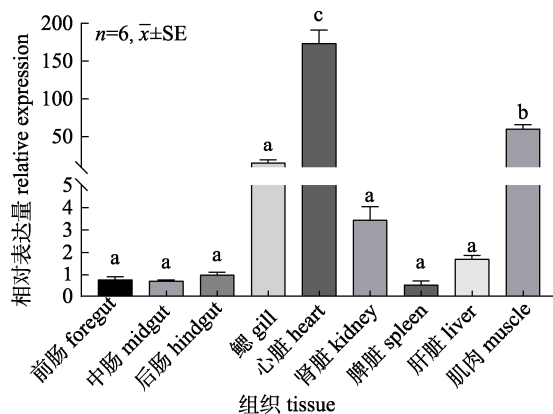


图 8 CK8 蛋白在大口黑鲈(a)和小口黑鲈(b)组织内的三级结构预测

Fig. 8 Predicted three-dimensional structures of CK8 in *Micropterus salmoides* (a) and *Micropterus dolomieu* (b)图 9 大口黑鲈 *Msck8* 基因的组织表达结果
不同字母表示组织间差异显著 ($P < 0.05$).Fig. 9 The expression of *Msck8* in different tissues of *Micropterus salmoides*Different letters indicate significant differences between different tissues ($P < 0.05$).

CK18 的表达对于心肌细胞的正常功能至关重要, 它们为心肌细胞提供机械支持, 帮助细胞抵抗物理应力, 如心脏收缩时产生的压力^[13]。鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 的研究中, *ck8* 在肝脏、肾脏、鳃、肌肉、心脏和头肾组织中表达, 肝脏的表达量最高, 鳃次之, 再就是肌肉和心脏^[14]。而在塞内加尔鳎 (*Solea senegalensis*) 研究中, 新型 II 型角蛋白基因在鳃组织中的相对表达量最高, 肠道中的相对表达量次之^[15]。在鲫和塞内加尔鳎组织中 *ck8* 在鱼体组织内的最高表达量不同, 这可能是由鱼体的大小及生活条件的不同造成的。以上结果表明了鳃组织中 *ck8* 的表达量相对较高, 这可能与 *ck8* 对鳃组织保护作用有关。有研究表明在鱼类鳃组织中, CK8 的表达有助于维持鳃上皮细胞的机械稳定性, 保护鳃组织免受物理损伤和病原体侵袭^[16]。一些鱼类在疾病状态下, 如鳃发炎或由环境压力引起的鳃损伤, CK8 的表达模式可能会发生变化, 这可能与鳃上皮细胞的损伤和修复机制有关^[17]。此外, 本研究在不同肠段组织中, 后肠 mRNA 表达量高于前肠和中肠。研究表明, 后肠在肠道免疫中占有重要地位, 显示后肠组织肌层明显增厚, 且杯状细胞较多, 利于食物残渣及粪便排出体外, 还参与渗透压调节

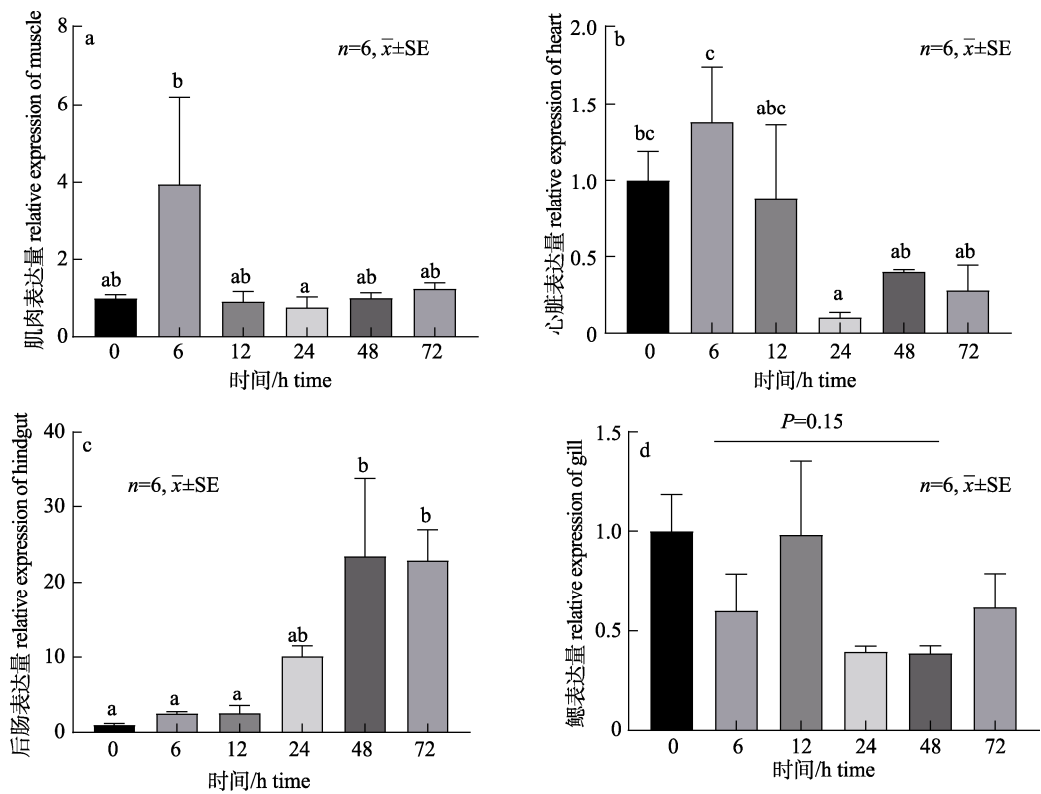


图 10 经 LPS 刺激后 *Msck8* 基因组织时序表达

a. 肌肉组织相对表达量, b. 心脏组织相对表达量, c. 后肠组织相对表达量, d. 鳃组织相对表达量. 不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$)

Fig. 10 Temporal expression of *Msck8* gene in tissues following LPS stimulation

a. Relative expression of muscle; b. Relative expression of heart; c. Relative expression of hindgut; d. Relative expression of gill. Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

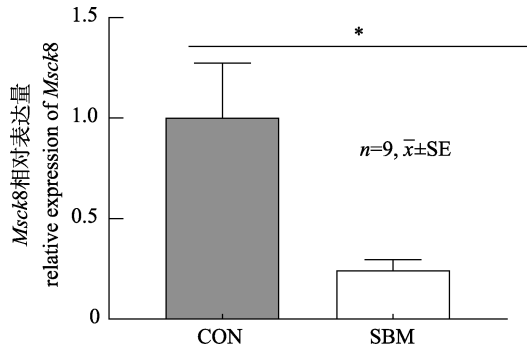


图 11 高水平豆粕响应下 *Msck8* 的基因表达

*表示实验组与对照组的表达量有显著差异($P < 0.05$),

CON: 对照组, SBM: 实验组.

Fig. 11 Gene expression of *Msck8* under stress of high soybean meal content

* indicates that the expression level is significantly different between the experimental group and the control group ($P < 0.05$).

CON: control group, SBM: experimental group.

活动, 调节离子转运和水的重吸收^[18]. 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 的研究中, 感染希瓦氏菌

(*Shewanella algae*) 后, 引起肠道炎症, 导致 *ck8/18* 的值降低, 表明 *ck8* 的降低与肠道炎症反应相关^[19]. 小鼠中的研究表明, *ck8* 可以通过抑制 TRAF6 (受体相关因子 6) 多聚泛素化来限制 TLR (Toll 样受体) 触发的炎症反应^[8]. 此外, *ck8* 能够通过调节结肠通透性和肠道微生物群组成稳态以避免小鼠发生结肠炎和直肠癌^[9]. 以上结果表明, CK8 可能在包括鱼类在内的肝脏病理学、肠道炎症反应中扮演着重要角色。

3.3 *Msck8* 基因在 LPS 刺激和高豆粕饲料响应下的表达分析

LPS 为革兰氏阴性菌细胞壁的组成成分, 可以刺激白细胞, 促使炎症介质的释放^[20]. 大口黑鲈经 LPS 胸腔注射后肠道功能受到影响, 导致肠道菌群紊乱及肠道炎症的发生^[21]. 本研究, LPS 免疫刺激后大口黑鲈后肠组织中 *Msck8* 的表达量逐渐上升, 在 48 h 时表达量达到峰值. 结果表明在炎症

条件下 *Mscck8* 基因表达量增强, 呈时间依赖性。小鼠的体外实验中, 经 LPS 处理的直肠癌 HT-29 细胞, 48 h 后细胞中的 *ck8* 蛋白水平上升以及 I κ B α 的蛋白水平降低, 结果表明该模型诱导了应激激活的炎症信号传导, 可能会激活 NF- κ B 炎症通路, 进而调节 *ck8* 在 RNA 水平和蛋白水平的表达^[22], 此 *ck8* RNA 水平的上调与本研究的结果相一致, 这表明在大口黑鲈中 *Mscck8* 表达水平可能与炎症相关。在大口黑鲈心脏组织中, *Mscck8* 的表达量在 6 h 达到峰值, 随后下降。角蛋白与多种机械和非机械细胞保护功能有关, CK8 与 CK18 形成必要的杂聚物, 参与信号转导途径的调节、防止细胞死亡等^[23]。在小鼠心脏组织的研究中, 在 TNF- α 的应激下, 通过 NF- κ B 介导的心肌细胞高表达 CK8 和 CK18, TNF- α 模型中证明了 CK8/18 形成的聚合物高表达对心脏具有保护作用^[17]。其结果是在蛋白水平升高, 而本研究结果为 RNA 水平升高, 这表明 *ck8* 的 RNA 和蛋白表达水平都可能受炎症因子的调控^[26]。此外, *ck8* 基因在各个组织中随时间变化表达量不同, 这可能是因为不同的组织对于 LPS 的吸收时间不同, 导致对 LPS 的应答有时间差异。大口黑鲈中的研究表明注射 LPS 后, 能够引起炎症因子如 *il-1 β* , *il-15*, *il-16* 的表达^[24,27], 这从侧面也说明了 *ck8* 可能与炎症因子有相同或相反的作用, 后续会进一步验证。以上结果表明, *Mscck8* 可以通过抑制某些炎症因子来抑制炎症的发生。

本研究中, 大口黑鲈在高水平豆粕的响应下, *Mscck8* 基因表达量显著降低, 表明 *Mscck8* 的表达下调与炎症反应密切相关。我们早期转录组数据也发现, 相比于鱼粉饲料组的珍珠龙胆石斑鱼(饲喂 β -伴大豆球蛋白饲料组的鱼体肠道 *ck8-like* (nr_annotation) 基因表达水平显著降低(未发表数据)。有研究表明, 敲低 *ck8* 可导致小鼠发生严重的结肠炎和多脏器出现炎症细胞浸润^[10]。此外, 小鼠 *ck8* 基因能够抑制 NF- κ B 信号通路和结肠炎的发生^[25], 以上结果可以得出, *Mscck8* 基因表达的下调与动物肠道炎症反应密切相关。

4 结论

本研究克隆了大口黑鲈 *Mscck8* 基因全长, 并

对其进行生物信息学分析, 该基因较保守。运用实时荧光定量技术检测 *Mscck8* 在大口黑鲈组织内的表达, 心脏和肌肉中的表达量显著高于其他组织。经 LPS 注射后, *Mscck8* 表达量在后肠、鳃、心脏及肌肉中呈时序性表达。在高豆粕饲料响应下, *Mscck8* 基因表达量显著下降。本研究通过 LPS 刺激和营养调控实验初步探讨了 *Mscck8* 在鱼体炎症反应中的作用。基于这些发现, *Mscck8* 对 NF- κ B 炎症通路的靶向调控作用需要进一步深入研究, 以期更全面地理解其在鱼类免疫反应中的功能。

参考文献:

- [1] Kumar A, Jagannathan N. Cytokeratin: A review on current concepts[J]. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 2018, 8:10.
- [2] Kuburich N A, den Hollander P, Pietz J T, et al. Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2022, 86: 816-826.
- [3] Etienne-Manneville S. Cytoplasmic intermediate filaments in cell biology[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2018, 34(1): 1-28.
- [4] Huber F, Boire A, López M P, et al. Cytoskeletal crosstalk: When three different personalities team up[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, 32: 39-47.
- [5] Thamilselvan S, Pandiar D, Krishnan R P, et al. Cytokeratin 8 depicts nodal metastasis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 2024, 28(2): 247-252.
- [6] Boricic N, Boricic I, Soldatovic I, et al. Utility of CK8, CK10, CK13, and CK17 in differential diagnostics of benign lesions, laryngeal dysplasia, and laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Diagnostics*, 2022, 12(12): 3203.
- [7] Nagata K, Nishimura M, Daino K, et al. Luminal progenitor and mature cells are more susceptible than basal cells to radiation-induced DNA double-strand breaks in rat mammary tissue[J]. *Journal of Radiation Research*, 2024, 65(5): 640-650.
- [8] Dong X M, Liu E D, Meng Y X, et al. Keratin 8 limits TLR-triggered inflammatory responses through inhibiting TRAF6 polyubiquitination[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 32710.
- [9] Liu C, Liu E D, Meng Y X, et al. Keratin 8 reduces colonic permeability and maintains gut microbiota homeostasis, protecting against colitis and colitis-associated tumorigenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(57): 96774-96790.

- [10] Jin Y C. CK 8 induces the formation of colitis by negative regulating NF- κ B signal pathway[D]. Tianjin: Tianjin University, 2013. [金延超. 细胞角蛋白8负调控NF- κ B信号通路诱导结肠炎发生[D]. 天津: 天津大学, 2013.]
- [11] He Y F, Ye G L, Chi S Y, et al. Integrative transcriptomic and small RNA sequencing reveals immune-related miRNA-mRNA regulation network for soybean meal-induced enteritis in hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂ [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1502.
- [12] Qi Z T, Xu Y, Liu Y H, et al. Transcriptome analysis of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) challenged with LPS and polyI: C[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 133: 108534.
- [13] García D M, Bauer H, Dietz T, et al. Identification of keratins and analysis of their expression in carp and goldfish: Comparison with the zebrafish and trout keratin catalog[J]. *Cell and Tissue Research*, 2005, 322(2): 245-256.
- [14] Podok P, Wang H, Xu L J, et al. Characterization of myeloid-specific peroxidase, keratin 8, and dual specificity phosphatase 1 as innate immune genes involved in the resistance of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) to Cyprinid herpesvirus 2 infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 531-540.
- [15] Infante C, Ponce M, Asensio E, et al. Molecular characterization of a novel type II keratin gene (*sseKer3*) in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Differential expression of keratin genes by salinity[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 160(1): 15-23.
- [16] Fuchs E, Cleveland D W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease[J]. *Science*, 1998, 279(5350): 514-519.
- [17] Papathanasiou S, Rickelt S, Soriano M E, et al. Tumor necrosis factor- α confers cardioprotection through ectopic expression of keratins K8 and K18[J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(9): 1076-1084.
- [18] Su X, Ji D, Yao J J, et al. Comparative analysis of intestinal characteristics of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and intestinal flora with different growth rates[J]. *Fishes*, 2022, 7(2): 65.
- [19] Han Z R, Ge L H, Wen S Y, et al. Dysfunction of the intestinal physical barrier in the intestinal inflammation of tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*, induced by *Shewanella algae* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 139: 108900.
- [20] Dong X M, Liu E D, Meng Y X, et al. Keratin 8 limits TLR-triggered inflammatory responses through inhibiting TRAF6 polyubiquitination[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): Article No.32710.
- [21] Liu C, Liu E D, Meng Y X, et al. Keratin 8 reduces colonic permeability and maintains gut microbiota homeostasis, protecting against colitis and colitis-associated tumorigenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(57): 96774-96790.
- [22] Meng Z, Zhang X Y, Guo J, et al. Scavenger receptor in fish is a lipopolysaccharide recognition molecule involved in negative regulation of NF- κ B activation by competing with TNF receptor-associated factor 2 recruitment into the TNF- α signaling pathway[J]. *Journal of Immunology*, 2012, 189(8): 4024-4039.
- [23] Nguyen T M, Agbohessou P S, Nguyen T H, et al. Immune responses and acute inflammation in common carp *Cyprinus carpio* injected by *E.coli* lipopolysaccharide (LPS) as affected by dietary oils[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 122: 1-12.
- [24] Helenius T O, Antman C A, Asghar M N, et al. Keratins are altered in intestinal disease-related stress responses[J]. *Cells*, 2016, 5(3): 35.
- [25] Weng Y R, Cui Y, Fang J Y. Biological functions of cytokeratin 18 in cancer[J]. *Molecular Cancer Research*, 2012, 10(4): 485-493.
- [26] Liu E D. Cytokeratin 8 negatively regulates TLR/NF- κ B signal pathway and protects mice from colitis and colitis-associated cancer[D]. Hefei: Anhui Medical University. 2016. [刘恩东. CK8负调控TLR/NF-KB信号通路抑制结肠炎及炎症相关结肠癌发生[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.]
- [27] Xu Y, Qi Z T, Zhang Q H, et al. Molecular characterization and expression analysis of three interleukins (IL-1 β , IL-15 and IL-16) in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2022, 38(2): 194-203.

Molecular cloning and mRNA expression analysis of *Msck8* gene in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

YUE Rongyan¹, QU Fengyu¹, WU Haiqing¹, LIN Shimei^{1,2}, CHEN Yongjun^{1,2}, LUO Li^{1,2}, ZHOU Xinghua^{1,2}, HE Yuanfa^{1,2}

1. Laboratory of Aquatic Animal Nutrition and Feed, College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education), Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Cytokeratin 8 (CK8) is a cytoskeletal protein, a member of the keratin family, which plays an important role in regulating epithelial cell adhesion and motility and mediating immune responses. To investigate the role of *ck8* in the immune response of largemouth bass (*Micropterus salmoides*), the full-length sequence of largemouth bass *Msck8* gene (2424 bp) was cloned using rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology. Among these, the length of 5' untranslated region (5' UTR) was 570 bp, the 3' UTR was 195 bp, and the open reading frame (ORF) was 1659 bp, encoding 552 amino acids, with a predicted molecular weight of 61.30 kD and a theoretical isoelectric point of 5.17. In the phylogenetic tree, MsCK8 proteins were clustered closely with smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*), which showed a high homology. Quantitative PCR analysis showed that *Msck8* was expressed in nine tissues of healthy largemouth bass. It was expressed, in descending order, in the heart, muscle, gill, kidney, liver, foregut, hindgut, midgut, and spleen. After immunostimulation with lipopolysaccharide, the expression of *Msck8* in muscle, heart, and hindgut of largemouth bass showed prominent temporal changing patterns. The expression levels of *Msck8* in the muscle and heart peaked at 6 h. The expression levels in the hindgut showed a positive correlation with temporal sequence and peaked at 48 h. Under high soybean meal stress, the expression level of the *Msck8* gene in the experimental group was significantly lower than that in the experimental group ($P < 0.05$). In conclusion, *Msck8* may play an important role in the immune response of fish against bacterial invasion.

Key words: *Micropterus salmoides*; cytokeratin 8; lipopolysaccharide; gene cloning; expression analysis

Corresponding author: HE Yuanfa. E-mail: heyuanfa2022@swu.edu.cn