

张高伟,王宣朋,吴春,等.嗜水气单胞菌感染后中华绒螯蟹肝胰腺的转录组分析[J].江苏农业学报,2025,41(10):2018-2026.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2025.10.015

## 嗜水气单胞菌感染后中华绒螯蟹肝胰腺的转录组分析

张高伟, 王宣朋, 吴春, 王信海, 高丹丹  
(江苏省农业科学院宿迁农业科学研究所,江苏 宿迁 223800)

**摘要:** 本研究旨在解析嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)基因表达调控的影响机制,通过RNA-Seq比较雌雄个体在病原侵染24 h后肝胰腺组织的基因差异表达谱,初步分析雄性中华绒螯蟹和雌性中华绒螯蟹是否存在免疫二态性。结果显示,雌性中华绒螯蟹感染组和对照组共富集到3 447个差异表达基因,包括1 424个上调表达基因和2 023个下调表达基因;雄性中华绒螯蟹感染组和对照组共富集到3 035个差异表达基因,包括1 462个上调表达基因和1 573个下调表达基因。雌蟹和雄蟹富集到免疫相关的差异表达基因主要有泛素蛋白连接酶基因、Toll样受体基因、C型凝集素基因、热休克蛋白基因、溶菌酶基因等。GO富集分析结果显示,大量差异表达基因被富集在免疫相关的生物过程。KEGG富集分析结果表明,差异表达基因显著富集在118个通路,其中免疫相关的代谢通路主要有溶酶体、细胞外基质(ECM)受体相互作用、过氧化物酶体和吞噬体等。此外,挑选转录组数据中的9个免疫相关基因进行qRT-PCR验证,验证结果与RNA-Seq结果一致。本研究初步探究了中华绒螯蟹肝胰腺响应嗜水气单胞菌侵染的分子机制。

**关键词:** 中华绒螯蟹;嗜水气单胞菌;肝胰腺组织;转录组;差异表达基因

**中图分类号:** S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)10-2018-09

## Transcriptomic analysis of hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* infected with *Aeromonas hydrophila*

ZHANG Gaowei, WANG Xuanpeng, WU Chun, WANG Xinhai, GAO Dandan

(Suqian Institute of Agricultural Sciences, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Suqian 223800, China)

**Abstract:** To investigate the regulatory mechanism of gene expression in *Eriocheir sinensis* (Chinese mitten crab) upon infection with *Aeromonas hydrophila*, we compared the differential gene expression profiles of hepatopancreas tissues between male and female individuals at 24 hours post-pathogen infection through RNA-Seq, and preliminarily analyzed whether there is immune dimorphism between male and female *Eriocheir sinensis*. The results showed that a total of 3 447 differentially expressed genes (DEGs) were identified between the infected group and the control group in female crabs, including 1 424 up-regulated genes and 2 023 down-regulated genes. In male crabs, 3 035 DEGs were enriched between the infected group and the control group, with 1 462 up-regulated genes and 1 573 down-regulated genes. The immune-related DEGs enriched in both female and male crabs mainly included ubiquitin-protein ligase genes, Toll-like receptor genes, C-type lectin genes, heat shock protein genes, and lysozyme genes. GO enrichment analysis revealed that a large number of DEGs were enriched in immune-related biological processes. KEGG enrichment analysis indicated that DEGs were significantly enriched in 118 pathways, and the immune-related metabolic pathways mainly included lysosome, extracellular matrix (ECM)-receptor interaction, peroxidase, and phagosome. In addition, nine immune-related genes from the transcriptome data were selected for qRT-

收稿日期:2024-11-04

基金项目:宿迁市农业科技自主创新项目(SQCX202310)

作者简介:张高伟(1993-),男,江苏徐州人,硕士,助理研究员,主要从事甲壳动物免疫研究。(E-mail)656421404@qq.com

通讯作者:王信海,(E-mail)hai92913@163.com

PCR validation. The results were consistent with those from RNA-Seq. This study preliminarily explored the molecular mechanism underlying the hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* in response to *Aeromonas hydrophila* infection.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; *Aeromonas hy-*

*drosophila*; hepatopancreatic tissues; transcriptome; differentially expressed genes

中华绒螯蟹,俗名河蟹、大闸蟹,是中国重要的高端水产品,广受消费者的青睐,江苏、浙江一带是中华绒螯蟹的主要养殖区,市场需求量很大。近年来,中华绒螯蟹的养殖密度不断增加,种质资源退化和抗病力减弱等问题凸显<sup>[1]</sup>。中国水产养殖业因病害问题导致的年均损失高达 $1 \times 10^{10}$ 元,其中甲壳类占11%~28%。由细菌感染引发的病害是中华绒螯蟹最常见病害,目前已经发现的中华绒螯蟹致病菌主要有气单胞菌等革兰氏阴性菌<sup>[2]</sup>。

研究人员对江苏省各主要中华绒螯蟹养殖区进行流行病学调查,发现中华绒螯蟹病害总体具有流行范围广、传播速度快、病原种类多、发病率和死亡率高等特点,其中细菌性疾病占比较高,达到39.61%<sup>[3]</sup>。宫子慧等<sup>[4]</sup>研究结果表明,流行于江苏省中华绒螯蟹主养区最多的病原细菌为弧菌科嗜水气单胞菌,该菌的侵染会破坏中华绒螯蟹免疫系统,导致其行动迟缓甚至死亡<sup>[5]</sup>。虽然嗜水气单胞菌对中华绒螯蟹致病性很强,但目前生产上仍缺乏对中华绒螯蟹细菌性疾病的有效防治方法。开展中华绒螯蟹抗病育种研究是解决这一问题的重要手段,通过筛选中华绒螯蟹重要抗病、抗逆等性状关键基因,开展相关基因功能研究和基因组选择、分子设计等基础研究,建立和应用分子标记辅助育种技术是推进中华绒螯蟹抗病育种的基础,这对提高其抗病能力、实现产业可持续发展至关重要<sup>[6]</sup>。

本研究采用RNA高通量测序技术,针对嗜水气单胞菌侵染后的中华绒螯蟹肝胰腺组织进行转录组测序分析。通过生物信息学方法系统筛选与先天免疫相关的差异表达基因,并对其进行GO功能分类注释及KEGG代谢通路富集研究。为验证测序数据的可靠性,选取Toll样受体(TLR)等9个重要免疫相关差异表达基因,运用实时荧光定量PCR技术开展表达量验证试验。旨在探索甲壳类动物抗菌免疫的关键调控基因及其作用通路,不仅为阐明中华绒螯蟹应对病原微生物侵袭的分子防御机制提供理论依据,同时为其遗传改良和病害防治策略的制订积累重要试验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与来源

本试验所用中华绒螯蟹为2024年7月选自江

苏省农业科学院宿迁农业科学研究所中华绒螯蟹育种基地选育的霸王蟹1号G1世代群体,雄性体重为 $(64.82 \pm 2.13)$  g,雌性体重为 $(56.97 \pm 1.68)$  g。试验开始前,使用循环水自动温控杀菌系统暂养14 d,暂养期间水温控制在 $(26 \pm 2)$  °C,每日投喂中华绒螯蟹专用配合饲料2次,暂养后挑选活力强的中华绒螯蟹用于试验,每个试验组随机挑选15只进行试验。挑取纯培养嗜水气单胞菌菌株,经扩繁、提纯后用无菌 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液重悬菌体,并将浓度调至 $1 \text{ mL } 1 \times 10^7$  CFU。

### 1.2 人工感染试验

为比较雌蟹和雄蟹对嗜水气单胞菌感染响应机制的异同,将健康的中华绒螯蟹分为雄性感染组、雄性对照组和雌性感染组、雌性对照组,每组各设置3个生物学平行。分别向感染组中华绒螯蟹注射 $100 \mu\text{L}$ 的嗜水气单胞菌菌液稀释液,对照组分别注射等体积的 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液。根据预试验结果,在感染24 h后免疫相关酶活力较强,肝胰腺组织的酶活力也较强,因此本试验选择在注射24 h后,每组生物学平行随机挑选5只中华绒螯蟹作为混合样品,取出肝胰腺组织,于液氮中速冻备用。

### 1.3 转录组分析

**1.3.1 RNA提取和转录组测序** 采用Trizol法提取感染组与对照组中华绒螯蟹肝胰腺组织总RNA,经质量评估合格后进行高通量测序。测序获得的图像文件通过Illumina NovaSeq 6000平台配套软件转化为FASTQ格式的原始测序数据,随后对各样本数据进行基础质量控制分析,统计样本名称、模糊碱基比例及Q20和Q30质量值(Q20:碱基质量值大于或等于20的碱基,Q30:碱基质量值大于或等于30的碱基)等参数。为保障分析可靠性,采用Cutadapt工具对原始数据进行质量控制过滤,以最小匹配长度10 bp(AGATCGGAAG序列)和允许碱基错配率20%的条件去除3'端接头序列,同时剔除平均碱基质量值低于Q20的低可信度数据。将过滤后的高质量数据通过序列比对算法比对至中华绒螯蟹参考基因组,基于比对结果完成基因表达定量计算。后续通过差异表达基因筛选、功能富集分析及表达模式聚类等多维度解析,并结合转录本重构技术对匹配数据进行序列组装,最终获得完整的转录本结构信息。

**1.3.2 差异表达基因分析** 通过 DESeq 算法对转录组数据进行表达量差异显著性检测。在差异表达基因筛选阶段,设定严格的统计学标准,  $|\log_2 FC| \geq 1$ , ( $FC$  表示表达量变化绝对值),且显著性检验  $P < 0.05$ 。针对满足上述标准的显著性差异表达基因集合,进行系统性分析。差异表达基因数量统计:运用柱状图可视化技术分别展示各试验组间上调(表达量正向调控)与下调(表达量负向调控)的基因数量分布特征。跨组联合分析:整合所有试验组差异表达基因的并集,采用 Pheatmap 可视化工具实施矩阵热图绘制。多维聚类分析:基于欧几里得距离算法构建表达谱相似性矩阵,分别对基因维度(行)和样本维度(列)执行层次聚类,聚类过程中采用全连接法确定类簇间距。该分析方法通过双重聚类策略有效揭示基因表达模式在样本间的相似性以及共表达基因簇的分布规律,为后续功能解析提供可靠的定量依据。

**1.3.3 富集分析** 在完成差异表达基因分析后,结

合基因组注释信息,对组间差异表达基因进行分类,进而分析其参与的功能。基于 topGO 分析框架,利用基因本体论数据库对差异表达基因集进行功能注释。计算过程中整合了分子功能、细胞组分、生物学过程 3 个维度的功能单元,并通过超几何概率模型评估各功能模块的富集显著性(显著性阈值设为  $P < 0.05$ )。通过比较差异表达基因集与参考基因组的功能分布特征,系统识别出具有统计学意义的特征性功能模块。同时,采用 clusterProfiler 生物信息学工具整合 KEGG 通路数据库进行代谢通路富集分析,通过构建差异表达基因-通路关联矩阵,基于超几何分布算法计算各通路的富集概率(显著性标准为  $P < 0.05$ )。

#### 1.4 荧光定量 PCR 验证

选取 9 个与免疫相关的差异表达基因,利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测验证转录组测序的准确性,选用  $\beta$ -actin 作为内参基因(表 1)。反应体系、反应程序和数据分析方法参照赵庆<sup>[7]</sup>的方法。

表 1 荧光定量 PCR 验证差异表达基因所用到的引物序列

Table 1 Primer sequences used for validating differentially expressed genes by quantitative real-time PCR

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
C 型溶菌酶基因	F: CTGCCAAGGAACCTGAGAC R: ACACGTTCTTCCACCTGAC	195
溶菌酶基因	F: TACGTTTCAAGCGATGGATG R: TCACCCTGAGCTCGTTACAG	179
C 型凝集素基因	F: GGCAGCAAGCAAGAACTAC R: CCACTAGTCGGCGATCTCAT	166
Toll 样受体基因	F: CCATCTGACCAATGCCTTCT R: TCAGCCTGTTGTCTGTGAGG	222
肝凝集素基因	F: TGTTCTCCTTGGAACCTTG R: AACTGCCCATCAGACAGGAC	212
热休克蛋白基因	F: GGCTGCTGCTCTGAGAAGAT R: ACTCTGGCAGGAGAACCTCA	241
胰蛋白酶基因	F: AGCACTCCCTCTGTCCTTCA R: AAGTAGCCACCTCAGCGTA	250
泛素蛋白连接 E3 基因	F: AGCTGAGCCGAGACTCTGAG R: TTCTTCTGAGGCTTGCAAT	189
溶酶体硫醇还原酶(GILT) 基因	F: GAGACGCTATGCCCTACAG R: ATCGTTGAAGTGTCCTTGG	212
内参基因( $\beta$ -actin)	F: GGTTACACTTTCACCACCACAG R: ACCGGAAGTTTCCATACCTAAG	213

#### 1.5 数据统计与分析

采用 SPSS 软件对试验数据进行单因素方差分

析,利用 R 语言中 EnhancedVolcano 工具绘制火山图,采用 clusterProfiler 和 pathview 工具绘制通路着

色图,利用 GraphPad prism 6.0 软件绘制柱状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组测序数据统计

从表 2 可知,本研究共获得原始测序序列 541 521 812 个,除去低质量序列和接头后,共获得过滤序列 531 239 650 个,碱基识别准确率在 99.90% 以上,碱基质量值 Q20 的百分比均高于 97.00%,Q30 的百分比均高于 93.00%,表明该转录组测序数据质量良好。

表 2 样本测序数据与组装结果统计

Table 2 Summary of sequencing and transcriptome assembly

样本	原始序列 (个)	过滤序列 (个)	Q20 碱基百 分比(%)	Q30 碱基百 分比(%)
雌蟹对照组 1	45 175 338	44 405 086	97.78	94.08
雌蟹对照组 2	46 266 112	45 340 336	97.56	93.63
雌蟹对照组 3	46 745 568	45 868 164	97.53	93.51
雌蟹感染组 1	36 605 874	35 9467 08	97.81	94.19
雌蟹感染组 2	40 983 830	40 229 456	97.78	94.12
雌蟹感染组 3	47 331 550	46 483 482	97.84	94.26
雄蟹对照组 1	47 302 018	46 477 168	97.85	94.39
雄蟹对照组 2	42 708 318	42 017 592	97.88	94.30
雄蟹对照组 3	41 914 548	41 010 018	97.46	93.60
雄蟹感染组 1	43 752 582	42 822 476	97.51	93.67
雄蟹感染组 2	53 153 394	52 061 246	97.58	93.87
雄蟹感染组 3	49 582 680	48 577 918	97.62	93.93

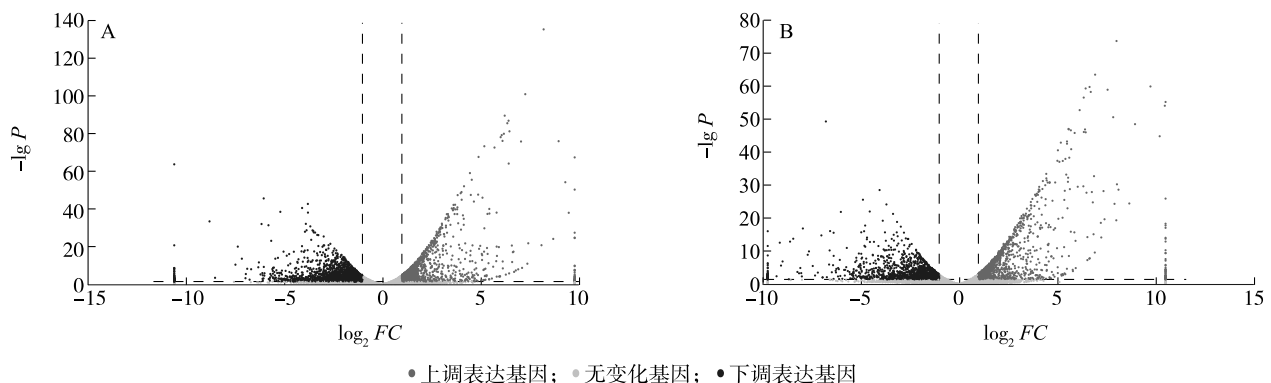
Q20: 碱基质量值大于或等于 20 的碱基, Q30: 碱基质量值大于或等于 30 的碱基。

### 2.2 差异表达基因分析

对嗜水气单胞菌感染 24 h 后对照组和感染组的中华绒螯蟹雄蟹和雌蟹肝胰腺组织的转录组文库进行差异表达基因分析,结果显示,雌性感染组和对照组中华绒螯蟹存在 3 447 个差异表达基因,包括 1 424 个上调表达基因和 2 023 个下调表达基因(图 1A);雄性感染组和对照组中华绒螯蟹存在 3 035 个差异表达基因,包括 1 462 个上调表达基因和 1 573 个下调表达基因(图 1B)。

### 2.3 差异表达基因的 GO 富集分析

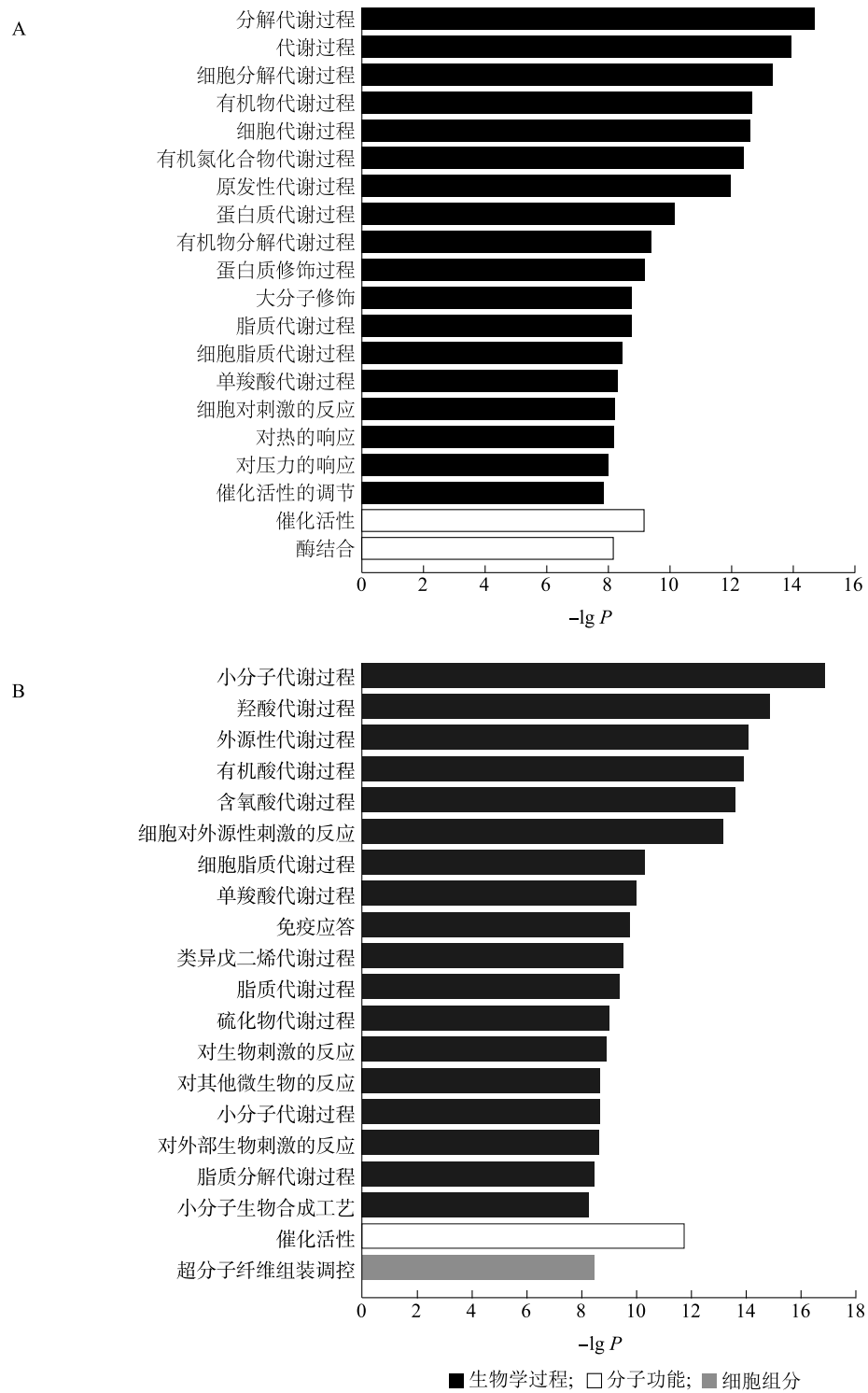
为深入解析嗜水气单胞菌感染对中华绒螯蟹的分子调控机制,本研究基于差异表达基因注释信息构建了功能注释图谱(图 2),主要的条目涉及生物学过程、分子功能、细胞组分,雌雄中华绒螯蟹感染组均呈现显著的代谢与应激响应特征。从雌性中华绒螯蟹对照组和感染组差异表达基因 GO 功能注释(图 2A)可见,18 个生物学过程条目显著富集,2 类分子功能(酶结合和催化活性)显著激活;从雄性中华绒螯蟹对照组和感染组差异表达基因 GO 功能注释(图 2B)可见,18 个生物学过程条目富集特征与雌性中华绒螯蟹差异表达基因 GO 功能注释高度相似,但多了细胞组分中超分子纤维组装调控条目,分子功能中除催化活性条目外,三磷酸腺苷(ATP)结合功能呈现特异性激活。两性差异表达基因在免疫相关功能模块中均呈现协同富集现象,包括模式识别受体介导的先天性免疫应答机制(GO:0002376)、活性氧代谢调控(GO:0045454)以及微生物防御反应通路(GO:0042742)。



A: 雌性中华绒螯蟹感染组和未感染组差异表达基因; B: 雄性中华绒螯蟹感染组和未感染组差异表达基因。FC: 表达量变化绝对值; P 表示基因表达差异度。

图 1 雌性和雄性中华绒螯蟹肝胰腺组织差异表达基因火山图

Fig.1 Volcano plot of differentially expressed genes in the hepatopancreas of female and male *Eriocheir sinensis*



A: 雌性中华绒螯蟹对照组和感染组差异表达基因 GO 功能注释; B: 雄性中华绒螯蟹对照组和感染组差异表达基因 GO 功能注释。P 表示基因功能富集度。

图 2 中华绒螯蟹对照组和感染组差异表达基因 GO 富集分析

Fig.2 GO enrichment analysis of differentially expressed genes between the control group and the infected group of *Eriocheir sinensis*

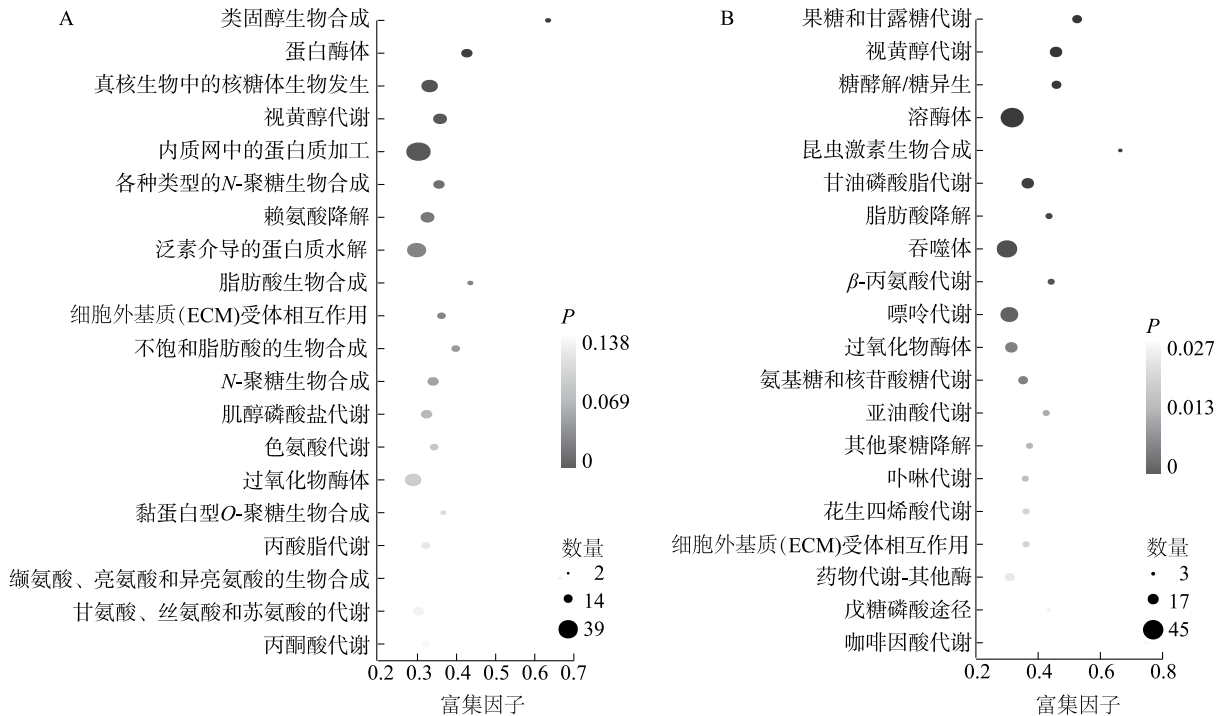
2.4 差异表达基因的 KEGG 富集分析

中华绒螯蟹对照组和感染组差异表达基因

KEGG 通路富集分析结果显示,显著富集到 118 个通路,主要有细胞外基质 (ECM) 受体相互作用、过

氧化物酶、溶酶体和吞噬体等免疫相关通路。其中,雌性中华绒螯蟹对照和感染组与免疫相关的代谢通路主要有内质网中的蛋白质加工和泛素介导的蛋

白质水解等(图 3A);雄性中华绒螯蟹对照和感染组与免疫相关的代谢通路主要有溶酶体、糖酵解/糖异生、吞噬体和嘌呤代谢等(图 3B)。



A: 雌性中华绒螯蟹对照和感染组差异表达基因的 KEGG 通路富集; B: 雄性中华绒螯蟹对照和感染组差异表达基因的 KEGG 通路富集。P 表示 KEGG 通路富集度。

图 3 中华绒螯蟹对照和感染组差异表达基因 KEGG 通路富集分析

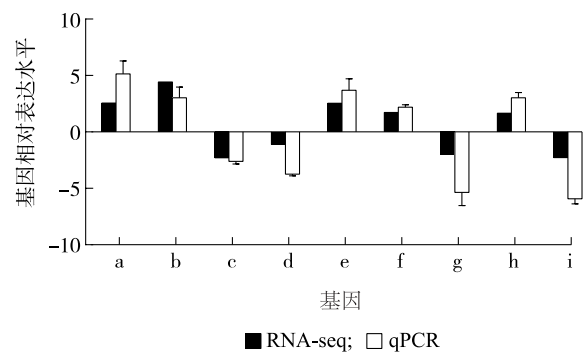
Fig.3 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes between the control group and the infected group of *Eriocheir sinensis*

## 2.5 免疫相关基因 qRT-PCR 验证

利用 qRT-PCR 检测 C 型溶菌酶基因、溶菌酶基因、C 型凝集素基因、Toll 样受体基因、肝凝集素基因、热休克蛋白基因、胰蛋白酶基因、泛素蛋白连接 E3 基因、溶酶体硫醇还原酶基因等 9 个与免疫相关差异表达基因,以进一步验证转录组测序的准确性,结果(图 4)表明,qRT-PCR 验证结果与 RNA-Seq 检测结果具有一致性。

## 3 讨论

嗜水气单胞菌是中华绒螯蟹养殖过程中的常见病原菌,其感染会导致中华绒螯蟹肝胰腺、性腺及鳃等组织发生坏死、解体等病理变化,进而引发中华绒螯蟹“腹水病”、“抖抖病”等疾病<sup>[8-9]</sup>。作为甲壳类特有的多功能消化腺体,中华绒螯蟹的肝胰脏复合器官兼具代谢中枢与免疫防御的双重作用。当遭遇外源性病原刺激时,该器官可通过激活以细胞色素



a: C 型溶菌酶基因; b: 溶菌酶基因; c: C 型凝集素基因; d: Toll 样受体基因; e: 肝凝集素基因; f: 热休克蛋白基因; g: 胰蛋白酶基因; h: 泛素蛋白连接 E3 基因; i: 溶酶体硫醇还原酶基因。

图 4 免疫相关基因 qRT-PCR 检测结果与 RNA-Seq 检测结果对比

Fig.4 Comparison between qRT-PCR and RNA-Seq results for immune-related genes

P450 酶系为核心的生物转化网络,启动三级解毒防

御程序来完成毒性物质的清除,还能与先天免疫系统的模式识别受体协同作用,构成机体抵御病原入侵的重要分子屏障<sup>[10-12]</sup>。本研究旨在通过对嗜水气单胞菌感染后的中华绒螯蟹肝胰腺组织转录组的研究,筛选出免疫应答相关基因,为揭示中华绒螯蟹抵御嗜水气单胞菌感染的分子机制提供基础数据。

目前,高通量测序技术在甲壳动物的免疫防御、生长发育、环境胁迫、遗传育种和宿主免疫反应等研究中被广泛应用,获得大量相关基因表达数据<sup>[13]</sup>。Xuan 等<sup>[14]</sup>从分子层面探究以大个体作为亲本在中华绒螯蟹育种工作中所具备的优势,通过转录组测序得到 324 个在中华绒螯蟹生殖、免疫以及生长等重要生理过程中发挥关键作用的差异表达基因。本研究结果显示,雌性中华绒螯蟹感染组和对照组共富集到 3 447 个差异表达基因,包括 1 424 个上调表达基因和 2 023 个下调表达基因;雄性中华绒螯蟹感染组和对照组共富集到 3 035 个差异表达基因,其中 1 462 个上调表达基因和 1 573 个下调表达基因,这表明嗜水气单胞菌的入侵诱导了中华绒螯蟹的非特异性免疫应答。雌蟹的差异表达基因较雄蟹更多,这提示雌蟹应对细菌侵染的响应机制与雄蟹可能有差异。Ren 等<sup>[15]</sup>借助二代测序技术,对感染副溶血弧菌和白斑综合症病毒及健康状态的日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 肝胰腺转录组进行测序,发现差异表达基因涵盖多种类型,如天冬氨酸蛋白水解酶在生理生化过程中发挥着特定的催化功能;抗菌蛋白对维持机体的免疫防御具有重要意义;泛素偶联蛋白 E2 参与细胞内的蛋白质修饰与调控等。Fang 等<sup>[16]</sup>为探究不饱和脂肪酸对三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 肝胰腺的影响,在三疣梭子蟹饲料中添加了不饱和脂肪酸,投喂 56 d 后进行转录组特征分析,发现共有 1 126 个基因的表达出现了显著变化。本研究中转录水平显著激活的基因主要涵盖模式识别受体家族 (Toll 样受体)、糖结合蛋白 (C 型凝集素)、应激响应分子 (热休克蛋白)、抗菌效应蛋白 (溶菌酶) 以及免疫调控因子 (干扰素诱导蛋白和泛素连接酶系统) 等功能类别,这表明中华绒螯蟹能够通过多维度免疫调控机制响应嗜水气单胞菌感染,特别是通过模式识别受体介导的病原识别通路及抗微生物效应通路的协同激活。

通过转录组获得的差异表达基因数据为剖析宿主免疫应答机制及免疫防御过程提供了数据基

础<sup>[17]</sup>。溶菌酶基因是甲壳动物重要的抗菌效应蛋白基因,其表达主要受 Toll 通路、免疫缺陷 (IMD) 通路及 JAK/STAT 信号通路调控<sup>[18]</sup>。本研究中,Toll 样受体基因的表达提示 Toll 通路可能通过调控抗菌肽基因的表达,促使溶菌酶等发挥抗菌或溶菌活性,从而应对嗜水气单胞菌的侵染。研究结果证实,热休克蛋白 Hsp70 可直接或间接参与阻断半胱天冬酶的激活过程<sup>[19]</sup>。本研究中,热休克蛋白 Hsp70 基因表达量显著上调,提示中华绒螯蟹在应对嗜水气单胞菌侵染时,可能通过阻断半胱天冬酶依赖型细胞凋亡途径发挥防御作用。肝凝集素 (HL) 属于 C 型凝集素超家族 (CTL) 成员,作为模式识别受体 (PRR),CTL 在固有免疫系统中扮演关键角色。在生物体内,CTL 广泛参与黏附、内吞、病原体识别及内毒素中和等生物学过程,其通过依赖  $Ca^{2+}$  的碳水化合物识别域,实现对病原体及细胞间相互作用的识别<sup>[20-23]</sup>。本研究中,肝凝集素基因表达量显著上调,表明其可能在中华绒螯蟹抗感染免疫中发挥作用,承担模式识别受体的功能。

本研究基于差异表达基因的 GO 分析结果显示,雄性中华绒螯蟹感染组显著富集的条目涵盖生物学过程 (BP)、分子功能 (MF)、细胞组分 (CC),而雌性中华绒螯蟹感染组只涵盖了生物学过程 (BP)、分子功能 (MF)。其中,雄性中华绒螯蟹感染组细胞组分中只有超分子纤维组装调控显著富集,分子功能包括催化活性显著富集,雌性中华绒螯蟹感染组分子功能显著富集到催化活性和酶结合。此外,大量差异表达基因富集于免疫相关进程,如免疫应答、细胞对刺激的反应、对其他微生物反应等。KEGG 富集分析结果表明,雌性中华绒螯蟹感染组与对照组显著富集的通路包含内质网中的蛋白质加工、泛素介导的蛋白质水解等;雄性中华绒螯蟹感染组和对照组显著富集溶酶体、吞噬体、嘌呤代谢等通路,表明雌性中华绒螯蟹和雄性中华绒螯蟹免疫相关通路表达上有差异。综上,嗜水气单胞菌感染会使中华绒螯蟹宿主产生强烈免疫应答,但也提示雌性和雄性中华绒螯蟹的先天性免疫可能存在性别二态性。

这些显著富集的通路在中华绒螯蟹抵御嗜水气单胞菌侵染的机制中有着关键作用。溶酶体作为先天免疫防御的重要参与者,能够借助吞噬作用以及在体液中释放水解酶的方式发挥免疫防御功能。当

溶酶体受到外界刺激导致细胞膜受损时,溶酶体中的水解酶将被释放到细胞质基质中,导致细胞损伤<sup>[24-26]</sup>。本研究中溶酶体通路存在差异表达基因,这或许与溶酶体的结构和功能遭受干扰相关。吞噬作用在抵御病原细菌感染时至关重要,它能够吞入并破坏入侵的外源物质<sup>[27-28]</sup>。吞噬流程分为3个关键步骤,即病原细菌吸附于吞噬细胞表面、抗原受体复合物形成吞噬体、吞噬体内部清除病原,在这个过程中,吞噬体依靠细胞骨架成分被运输至溶酶体<sup>[29]</sup>。本研究中,溶酶体和吞噬作用两个免疫相关的信号通路均被雄性中华绒螯蟹显著富集,这说明雄性中华绒螯蟹在对抗嗜水气单胞菌过程中吞噬作用和溶酶体通路可能协同发挥作用。动物应对外界异物侵染的生理响应是一个消耗能量的过程,维持蛋白质的结构、功能对于机体抵抗细菌侵染非常关键<sup>[30]</sup>,本研究结果显示,嗜水气单胞菌侵染对中华绒螯蟹的能量代谢及蛋白质加工相关通路存在显著影响。其中,糖酵解通路基因表达发生明显变化,这表明中华绒螯蟹可能通过调节糖类利用与能量代谢效率来应对嗜水气单胞菌的侵染。而内质网中的蛋白质加工、泛素介导的蛋白质水解等过程,原本对维持蛋白质的结构与功能、修复细胞膜具有重要作用,在中华绒螯蟹应对嗜水气单胞菌侵染过程中或许出现了蛋白质加工合成异常。

## 4 结论

本研究利用 RNA-Seq 技术对嗜水气单胞菌感染后的中华绒螯蟹的免疫应答进行分析,获取了大量显著差异表达基因,涵盖溶酶体、内质网中的蛋白质加工、泛素介导的蛋白质水解、糖酵解途径、吞噬作用以及嘌呤代谢等,其中免疫信号通路尤为关键,同时初步分析了雌性和雄性中华绒螯蟹应对细菌侵染的分子差异。本研究结果为阐明中华绒螯蟹针对嗜水气单胞菌侵染的应答机制提供了参考依据,丰富了中华绒螯蟹的基因转录表达数据库,同时为后续开展中华绒螯蟹抗病育种提供了数据基础。

### 参考文献:

- [1] 赵大显,陈立侨. 中华绒螯蟹免疫相关基因的研究进展[J]. 水产科学,2010,29(4):243-248.
- [2] 吴淑勤,王亚军. 我国水产养殖病害控制技术现状与发展趋势[J]. 中国水产,2010(8):9-10.
- [3] 王晶晶,方苹,陈静,等. 2021年江苏省河蟹养殖病情监测分析[J]. 水产养殖,2022,43(12):69-74.
- [4] 宫子慧,孙修云,王守军,等. 泗洪县河蟹养殖细菌性疾病病原菌分离、鉴定和药敏试验[J]. 科学养鱼,2019(2):45-47.
- [5] 郑世雄. 池塘养殖中华绒螯蟹细菌性疾病的病原鉴定及流行病学调查[D]. 合肥:安徽农业大学,2013.
- [6] ZHANG X N, SHEN G Q, GUO Y N, et al. Genome-wide identification and analysis of the MAPKK gene family in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and its response to bacterial challenge [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 143:109132.
- [7] 赵庆. 魁蚶血红蛋白基因的克隆及功能分析[D]. 上海:上海海洋大学,2018.
- [8] 沈锦玉,尹文林,钱冬,等. 中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病原的研究[J]. 中国水产科学,2000,7(3):89-92.
- [9] 姜艳丽,李丽丽. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2015(2):142-146.
- [10] 张瑶. 中华绒螯蟹肝胰腺病症的病理分析[D]. 上海:上海海洋大学,2013.
- [11] ZHANG Y, LI Z Y, KHOLODKEVICH S, et al. Cadmium-induced oxidative stress, histopathology, and transcriptome changes in the hepatopancreas of freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 666:944-955.
- [12] REN X Y, PAN L Q, WANG L. The detoxification process, bioaccumulation and damage effect in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to chrysene [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 114:44-51.
- [13] CHENG C H, MA H L, DENG Y Q, et al. Effects of *Vibrio parahaemolyticus* infection on physiological response, histopathology and transcriptome changes in the mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106:197-204.
- [14] XUAN F J, FU L L, ZHAO X Y, et al. Molecular dominance investigation of large-sized Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) parents based on the male accessory gland transcriptome [J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(8):3498-3507.
- [15] REN X Y, LIU P, LI J. Comparative transcriptomic analysis of *Marsupenaeus japonicus* hepatopancreas in response to *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87:755-764.
- [16] FANG F, YUAN Y, JIN M, et al. Hepatopancreas transcriptome analysis reveals the molecular responses to different dietary n-3 PUFA lipid sources in the swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Aquaculture*, 2021, 543:737016.
- [17] 刘文静,杨丽诗,李晓兰,等. 斑节对虾 Relish 基因的克隆及免疫刺激对其 mRNA 表达水平的影响[J]. 中国水产科学,2013, 20(1):50-60.
- [18] LI F H, XIANG J H. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(4):973-980.
- [19] HENNESSY F, NICOLL W S, ZIMMERMANN R, et al. Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions [J]. *Protein Science*, 2005, 14(7):

- 1697-1709.
- [20] 谢建辉, 顾建新. C 型凝集素[J]. 生命科学, 2011, 23(6): 555-562.
- [21] 刘鑫潮. 罗非鱼肝凝集素基因的鉴定及其功能研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2021.
- [22] ZHANG X W, WANG Y, WANG X W, et al. A C-type lectin with an immunoglobulin-like domain promotes phagocytosis of hemocytes in crayfish *Procambarus clarkii* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29924.
- [23] YANG Q Y, WANG P, WANG S, et al. The hepatic lectin of zebrafish binds a wide range of bacteria and participates in immune defense[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 82: 267-278.
- [24] DUAN Y F, ZHANG J S, DONG H B, et al. Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(2): 354-365.
- [25] GUO H, LI K X, WANG W, et al. Effects of copper on hemocyte apoptosis, ROS production, and gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Biological Trace Element Research, 2017, 179(2): 318-326.
- [26] HONG Y H, YIN H M, HUANG Y, et al. Immune response to abamectin-induced oxidative stress in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 188: 109889.
- [27] 王超, 张龙岗, 吴蒙蒙, 等. 吞噬作用在尼罗罗非鱼抵抗嗜水气单胞菌感染过程中的重要作用[J]. 中国水产科学, 2020, 27(3): 346-354.
- [28] ZHAO L J, TU J G, ZHANG Y L, et al. Transcriptomic analysis of the head kidney of Topmouth *Culter* (*Culter alburnus*) infected with *Flavobacterium columnare* with an emphasis on phagosome pathway[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 57: 413-418.
- [29] 于明. 嗜水气单胞菌感染大口黑鲈肝脏组织 mRNA 与 miRNA 组学联合分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2024.
- [30] 刘凯, 谢楠, 戴瑜来, 等. 基于转录组测序技术研究三角鲂和团头鲂抗嗜水气单胞菌感染基因表达差异[J]. 渔业研究, 2022, 44(4): 301-311.

(责任编辑: 黄克玲)