

李敬, 张翼翎, 杨丰, 等. 红螯螯虾不同血细胞亚群的比较转录组学分析[J]. 福建农业学报, 2025, 40 (2): 132–142.

LI J, ZHANG Y L, YANG F, et al. Transcriptomics of Hemocyte Subpopulations in *Cherax quadricarinatus* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2025, 40 (2): 132–142.



红螯螯虾不同血细胞亚群的比较转录组学分析

李 敬, 张翼翎, 杨 丰, 李 钊*

(自然资源部第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘 要:【目的】半颗粒细胞 (semigranular cell, SGC) 和颗粒细胞 (granular cell, GC) 是螯虾循环血细胞的两大主要类群, 它们代表了处于不同发育阶段的具有免疫功能的血细胞。了解 SGC 和 GC 的功能, 可为深入研究甲壳动物血细胞亚群提供基础数据。【方法】以红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 为试验对象, 运用 Percoll 不连续密度梯度离心法分离纯化 SGC 和 GC; 然后对 SGC 和 GC 进行转录组测序, 并进行差异分析、GO 富集分析以及 KEGG 富集分析, 以探究他们在功能上的差异; 最后用实时定量 RT-PCR 对部分差异基因的表达进行验证。【结果】测序获得了红螯螯虾血细胞的非冗余唯一基因 (unigene) 共 116 199 个。这些 unigenes 的平均长度为 763 bp, N50 为 1 313 bp。经对比共发现了 4 488 个差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 其中 3 951 个基因在 SGC 中高度表达, 537 个基因在 GC 中高度表达。GO 富集分析结果显示: 在细胞组分类别中, SGC 共富集到 7 个条目, GC 共富集到 10 个条目; 在分子功能类别中, SGC 共富集到 31 个条目, GC 共富集到 60 个条目; 在生物过程类别中, SGC 共富集到 154 个条目, GC 共富集到 102 个条目。KEGG 富集分析结果显示, SGC 共富集到 44 条通路, GC 共富集到 10 条通路。【结论】在 SGC 中高度表达的 DEGs 主要与细胞增殖、分化、基因表达调控、酶产生、内吞作用和细胞黏附有关; 在 GC 中高度表达的 DEGs 主要与跨膜转运、代谢、酚氧化酶系统、吞噬作用和抗菌肽的产生有关。

关键词: 比较转录组; 半颗粒细胞; 颗粒细胞; 血细胞功能

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2025) 02-0132-11

Transcriptomics of Hemocyte Subpopulations in *Cherax quadricarinatus*

LI Jing, ZHANG Yiling, YANG Feng, LI Fang*

(Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen, Fujian
361005, China)

Abstract: 【Objective】 Transcriptomics of the two primary subpopulations of circulating hemocytes representing the distinct stages of immune cell differentiation in crayfish, semi-granular cell (SGC) and granular cell (GC), was studied. 【Methods】 SGC and GC in *Cherax quadricarinatus* were isolated and purified by means of Percoll discontinuous density gradient centrifugation. Transcriptome sequencing and analyses of differential expression, gene ontology (GO) enrichment, and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment on them were conducted. RT-qPCR was employed to validate the expressions of the differentially expressed genes (DEGs). 【Results】 The sequencing identified 116 199 unigenes in the *C. quadricarinatus* hemocytes with an average length of 763 bp and an N50 of 1 313 bp. The 4 488 DEGs included 3 951 significantly upregulated in SGC and 537 in GC. On cellular components, there were 7 GO enrichment bands in SGC and 10 in GC; on molecular functions, 31 in SGC and 60 in GC; and on biological processes, 154 in SGC and 102 in GC. The KEGG analysis found 44 pathways enriched in SGC and 10 in GC. 【Conclusion】 The DEGs enriched in SGC primarily involved in cellular proliferation, differentiation, transcriptional regulation, enzyme synthesis, endocytosis, and adhesion processes. Whereas those enriched in GC were basically associated with the transmembrane transport, metabolic pathways, prophenoloxidase system, phagocytosis, and antimicrobial peptide synthesis.

Key words: comparative transcriptomics; semi-granular cells; granular cells; hemocyte function

收稿日期: 2024-09-17 修回日期: 2024-12-10

作者简介: 李敬 (1995—), 男, 硕士, 主要从事经济甲壳动物病原与免疫研究, E-mail: 840878782@qq.com

* 通信作者: 李钊 (1977—), 女, 博士, 研究员, 主要从事经济甲壳动物病原与免疫研究, E-mail: lifang@tio.org.cn

基金项目: 国家虾蟹产业技术体系建设专项 (CARS-48)

0 引言

【研究意义】包括对虾、螯虾、蟹等在内的十足目 (Decapoda) 动物是十分重要的海水或淡水养殖动物, 具有重大的商业价值。随着经济甲壳动物养殖规模的扩大和养殖密度的提高, 病害问题日益严重, 制约了水产养殖业的健康发展。认识甲壳动物免疫系统、研究其作用机制是解决病害问题不可或缺的环节之一。了解不同血细胞类群的差异是认识免疫系统的基础。然而目前就甲壳类动物血细胞的功能尚未达成共识。【前人研究进展】甲壳动物依靠高效的天然免疫系统抵御细菌、病毒等病原体的入侵^[1]。血细胞是甲壳类动物免疫系统的关键参与者, 参与多种免疫过程, 如吞噬、包裹、黑色素化和凝血^[1,2]。长期以来, 甲壳类动物血细胞主要根据其形态特征分为三大类, 即颗粒细胞 (granular cell, GC)、半颗粒细胞 (semigranular cell, SGC) 和透明细胞 (hyaline cell, HC)^[1,2]。早期的研究假设 SGC 和 GC 是属于两个不同谱系的成熟血细胞, 而 HC 是循环中罕见的未成熟细胞^[3-5]。最近, 通过追踪血细胞的分化过程, 发现红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 血细胞是沿着一个谱系发育, 即 GC 谱系^[6]。GC 和 SGC 是处于不同发育阶段的同一谱系的血细胞。SGC 和 GC 都是功能性免疫细胞。具体来说, SGC 负责针对大型异物的包裹作用^[7], 包裹是一种关键的免疫反应机制, 可以捕获和清除入侵的病原体^[1,8]。GC 则负责储存和释放包括酚氧化酶原、抗菌肽、活性酶以及凝集素等在内的免疫活性因子^[9,10]。此外, 研究表明 HC、SGC 和 GC 均具有吞噬能力, 但不同细胞吞噬的对象有所不同^[7,9,11]。细胞的功能, 最终是由其表达的基因所决定的。鉴于血细胞在免疫中的关键性作用, 有许多研究采用转录组学方法分析凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*)、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 等甲壳动物的血细胞对病原感染的响应^[12-17]。【本研究切入点】绝大多数研究将循环血细胞作为一个整体进行分析, 因此无法得知不同细胞类群之间的差异。不同发育阶段血细胞功能的分子基础尚未完全清晰。【拟解决的关键问题】本研究以红螯螯虾为试验模型, 通过密度梯度离心分离红螯螯虾的两个优势血细胞群 SGC 和 GC, 并通过转录组测序比较其基因表达谱, 从基因表达的层面解析 SGC 和 GC 在功能上的差异, 深入探究甲壳动物血细胞的功能分化, 以及不同类群细胞对病原感染的响应, 进一步探究两种血

细胞群功能及分化和成熟过程的机理。

1 材料与方法

1.1 试验动物

红螯螯虾 [平均体重 (55 ± 5) g, 雄性] 购自广东省汕头市某养殖场。饲养于 25 °C 左右的淡水中, 每两日换水一次, 每日投喂饲料一次, 在实验室条件下适应 7 d 后用于后续试验。试验动物使用前经实时荧光定量 PCR 检测, 确认未感染白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 和十足目彩虹病毒 1 (decapod iridescent virus 1, DIV1)。病原检测采用厦门智汇联丰生物科技有限公司生产的白斑综合征病毒荧光定量 PCR 检测试剂盒和十足目彩虹病毒 1 荧光定量 PCR 检测试剂盒。

1.2 SGC 和 GC 的分离和收集

依据本实验室建立的 Percoll 不连续密度梯度离心法分离纯化 SGC 和 GC^[18]。从红螯螯虾体内收集血淋巴, 并立即与等体积的抗凝剂溶液 (26 mmol·L⁻¹ 柠檬酸钠、30 mmol·L⁻¹ 柠檬酸、100 mmol·L⁻¹ 葡萄糖、70 mmol·L⁻¹ NaCl、10 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 5.8) 混合。4 °C 下 350×g 离心 5 min, 去除上清后将细胞重新悬浮在 0.5 倍抗凝剂溶液中。将 200 μL 细胞悬液 (浓度为 1×10^7 个·mL⁻¹) 加到 Percoll 的不连续密度梯度体系中 (由 1 mL 20%、2 mL 70%、0.3 mL 100% Percoll 组成)。梯度系统于 4 °C 下 500×g 离心 30 min。分别收集位于 20%~70% Percoll 的 SGC 以及位于 70%~100% Percoll 的 GC。用 5 倍体积的 0.5 倍抗凝剂溶液稀释, 在 4 °C 下以 500×g 离心 5 min 以收获细胞。通过流式细胞术和显微镜分析 GC 和 SGC 的纯度, 在随后的试验中使用纯度大于 98% 的细胞。共采集三组血细胞 (C1、C2 和 C3) 用于 SGC 和 GC 的制备, 每组采集 10~20 只红螯螯虾的血细胞。

1.3 RNA 提取

使用 TRIzol™ 试剂 (Thermo Fisher Scientific) 从细胞中提取总 RNA, 并采用 Evo M-MLV RT Mix 试剂盒 (Accurate Biology) 中的 gDNA Clean Reaction Mix 消除基因组 DNA 污染。

1.4 文库制备和测序

文库制备和测序由广州基迪奥生物技术有限公司完成。利用 Oligo (dT) 珠子富集 mRNA, 采用 Fragmentation Buffer 将富集的 mRNA 片段化, 并用随机引物将 mRNA 片段反转录成 cDNA。然后用 QiaQuick PCR 提取试剂盒 (Qiagen, Venlo, Netherlands) 纯化 cDNA 片段, 进行末端修复, 加入

poly (A) 尾, 并连接上 Illumina 接头。连接产物经琼脂糖凝胶电泳选择大小 (200~300 bp), PCR 扩增后使用 Illumina HiSeq™ 4000 进行测序。

1.5 生物信息学分析

测序得到的原始序列由 Trinity 进行组装^[19]。然后用 RSEM 软件对组装的非冗余唯一基因 (unigene) 进行定量分析^[20]。使用 BLASTx 程序和 NCBI 非冗余蛋白质 (NR) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)、Swiss-Prot 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org/>)、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库 (<http://www.kegg.jp/>) 和 COG 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) 对得到的 unigenes 进行注释, e 值阈值为 1×10^{-5} 。计算单基因表达量, 并归一化为 FPKM 值 (fragment per kilobase of transcript per million mapped reads)^[21]。采用 DESeq2 软件进行两组间 RNA 差异表达分析。其

中错误发现率 (false discovery rate, FDR) <0.05 且差异倍数 (fold change) 的绝对值 ≥ 2 的基因被认为是两组间的差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG)。然后将每组的 DEG 进行比较, 以在 3 个生物重复中筛选常见的 DEG。对平均 FPKM ≥ 1 的常见 DEG 进行 GO 和 KEGG 富集分析。

1.6 实时荧光定量 RT-PCR

使用 *Evo M-MLV* RT Mix 试剂盒 (Accurate Biology) 合成 cDNA, 并使用 SYBR Green *Pro Taq* HS Premix (Accurate Biology) 试剂盒进行实时定量 RT-PCR 分析, 引物见表 1。反应先在 95 ℃ 下进行 1 min 的预变性, 然后进行 40 个循环的扩增 (95 ℃, 15 s; 57 ℃, 30 s; 72 ℃, 45 s), 后从 60 ℃ 加热至 80 ℃ 以产生溶解曲线, 预计产物长度在 150~250 bp。以红螯螯虾 *β-actin* 为内参基因, 参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量^[22]。试验重复 3 次。

表 1 实时定量 RT-PCR 中使用的引物序列
Table 1 Sequences of primers for RT-qPCR

基因ID	注释Annotation	引物序列 (5'-3') Primer sequence(5'-3')
Unigene0075897	c型溶菌酶	F: GTTAGCGTGCTCGTGTTG
		R: TCCCGTAGACTTTTGCCG
Unigene0027599	半乳糖特异性凝集素	F: ATTGGTGGGGCTGGAAGA
		R: TTTGAGTGTGATTGAGCAGAAGTA
Unigene0049690	造血因子2a	F: TAACCTTCACTACCCCAACAAT
		R: ACCAGTCCAGCTCCGCA
Unigene0022931	酚氧化酶原激活因子3	F: GGGTTGATAATGCTTCCTTC
		R: TGCTTGCTGGTCACTGGT
Unigene0112798	造血因子变种3	F: CCAGTTGGCTGCCTCACA
		R: GACCACGACCGACTTTGC
Unigene0006621	甲壳素1	F: TACAACACACTCGCAGCATCT
		R: GCAGTCTGGGGGAACC
内参基因 Internal reference gene	β-肌动蛋白	F: ATTACCATCCAGGCTGTGCT
		R: GGGCGAAACCTTCATACACG

2 结果与分析

2.1 序列分析和基因功能注释

从红螯螯虾血细胞获得 6 个 cDNA 文库, 3 个来自 SGC, 3 个来自 GC, 在 Illumina HiSeq™ 4000 平台进行测序。总共获得 17.5 Gb 的原始数据, 将其存储在 国家基因组学数据中心 GSA 数据库中, 登录号为 CRA009714 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa>)。测序总共获得 2.57 亿原始读长 (raw reads), 其中 GC 样本

中获得 1.31 亿个, SGC 样本中获得约 1.26 亿个。超过 99% 的 reads 符合质量标准。过滤后的高质量读数被组装成 116199 个基因, 长度 201~20262 bp, 平均长度 763 bp, N50 为 1313 bp。组装结果通过 BUSCO 验证^[23]。

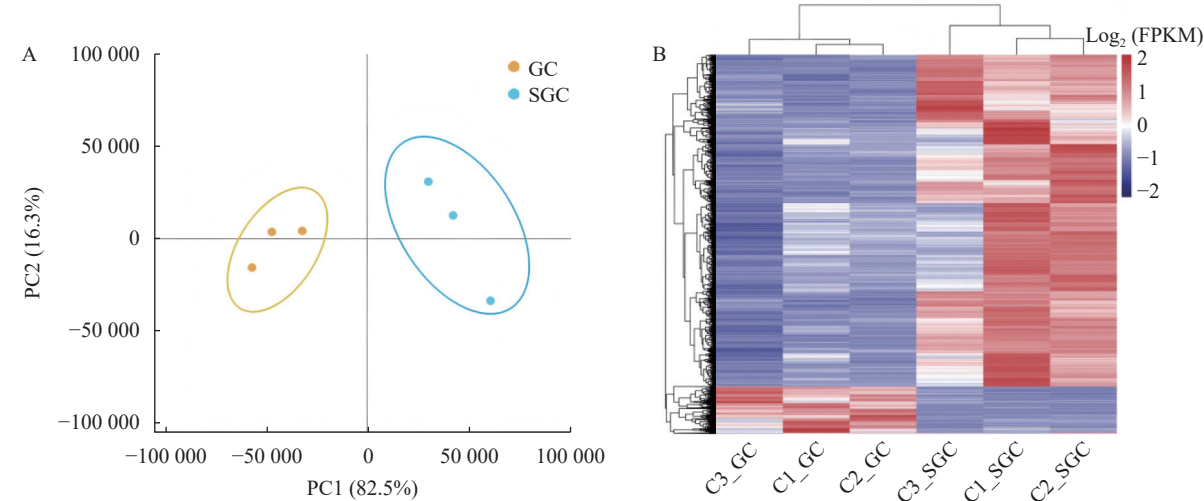
用主要数据库对获得的基因进行注释, 分别有 36.94%、24.77%、18.24% 和 21.12% 的基因在 NR、KEGG、COG/KOG 和 Swiss-Prot 数据库中被注释; 总共有 45570 个单基因被成功注释, 占总数的

39.22%。

2.2 SGC 和 GC 差异表达基因的转录组学分析

为了比较 SGC 和 GC 的基因表达谱，对从 3 个生物学重复（C1、C2 和 C3）获得的数据进行 PCA

分析。PCA 结果显示，来自相同细胞类群的转录本紧密聚集，不同细胞类群的转录本彼此分离（图 1A），表明 SGC 和 GC 之间基因表达存在很大差异。



A: 红螯螯虾血细胞亚群（SGC 和 GC）主成分分析；B: 基因表达热图分析。

A: PCA on hemocyte subpopulations, SGC and GC; B: gene expression heatmap.

图 1 红螯螯虾 SGC 和 GC 的主成分分析和 DEGs 表达热图

Fig. 1 PCA and DEG expression heat map of *C. quadricarinatus* SGC and GC

对 SGC 和 GC 进行 DEG 筛选，最终筛选出 4488 个常见的 DEG，3951 个基因在 SGC 中高度表达，537 个基因在 GC 中高度表达（图 1B）。

2.3 DEGs 的功能富集

为了解不同血细胞类群之间的功能差异，对在 SGC 中特异性高表达的 3951 个基因和在 GC 中特异性高表达的 537 个基因分别进行 KEGG、GO 富集分析。

2.3.1 GO 富集分析

GO 富集分析结果显示：在细胞组分（cellular component, CC）类别中，SGC 中高表达的 DEG 富集于 7 个 GO 条目，分别为核（nucleus）、内质网腔（endoplasmic reticulum lumen）、微管组织中心（microtubule organizing center）、剪切复合体（spliceosomal complex）、染色体及端粒区（chromosome, telomeric region）、大核糖体亚基（large ribosomal subunit）、基底膜（basement membrane）（图 2A）。GC 中高表达的 DEG 富集于 10 个 GO 条目，包括胞外区（extracellular region）、胞外区域的部分（extracellular region part）、膜（membrane）、细胞表面（cell surface）、膜的组成部分（integral component of membrane）、质膜外侧（external side of plasma membrane）、膜的固有成分（intrinsic component of membrane）、膜部分

（membrane part）、膜的侧面（side of membrane）、内肽酶 Clp 复合物（endopeptidase Clp complex）（图 2B）。

在分子功能（molecular function, MF）类别中，SGC 高表达的 DEG 富集于 31 个 GO 条目（图 3A）；其中有 21 个与酶活性相关，包括脂肪酶活性（lipase activity）、磷脂酶活性（phospholipase activity）、乳酸脱氢酶活性（lactate dehydrogenase activity）；14 个与信号转导有关，特别是与细胞增殖和分化有关的信号转导，包括果蝇母抗同源序列蛋白（drosophila mothers against decapentaplegic protein, SMAD）结合（SMAD binding）、环核苷酸依赖性蛋白激酶活性（cyclic nucleotide-dependent protein kinase activity）和 G 蛋白偶联受体活性（G-protein coupled receptor activity）；5 个与 DNA 修复和转录有关，包括错配碱基对 DNA N-糖苷酶活性（mismatch base pair DNA N-glycosylase activity）、DNA N-糖苷活性（DNA N-glycosylase activity）和核酸结合（nucleic acid binding）。GC 高表达的 DEG 富集于 60 个 GO 条目（图 3B）；其中 36 个与跨膜转运有关，包括转运活动（symporter activity）、跨膜转运活性（transmembrane transporter activity）、通道活动（channel activity）、底物特异性转运蛋白质活性（substrate-specific transporter activity）、主动跨膜转

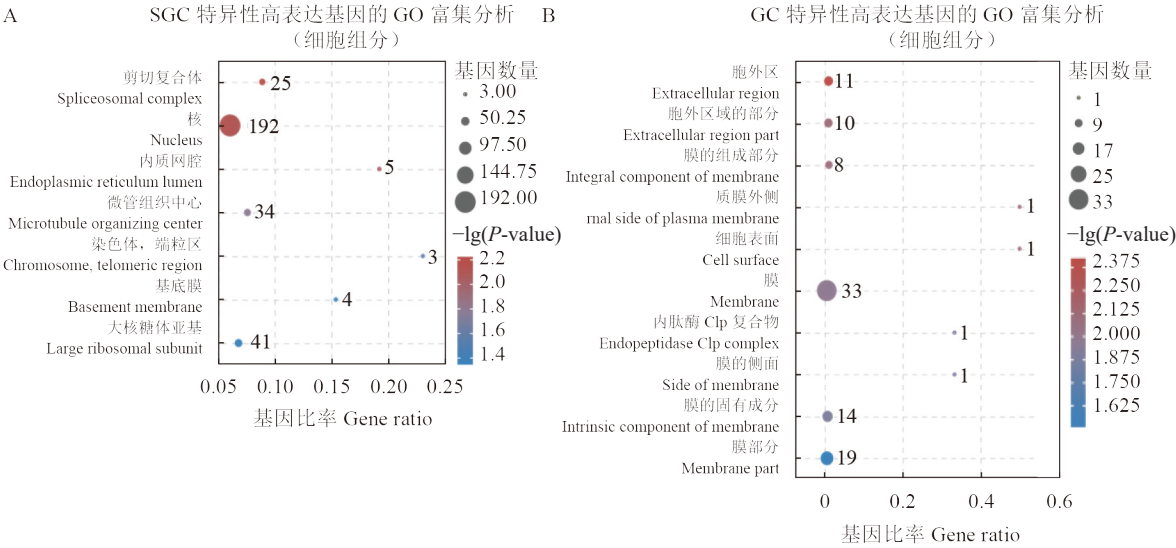
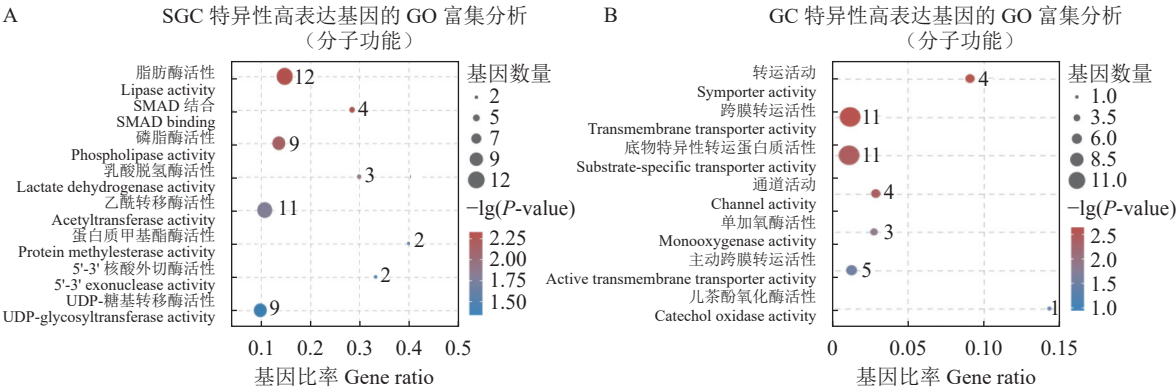


图 2 SGC 或 GC 特异性高表达基因的 GO 富集分析 (细胞组分)
Fig. 2 GO enrichment of SGC or GC up-regulated genes (cellular component)



仅展示部分 P 值显著、富集基因数量多的条目。图 4、5 同。

Only representative bands with minimal P -values and maximum enriched gene counts are shown. Same for Fig.4, 5.

图 3 SGC 或 GC 特异性高表达基因的 GO 富集分析 (分子功能)
Fig. 3 GO enriched bands of up-regulated genes in SGC and GC (on molecular functions)

运活性 (active transmembrane transporter activity) 等; 6 个与氧化活性相关, 包括单加氧酶活性 (monooxygenase activity)、儿茶酚氧化酶活性 (catechol oxidase activity) 等; 3 个与病原体识别相关, 分别为多糖结合 (polysaccharide binding)、模式结合 (pattern binding) 和碳水化合物结合 (carbohydrate binding)。

在生物过程 (biological process, BP) 类别中, SGC 高表达的 DEG 富集于 154 个 GO 条目 (图 4A)。其中, 与生长发育相关的条目共有 71 个, 包括多细胞生物生长 (multicellular organism growth)、细胞命运决定 (cell fate determination)、BMP 信号通路 (BMP signaling pathway)、心脏内皮细胞分化 (cardiac endothelial cell differentiation)、想象椎间盘模式形成 (imaginal disc pattern formation)、结缔组织发育 (connective tissue development); 有 29 个条

目与 DNA 复制、修复和转录有关, 包括核酸代谢过程 (nucleic acid metabolic process)、基因表达 (gene expression) 和通过剪接体进行 mRNA 剪接 (mRNA splicing via spliceosome)。与细胞迁移和黏附相关的 11 个条目, 包括细胞基质黏附 (cell-substrate adhesion)、细胞黏附 (cell adhesion) 和细胞迁移 (cell migration); 以及与受体介导的内吞作用相关的 5 个条目, 包括受体内化调节 (regulation of receptor internalization)、受体介导的内吞作用的调节 (regulation of receptor-mediated endocytosis) 和内吞作用调控 (regulation of endocytosis)。GC 高表达的 DEG 富集于 102 个 GO 条目 (图 4B); 其中有 42 个与代谢相关, 包括硫化化合物代谢过程 (sulfur compound metabolic process)、多巴胺代谢过程 (dopamine metabolic process)、含酚化合物代谢过程 (phenol-containing compound metabolic process) 和

细胞胺代谢过程调节 (regulation of cellular amine metabolic process); 13 个与免疫相关的条目, 包括对细菌的防御反应 (defense response to bacterium)、吞噬作用与识别 (phagocytosis, recognition)、抗菌体液反应 (antibacterial humoral response)、巨噬细胞因子产生 (macrophage cytokine production)。

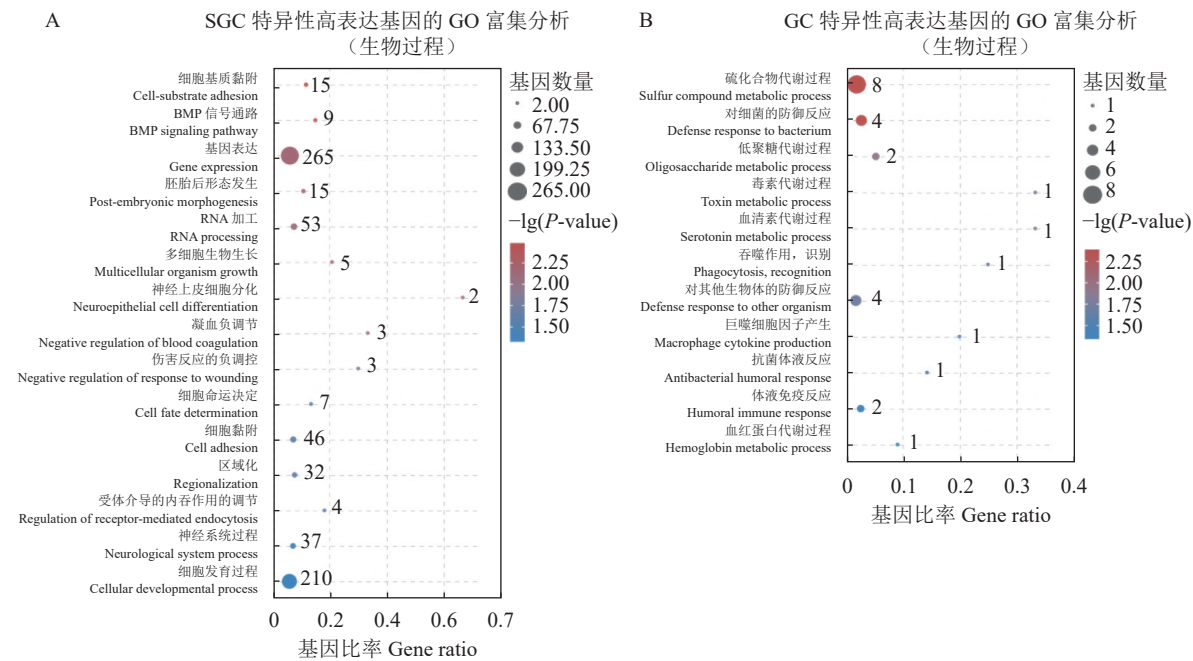


图 4 SGC 或 GC 特异性高表达基因的 GO 富集分析 (生物过程)

Fig. 4 GO enriched bands of up-regulated genes in SGC and GC (on biological processes)

综上, GO 富集分析表明, SGC 高度表达参与细胞增殖、分化和发育的基因, 在基因表达和酶生产方面尤其活跃。GC 高度表达与代谢和代谢物转运相关的基因。作为功能性免疫细胞, SGC 高度表达参与细胞黏附、迁移和内吞作用的基因, 而 GC 高度表达涉及细胞识别、细胞因子产生、吞噬作用和氧化还原过程调节的基因。

2.3.2 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析结果显示: SGC 高表达基因富集于 44 个通路中 (图 5A), 其中 7 个与细胞分化和发育有关, 包括 TGF-β 信号通路 (TGF-beta signaling pathway)、VEGF 信号通路 (VEGF signaling pathway)、Wnt 信号通路 (Wnt signaling pathway) 等; 6 个与免疫反应有关, 包括 TRP 通道的炎症介质调节 (inflammatory mediator regulation of TRP channels)、趋化因子信号通路 (chemokine signaling pathway); 3 个与基因表达有关, 包括真核生物核糖体生物合成 (ribosome biogenesis in eukaryotes)、核糖体 (ribosome) 和剪接体 (spliceosome)。此外, SGC 中还富集了与细胞黏附相关的 4 条通路, 如细胞黏附分子 (cell adhesion molecules)、黏附连接 (adherens junction) 和 ECM 受体相互作用 (ECM-receptor interaction); 与神经系统相关的 4 个通路, 包括

吗啡成瘾 (morphine addiction)、轴突再生 (axon regeneration) 和血清素能突触 (serotonergic synapse)。在这些通路中, 参与多种细胞过程的一些关键调节因子, 包括 SMAD、STAT、notch、MAPK、CREB 和 PKA 的同源物, 在 SGC 中高度表达。

相比之下, GC 的基因表达谱较为简单。GC 高表达的基因在 11 个通路中富集 (图 5B); 其中 5 个与代谢有关, 包括谷胱甘肽代谢 (glutathione metabolism)、花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism) 和肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis); 2 个与蛋白质翻译有关, 包括真核生物核糖体生物合成 (ribosome biogenesis in eukaryotes) 和核质运输 (nucleocytoplasmic transport)。此外, 免疫相关途径补体和凝血级联 (complement and coagulation cascades) 也得到了富集。在 GC 中, 参与激活酚氧化酶原 (prophenoloxidase, proPO) 的几种蛋白质显著上调, 包括酚氧化酶原激活因子 (prophenoloxiase activating factors, PPAFs)、丝氨酸蛋白酶 SP7 和 SERPINB1。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 等抗氧化酶也高度表达。

KEGG 富集分析表明, SGC 在基因转录中特别

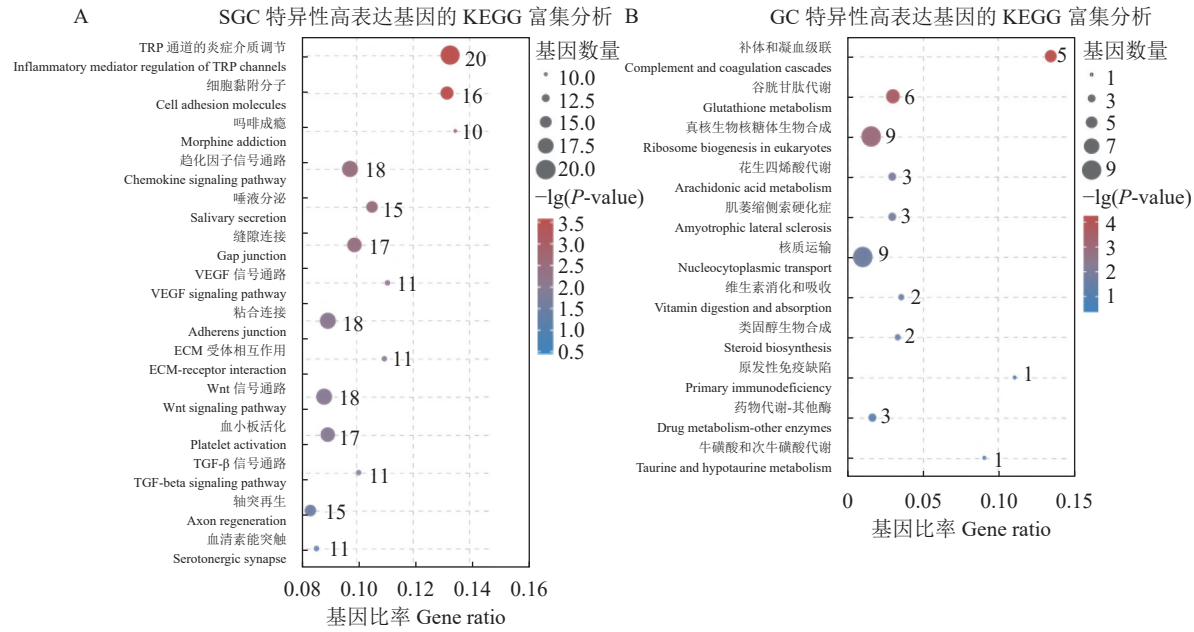


图 5 SGC 或 GC 特异性高表达基因的 KEGG 富集分析
Fig. 5 KEGG enriched bands of up-regulated genes in SGC and GC

活跃，高度表达参与细胞增殖和发育的基因。而 GC 在蛋白质的合成、代谢以及 proPO 系统组分的生产中很活跃。

2.3.3 SGC 和 GC 中差异表达的其他基因

由于 KEGG 和 GO 仅对红螯螯虾血细胞的一部分基因进行了分析，一些 DEG 未涵盖在富集分析

中，这些基因也可能对 SGC 和 GC 的功能分化产生重要作用。表 2 显示了一些与免疫系统相关的 DEG。其中，HPT 因子 9、Notch 同源蛋白 1、转谷氨酰胺酶、钙蛋白酶 B、半乳糖特异性凝集素、锌指蛋白 544 样亚型 X3、造血因子 2a 在 SGC 中高表达。转谷氨酰胺酶是凝血和免疫的关键分子^[24,25]，它

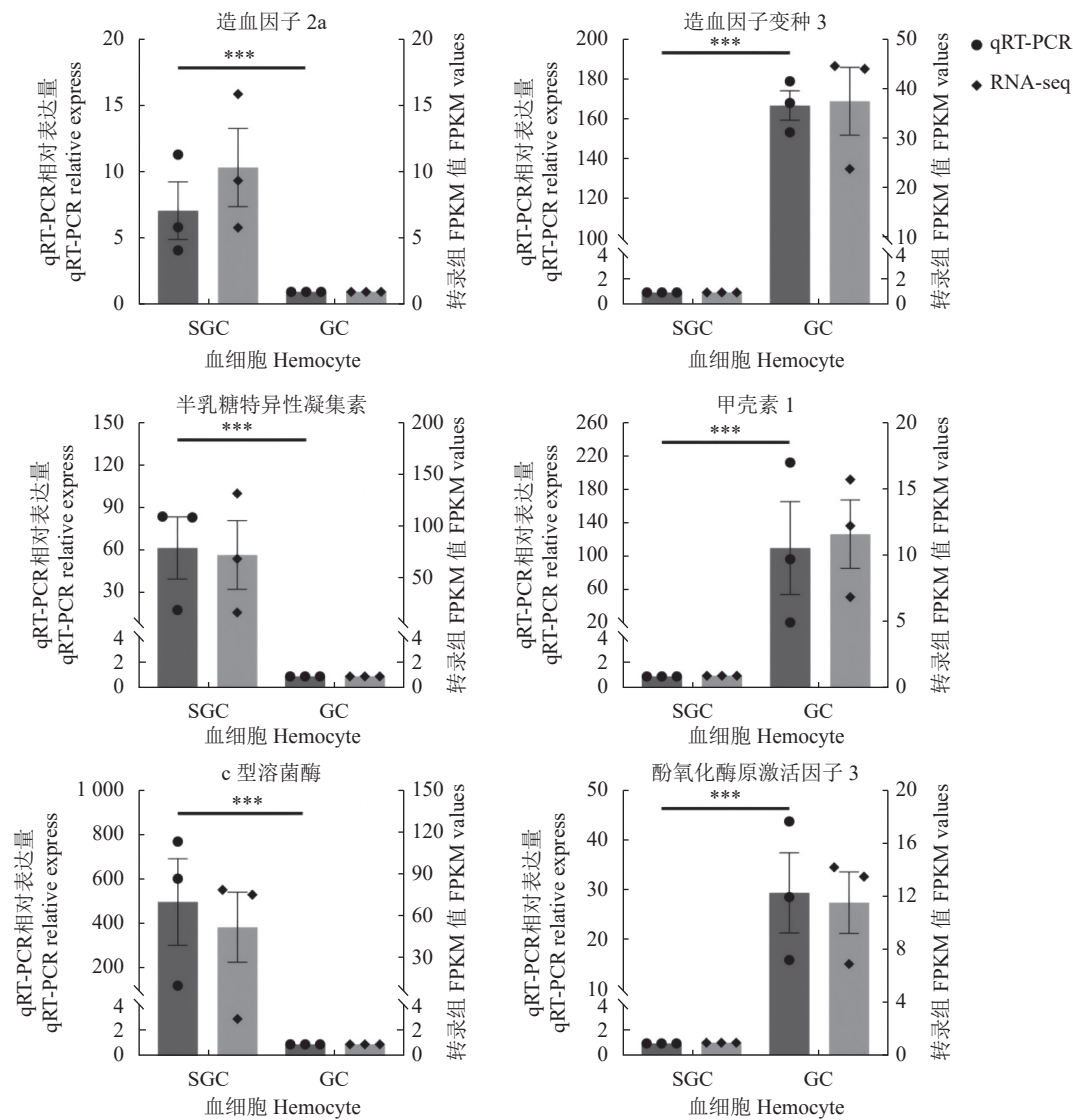
表 2 基于 FPKM 值的两个血细胞亚群差异表达基因
Table 2 DEGs between SGC and GC based on FPKM value

基因ID	平均表达量 FPKM		注释 Annotation
	SGCs	GCs	
Unigene0005146	5568.05	66.81	HPT因子9 HPT factor 9 [通讯螯虾 <i>Pacifastacus leniusculus</i>]
Unigene0034901	3514.74	50.20	NOTCH同源蛋白1 Predicted neurogenic locus notch homolog protein 1-like [美洲钩虾 <i>Hyaella Azteca</i>]
Unigene0070406	3468.68	36.63	转谷氨酰胺酶 Transglutaminase [通讯螯虾 <i>Pacifastacus leniusculus</i>]
Unigene0043100	2227.69	43.31	钙蛋白酶B Calpain B [侧身地蟹 <i>Gecarcinus lateralis</i>]
Unigene0081651	1817.96	32.81	半乳糖特异性凝集素 (galactose-specific lectin nattectin-like protein, partial) [克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>]
Unigene0044871	1604.99	15.45	伸展蛋白结构域 Extensin-like [中国地鼠 <i>Cricetulus griseus</i>]
Unigene0025602	986.96	12.41	锌指蛋白544样亚型X3 Zinc finger protein 544-like isoform X3 [双条吻蚓 <i>Rhinatrema bivittatum</i>]
Unigene0049690	246.33	28.40	造血因子2a Astakine 2a [通讯螯虾 <i>Pacifastacus leniusculus</i>]
Unigene0006621	1295.81	12639.05	甲壳素1 Crustin 1 [克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>]
Unigene0085460	1806.77	6228.55	酚氧化酶原 Prophenoloxidase [红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>]
Unigene0106531	1065.41	3376.95	甲壳素2 Crustin 2 [红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>]
Unigene0045189	265.39	2496.35	甘露糖结合蛋白 Mannose-binding protein [通讯螯虾 <i>Pacifastacus leniusculus</i>]
Unigene0112798	53.04	1839.86	造血因子变种3 Astakine variant 3 [斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>]
Unigene0013166	27.08	1283.46	细胞黏附蛋白 Peroxinectin [克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>]

还通过控制年轻血细胞的释放在造血中发挥作用^[26]。半乳糖特异性凝集素是一种 C 型凝集素 (C-type lectins)，参与先天免疫、发育、免疫调节和稳态^[27]。另一方面，甲壳素 1、酚氧化酶原、甲壳素 2、甘露糖结合蛋白、造血因子变种 3、细胞黏附蛋白在 GC 中高表达。甲壳素是甲壳类动物中的一种抗菌肽，具有抗革兰氏阳性细菌的活性^[28]。甘露糖结合蛋白是在病原体识别中起作用的模式识别分子^[29]。细胞黏附蛋白是一种细胞黏附蛋白质，可介导吞噬和包裹作用^[30,31]。

2.4 实时定量 RT-PCR 验证

为了验证转录组序列结果，选择 6 个 DEG 进行定量 RT-PCR 分析，分别为造血因子 2a、半乳糖特异性凝集素、c 型溶菌酶、造血因子变种 3、甲壳素 1、酚氧化酶原激活因子 3 (表 1)。结果显示，造血因子 2a、半乳糖特异性凝集素、c 型溶菌酶在 SGC 中特异性高表达；而造血因子变种 3、甲壳素 1、甲壳素 2 和酚氧化酶原激活因子 3 在 GC 中特异性高表达 (图 6)。定量逆转录 PCR 结果与转录组分析一致，说明转录组数据具有可靠性。



*、**、***分别表示不同血细胞 PCR 相对表达量在 0.05、0.01、0.001 水平差异显著。
*, **, *** indicate significant differences of PCR relative express between SGC and GC at 0.05, 0.01, 0.001 level, respectively.

图 6 6 个基因 mRNA 表达水平的实时定量 RT-PCR 结果

Fig. 6 RT-qPCR results showing mRNA expressions of 6 genes

3 讨论与结论

为更好地了解红螯螯虾血细胞功能和分化的分

子基础，本研究比较了 SGC 和 GC 的基因表达谱，共发现 4488 个基因在 SGC 和 GC 中差异表达，其中 3951 个基因在 SGC 中高表达，537 个基因在 GC 中

高表达。这一结果表明,相对 GC 而言,SGC 细胞内的生命活动更为活跃多样。作为未成熟的血细胞,SGC 仍处于分化过程中^[6]。同时,它们也是功能性免疫细胞,参与吞噬、包裹和清除入侵病原体等免疫过程^[1]。相比 SGC,GC 是具有更特异性的且处在分化末端的免疫细胞,如产生酚氧化酶原和抗菌肽等^[1,6]。因此,GC 的基因表达谱比 SGC 更简单。在其他十足目动物中也观察到类似的差异^[32,33]。

SGC 是正在分化的未成熟血细胞^[6],因此,许多与细胞增殖、分化和发育相关的基因都在其中高表达,包括 Wnt 信号通路、TGF- β 信号通路和 VEGF 信号通路等的基因。由于红螯螯虾的循环血细胞在正常条件下很少增殖^[6],所以上述通路很可能参与调节血细胞的分化。在这些富集的通路中,我们发现了两种 SMAD 家族蛋白 SMAD4 和 SMAD6。SMAD 是 TGF- β 信号通路的中枢介质^[34]。作为多功能因子,SMAD 还可以调节 Wnt 信号通路、EGF 信号通路和 Toll 样受体信号转导通路^[35]。SMAD 还可以通过影响免疫细胞的增殖、分化和凋亡,以及调节细胞因子的产生来调节先天性和适应性免疫系统^[36]。本研究结果表明,SMAD 可能在调节 SGC 的功能和分化中发挥作用。在对虾、螯虾和螃蟹的单细胞转录组研究中,一些参与细胞生长和分化调控的基因也在与 SGC 相关的细胞簇中高表达^[37,38]。此外,SGC 在细胞生长和分化调控相关的基因表达和酶的产生中特别活跃。在对虾中,还发现 SGC 中涉及基因表达的通路显著上调^[32]。可见在分化和成熟过程中,年轻的血细胞可能需要产生成熟阶段所需的物质。

尽管 SGC 仍处于分化过程中,但它们在免疫反应中起着积极作用。SGC 是负责包裹大颗粒异物的主要细胞^[1,8]。在本研究中,SGC 中与细胞黏附相关的通路上调,如细胞黏附和细胞-基质黏附。在 SGC 中高表达的整合素(integrin)是介导细胞外基质和细胞间黏附的重要细胞表面受体。相应的,与细胞迁移和黏附相关的基因在对虾的 SGC 中也高表达^[37,38]。

GC 是更具特定免疫功能的且完全分化的血细胞^[6]。众所周知,它们是激活 proPO 系统的主要细胞^[10,39]。酚氧化酶(phenoloxidase, PO)介导的黑色素化是抵抗入侵病原体最有效的免疫机制之一^[39]。模式识别蛋白(pattern recognition proteins, PRPs)识别微生物来源的病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)会触发一系列丝氨酸蛋白酶的激活,该蛋白酶称为酚氧化酶原激活因

子(PPAFs)或酚氧化酶原激活酶(prophenoloxidase activating enzyme, PPAEs)。随后,PPAE 将失活的 porPO 激活为 PO。PO 氧化酚类分子,产生细胞毒性醌和黑色素,包裹并杀死入侵的病原体。本研究发现 proPO 激活系统的相关基因在 GC 中高表达,其中包括 proPO 和 3 种丝氨酸蛋白酶(PPAF1、PPAF2、PPAF3)。proPO 的激活需要酶联级系统严格控制。因此,一些蛋白酶抑制剂在 GC 中也高表达。这与之前在其他十足目动物中的发现一致^[32,33]。

此外,与跨膜转运和代谢相关的基因也在 GC 中高表达。免疫细胞的功能受到代谢转运的极大影响^[40]。在脊椎动物 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞和中性粒细胞的激活中发现了代谢重塑。葡萄糖、氨基酸、脂肪酸和乳酸转运蛋白表达的上调已被证明可以通过影响免疫细胞的激活和通讯来调节免疫反应。GC 中多种转运蛋白的高表达表明这些细胞在免疫反应中起着积极作用。代谢物质的主动运输可能是快速生产反应性物质和激活 GC 所必需的。

吞噬作用是一种古老而保守的免疫反应,可以消除入侵的病原体和细胞碎片。在螯虾中,一小部分 SGC 和 GC 是具有吞噬功能的^[11,41,42]。SGC 大颗粒和小颗粒物质都可以吞噬,而 GC 往往只吞噬大颗粒物质。在这里,我们发现与受体介导的内吞作用和肌动蛋白细胞骨架调节相关的基因在 SGC 中高表达,而与病原体识别和巨噬细胞细胞因子产生相关的基因则在 GC 中高度表达。在对虾中,透明细胞是主要的吞噬细胞。参与吞噬作用的基因,包括吞噬受体、细胞骨架和几种水解酶,都在透明细胞中高表达^[32]。

另外,与神经系统相关的一些通路或条目也在 SGC 中被富集。前人研究已经提出了甲壳类动物免疫系统和神经系统之间的联系。对克氏原螯虾的研究表明,循环血细胞可能被招募到神经发生生态位并分化为神经元^[43-45]。此外,在通讯螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)中,造血组织前增殖中心(anterior proliferation center, APC)的一部分细胞被认为是神经细胞的潜在前体^[46,47]。

综上所述,作为未成熟的血细胞,SGC 中的基因转录和翻译尤其活跃,它们表达参与细胞生长和发育的基因,并产生成熟阶段可能需要的酶。相比之下,GC 高表达与 proPO 激活系统相关的基因,并产生抗菌肽。此外,能量和物质代谢在 GC 中特别活跃,这可能是感染时激活免疫细胞所必需的。这些结果为深入研究螯虾血细胞亚群的功能和分化提供

了基础信息。

参考文献：

- [1] ROWLEY A F. The immune system of crustaceans[J]. *Encyclopedia of Immunobiology*, 2016(1): 437–453.
- [2] SÖDERHÄLL K. Invertebrate Immunity[M]. Boston, MA : Landes Bioscience and Springer Science and Business Media, LLC, 2010: 239–259.
- [3] LIN X H, SÖDERHÄLL I. Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines[J]. *Blood*, 2011, 117(24): 6417–6424.
- [4] VAN DE BRAAK C B T, BOTTERBLOM M H A, LIU W, et al. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(3): 253–272.
- [5] HOSE J E, MARTIN G G, GERARD A S. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function[J]. *The Biological Bulletin*, 1990, 178(1): 33–45.
- [6] LI F, ZHENG Z C, LI H Y, et al. Crayfish hemocytes develop along the granular cell lineage[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 13099.
- [7] 姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能[J]. *动物学研究*, 2006, 27(5): 549–557.
- YAO C L, WANG Z Y, XIANG J H. Crustacean haemocytes and their function in immune responses[J]. *Zoological Research*, 2006, 27(5): 549–557. (in Chinese)
- [8] PERSSON M, VEY A, SÖDERHÄLL K. Encapsulation of foreign particles *in vitro* by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus* [J]. 1987, 247(2): 409–415.
- [9] 陈琪, 康翠洁. 虾类血细胞的分类与功能研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 53–66.
- CHEN Q, KANG C J. Advancements in the study of the classification and immune function of shrimp hemocytes[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(1): 53–66. (in Chinese)
- [10] SRICHAROE S, KIM J J, TUNKIJANUKIJ S, et al. Exocytosis and proteomic analysis of the vesicle content of granular hemocytes from a crayfish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2005, 29(12): 1017–1031.
- [11] 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.
- [12] WEI C, PAN L Q, ZHANG X, et al. Transcriptome analysis of hemocytes from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* with the injection of dopamine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 497–509.
- [13] HE Z H, ZHAO J C, CHEN X Y, et al. The molecular mechanism of hemocyte immune response in *Marsupenaeus japonicus* infected with decapod iridescent virus 1 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 710845.
- [14] 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.
- [15] CHEN D F, LU L, PEI Q L, et al. Transcriptome analysis of the immunomodulatory effects of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharide on hemocyte immune response in *Procambarus clarkii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 131: 697–706.
- [16] LIAO X Z, WANG C G, WANG B, et al. Research into the hemocyte immune response of *Fenneropenaeus merguensis* under decapod iridescent virus 1 (DIV1) challenge using transcriptome analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 104: 8–17.
- [17] 傅一鸣, 李智, 柳峰松, 等. 微囊藻毒素 MC-LR 对凡纳滨对虾细胞免疫相关基因表达水平的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(2): 196–202.
- FU Y M, LI Z, LIU F S, et al. The toxicity impact of microcystin on expression of cellular immune-related genes in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(2): 196–202. (in Chinese)
- [18] 傅蓉蓉, 李钊, 杨丰. Percoll 不连续密度梯度离心法分离红螯光壳螯虾血细胞[J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 841–851.
- FU R R, LI F, YANG F. Separation of hemocytes of *Cherax quadricarinatus* by Percoll discontinuous density gradient centrifugation[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 841–851. (in Chinese)
- [19] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644–652.
- [20] LI B, DEWEY C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [21] MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621–628.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [23] SIMÃO F A, WATERHOUSE R M, IOANNIDIS P, et al. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(19): 3210–3212.
- [24] HALL M, WANG R, VAN ANTWERPEN R, et al. The crayfish plasma clotting protein: A vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(5): 1965–1970.
- [25] MANINGAS M B B, KONDO H, HIRONO I, et al. Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity[J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(5): 1269–1275.
- [26] LIN X H, SÖDERHÄLL K, SÖDERHÄLL I. Transglutaminase activity in the hematopoietic tissue of a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, importance in hemocyte homeostasis[J]. *BMC Immunology*, 2008, 9: 58.
- [27] LOPES-FERREIRA M, MAGALHÃES G S, FERNANDEZ J H, et al. Structural and biological characterization of Nattectin, a new C-

- type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*[J]. *Biochimie*, 2011, 93(6): 971–980.
- [28] JIANG H S, JIA W M, ZHAO X F, et al. Four crustins involved in antibacterial responses in *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(2): 387–395.
- [29] SÁNCHEZ-SALGADO J L, PEREYRA M A, ALPUCHE-OSORNO J J, et al. Pattern recognition receptors in the crustacean immune response against bacterial infections[J]. *Aquaculture*, 2021, 532: 735998.
- [30] HOLMBLAD T, SÖDERHÄLL K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity[J]. *Aquaculture*, 1999, 172(1/2): 111–123.
- [31] LV S J, LU B J, XU J H, et al. Immune response of peroxinectin of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* to exterior stimulation[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 51(1): 56–64.
- [32] SUN M Z, LI S H, ZHANG X J, et al. Isolation and transcriptome analysis of three subpopulations of shrimp hemocytes reveals the underlying mechanism of their immune functions[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 108: 103689.
- [33] SÖDERHÄLL I, JUNKUNLO K. A comparative global proteomic analysis of the hematopoietic lineages in the crustacean *Pacifastacus leniusculus*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 92: 170–178.
- [34] MIYAZAWA K, MIYAZONO K. Regulation of TGF- β family signaling by inhibitory smads[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2017, 9(3): a022095.
- [35] ZHAO M, MISHRA L, DENG C X. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2018, 14(2): 111–123.
- [36] LAI L Y S, GRACIE N P, GOWRIPALAN A, et al. SMAD proteins: Mediators of diverse outcomes during infection[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2022, 101(2): 151204.
- [37] KOIWAI K, KOYAMA T, TSUDA S, et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals penaeid shrimp hemocyte subpopulations and cell differentiation process[J]. *eLife*, 2021, 10: e66954.
- [38] CUI C, TANG X Q, XING J, et al. Single-cell RNA-seq uncovered hemocyte functional subtypes and their differentiatinal characteristics and connectivity with morphological subpopulations in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 980021.
- [39] CERENIUS L, LEE B L, SÖDERHÄLL K. The proPO-system: Pros and cons for its role in invertebrate immunity[J]. *Trends in Immunology*, 2008, 29(6): 263–271.
- [40] WEISS H J, ANGIARI S. Metabolite transporters as regulators of immunity[J]. *Metabolites*, 2020, 10(10): 418.
- [41] DUAN H, JIN S J, ZHANG Y, et al. Granulocytes of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* can endocytose beads, *E. coli* and WSSV, but in different ways[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 46(2): 186–193.
- [42] LIU S, ZHENG S C, LI Y L, et al. Hemocyte-mediated phagocytosis in crustaceans[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 268.
- [43] BENTON J L, KERY R, LI J J, et al. Cells from the immune system generate adult-born neurons in crayfish[J]. *Developmental Cell*, 2014, 30(3): 322–333.
- [44] BELTZ B S, BRENNEIS G, BENTON J L. Adult neurogenesis: Lessons from crayfish and the elephant in the room[J]. *Brain, Behavior and Evolution*, 2016, 87(3): 146–155.
- [45] BELTZ B S, BENTON J L. From blood to brain: Adult-born neurons in the crayfish brain are the progeny of cells generated by the immune system[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2017, 11: 662.
- [46] CHAVES DA SILVA P G, BENTON J L, SANDEMAN D C, et al. Adult neurogenesis in the crayfish brain: The hematopoietic anterior proliferation center has direct access to the brain and stem cell niche[J]. *Stem Cells and Development*, 2013, 22(7): 1027–1041.
- [47] NOONIN C, LIN X H, JIRAVANICHPAISAL P, et al. Invertebrate hematopoiesis: An anterior proliferation center as a link between the hematopoietic tissue and the brain[J]. *Stem Cells and Development*, 2012, 21(17): 3173–3186.

(责任编辑: 张梅)