



## Akt 在中华绒螯蟹免疫中的功能

许青松<sup>1\*</sup>, 李兵<sup>1</sup>, 杨冰慧<sup>1</sup>, 马金龙<sup>1</sup>, 洋雯<sup>2</sup>, 曲琛<sup>2</sup>

(1. 大连民族大学生命科学学院, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 辽宁大连 116600;

2. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁大连 116023)

**摘要:** Akt 作为 PI3K-AKT 信号通路的核心分子, 在细胞增殖、代谢、发育和存活等过程中发挥重要作用。本研究采用特异性引物及 PCR 技术, 克隆获得了中华绒螯蟹 *Akt* 基因 (*EsAkt*) 并进行生物信息学分析, 实时定量 PCR 技术检测了 *EsAkt* 在中华绒螯蟹不同组织和不同免疫刺激后的表达水平, 免疫荧光技术检测了 *EsAkt* 蛋白的细胞定位, 双链 RNA 干扰技术分析了 *EsAkt* 干扰后凋亡基因的变化。结果显示, *EsAkt* 分子包含 PH 结构域、中心催化结构域 (S\_TKc) 和羧基端疏水结构域 (S\_TK\_X) 3 个保守的结构域。*EsAkt* 在所有被检测的组织中呈现组成型表达, 且在免疫相关组织 (如肝胰腺、鳃和血淋巴细胞) 中的表达量显著高于胃和肠道。*EsAkt* 蛋白主要以弥散状的形式分布在细胞质中。中华绒螯蟹注射脂多糖 (LPS) 和嗜水气单胞菌后, 显著诱导 *EsAkt* 转录本的表达, LPS 免疫刺激 12 h 后, *EsAkt* 响应达到峰值, 为对照组的 4.35 倍, 刺激 48 h 后, *EsAkt* 的 mRNA 表达水平有所降低, 但仍是对照组 2.62 倍。嗜水气单胞菌免疫刺激 6 h 后, *EsAkt* 响应达到峰值, 为对照组的 9.05 倍, 刺激 48 h 后, *EsAkt* 的 mRNA 表达量回落到正常水平。双链 RNA 干扰 *EsAkt* 后, *EsAkt* 的 mRNA 表达量为对照组的 0.38 倍, 而凋亡相关基因 *EsCaspase-3-like* 表达水平显著上调, 为对照组的 2.69 倍。研究表明, *EsAkt* 基因在中华绒螯蟹免疫中发挥重要作用, 参与了机体对细菌引起的免疫应激过程。本研究丰富了中华绒螯蟹 PI3K-AKT 信号通路研究的基本资料, 为进一步研究甲壳动物免疫防御机制奠定了基础。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 蛋白激酶 B; 基因表达; 免疫; 细胞凋亡

**中图分类号:** Q 786; S 945

**文献标志码:** A

Akt 又称为蛋白激酶 B (PKB), 是一种丝氨酸 (Ser) 或苏氨酸 (Thr) 蛋白激酶, 在人类和小鼠中发现 Akt 有 3 种异构体 (Akt1、Akt2 和 Akt3), 它们均具有高度保守的氨基酸末端 pleckstrin 同源 (PH) 结构域、中央激酶结构域及包含疏水基序的羧基末端调节域, 作为 PI3K-AKT 信号通路的核心分子, Akt 可以激活下游多种转录因子, 在细胞增殖、代谢、发育和存活等过程中发挥着重要

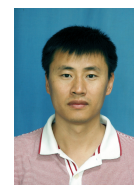
作用<sup>[1]</sup>。Akt 分子的功能在癌症发展、神经退行性疾病、中风和糖尿病中被普遍研究, 甚至作为一些药物潜在靶点被应用于治疗过程中<sup>[2]</sup>。

Akt 分子结构和功能在水产动物领域中的研究相对滞后, 大多停留在基因的序列特征、进化特点、基因克隆表达和初步功能分析<sup>[3]</sup>。谌爽等<sup>[4]</sup>在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中成功克隆获得了 Akt 基因 (*Akt3*), 分析了其序列同源性、进化特性, 以

收稿日期: 2021-06-03 修回日期: 2021-09-26

资助项目: 国家自然科学基金 (31372347); 大连民族大学服务国家战略专项 (0970-110007); 大连民族大学人才引进科研启动基金 (110181)

通信作者: 许青松 (照片), 从事无脊椎动物免疫研究, E-mail: qingsongxu2003@163.com



及在斑马鱼早期胚胎发育中的功能, 发现注射 Akt 后斑马鱼胚胎脑部厚度比对照组显著增加, 表明 Akt 对斑马鱼胚胎脑部尺寸发育有影响。王金凤等<sup>[5]</sup>在斑马鱼、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中研究了低温胁迫对鱼类 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  信号通路的影响, 发现低温激活了 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  信号通路, 不同低温耐受能力的鱼对信号通路的响应呈现出不同的情况。Wang 等<sup>[6]</sup>在香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 中克隆获得了 Akt 基因 (*ChAkt1*), 其广泛表达于牡蛎胚胎形成和幼虫发育的不同组织中, *ChAkt1* 在牡蛎应对各种刺激、微生物病原体和高温胁迫中发挥着重要作用。刘丽等<sup>[7]</sup>在仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 中成功克隆获得了 Akt 基因 (*AjAkt*), 并对该基因的序列特征、组织表达规律以及对灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 刺激的响应规律进行了研究, 发现 *AjAkt* 基因在仿刺参机体调控细菌入侵的免疫防御中发挥重要作用。Zhou 等<sup>[8]</sup>在罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 中成功克隆获得了 Akt 基因 (*MrAkt*), 发现该基因在氨基氮或亚硝酸盐急性应激过程中高表达, 为 PI3K-AKT 途径参与对虾应对亚硝酸盐和氨胁迫的免疫毒理反应提供了证据。田志环等<sup>[9]</sup>在中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 中克隆获得 Akt 基因 (*EsAkt*) 的 cDNA 序列, 主要研究了 *EsAkt* 基因对中华绒螯蟹蜕壳前后肌肉生长的影响, 发现 *EsAkt* 在蟹蜕壳过程中不同部位肌肉组织中的表达量差异与蜕壳周期关系密切, 说明 *EsAkt* 参与中华绒螯蟹蜕壳引起的肌肉萎缩、生长及重建的生理过程。然而 Akt 基因在中华绒螯蟹免疫过程中如何发挥作用却未见报道, 本研究利用分子手段克隆获得了中华绒螯蟹 Akt 基因, 研究其在不同的免疫器官和组织中的表达和细胞内定位, 以及对脂多糖和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的免疫响应情况, 为深入探究中华绒螯蟹免疫防御机制提供新的借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

中华绒螯蟹购自江苏连云港中华绒螯蟹养殖场, 在 18~20 °C 的淡水中暂养, 每天定时换水并投喂适当的饵料, 暂养 7 d 后用于实验。6 周龄雌性昆明小鼠购于大连医科大学, 暂养 7 d 后用于

多克隆抗体的制备。嗜水气单胞菌由大连海洋大学叶仕根博士提供, 脂多糖 (LPS) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 0111:B4 购自 Sigma Aldrich 公司。

### 1.2 样品采集

中华绒螯蟹 [(80 $\pm$ 5) g], 使用一次性无菌注射器从第三步足基部插入采集血淋巴, 并按体积比 1:1 与抗凝剂 (氯化钠 510 mmol/L、柠檬酸 200 mmol/L、葡萄糖 100 mmol/L、柠檬酸三钠 30 mmol/L, pH 7.3) 混匀, 800 $\times$ g, 4 °C, 离心 10 min, 收集血淋巴细胞。然后在冰上取蟹的肝胰腺、心脏、胃、鳃、肌肉、肠道等组织, 液氮速冻, -80 °C 保存备用。实验过程中操作人员严格遵守国家和相关部门伦理规范, 并按照“大连民族大学生物与医学伦理委员会”制定的规章制度执行。

### 1.3 免疫刺激实验

本研究以 LPS 和嗜水气单胞菌为免疫刺激物进行免疫刺激实验<sup>[10]</sup>。用 PBS 溶液稀释 LPS, 终浓度为 100  $\mu$ g/mL, 用 PBS 重悬嗜水气单胞菌至 1 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/mL, 随机挑选暂养的健康中华绒螯蟹 [(20 $\pm$ 2) g] 108 只, 平均分为 3 组 (PBS 组、LPS 组和嗜水气单胞菌组), 分别向各组中华绒螯蟹注射 100  $\mu$ L PBS、100  $\mu$ L LPS 和 100  $\mu$ L 嗜水气单胞菌溶液, 注射 0、3、6、12、24 和 48 h 后, 每个时间点随机挑选 6 只中华绒螯蟹, 收集血淋巴细胞。

### 1.4 RNA 提取、cDNA 合成及实时荧光定量 PCR

参考 Yu 等<sup>[11]</sup> RNA 提取、cDNA 合成及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的方法, 利用 Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国) 进行中华绒螯蟹血淋巴细胞总 RNA 的提取, 然后用分光光度计 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国) 对提取出的 RNA 进行定量分析, 取 2  $\mu$ L RNA 用于琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。按照试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 日本) 的说明书要求进行 cDNA 的反向合成。以获得的 cDNA 为模板, 使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (TaKaRa, 日本), 按说明书要求设置 PCR 反应体系和程序, 结合表 1 中基因类别和引物序列, 以中华绒螯蟹的  $\beta$ -actin 基因作为内参基因, 利用 ABI-Q6-Flex 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增, 结果按照 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  方法进行计算。

### 1.5 原核表达、蛋白纯化及多克隆抗体制备

分析目的基因和表达载体的序列组成特点,

表 1 研究中采用的引物序列  
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence
<i>EsAkt</i> -F	ATGAGCGGCACCATGGAT
<i>EsAkt</i> -R	GCCCTCTCAGCCATGCC
M13-47	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13-RV	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
<i>EsAkt-BamH</i> I-F	CGCGGATCCATGAGCGGCACCATG GAT
<i>EsAkt-Sal</i> I-R	ACGCGTCGACGCCCTTTCAGCCAT GCC
<i>EsAkt</i> -RNAi-F	TAATACGACTCACTATAGGGACAG GGTCTCGGGGCAC
<i>EsAkt</i> -RNAi-R	TAATACGACTCACTATAGGGGTCCG TCTCACTTGTCAC
EGFP-RNAi-F	TAATACGACTCACTATAGGGCGAC GTAAACGGCCACAAGT
EGFP-RNAi-R	TAATACGACTCACTATAGGGCTGT ACAGCTCGTCCATGC
<i>EsAkt</i> -RT-F	TACTCCAGCGATGACGACG
<i>EsAkt</i> -RT-R	ATGGCGTAGAAATGGTTGC
<i>EsCaspase-3-like</i> -RT-F	CATGGTGATGAGAATGAC
<i>EsCaspase-3-like</i> -RT-R	TTGGATGAAGTAGAGACG
<i>Esβ-actin</i> -RT-F	GCATCCACGAGACCACTTACA
<i>Esβ-actin</i> -RT-R	CTCCTGCTTGCTGATCCACATC

选择合适的酶切位点, 设计特异性的 5'端带有酶切位点的引物(表 1), 将酶切后的目的片段和表达载体进行连接, 连接产物转化到克隆感受态 Trans 5α 中, 对测序正确的菌株进行扩增培养及质粒提取, 再将提取的重组质粒转化到表达菌株 BL21 (DE3), 使用 12% 的 SDS-PAGE 进行电泳, 并利用考马斯染色法验证重组蛋白的表达。将 pGEX4T-1 (Novagen) 作为重组表达的载体, pGEX4T-1 重组质粒经诱导后, 蛋白带有一段具有谷胱甘肽 S-转移酶蛋白标签 (GST-Tag) 的序列。获得重组蛋白后进行尿素浓度梯度透析复性, 使用获得的复性蛋白对 6 周龄雌性小鼠进行 4 次免疫, 制备多克隆抗体, 眼球摘除法将小鼠血样收集到 1.5 mL 离心管中, 离心收集上层血清作为制备的多克隆抗体, 利用 Western blot 法检测制备的中华绒螯蟹 *Akt* 多克隆抗体的效果<sup>[12]</sup>。

## 1.6 细胞免疫荧光检测

利用无菌注射器抽取中华绒螯蟹血淋巴细胞, 4% 多聚甲醛重悬血淋巴细胞, 固定 10 min。混匀后滴加到多聚赖氨酸包被的载玻片上, 室温静置 2 h, 使细胞紧贴载玻片。采用 0.5% Triton X-10

对细胞进行透化处理 10 min, 3% 胎牛血清蛋白 (BSA) 封闭 1 h, 再用 3% BSA 稀释液对制备的 *Akt* 多克隆抗体进行稀释 (1 : 500, 体积比), 室外孵育 1 h, 洗涤后用 BSA 稀释带有 Alexa Fluor 488 标签的抗体 (1 : 1 000, 体积比), 避光孵育 1 h, 再用 3% BSA 稀释 DAPI, 在样品上滴加 50 μL 稀释液对细胞核进行染色, 室温静置 10 min, 避光。洗涤后用 20 μL 50% 甘油进行封闭, 盖片, 荧光显微镜下观察拍照。

## 1.7 RNA 干扰

用 siRNA 位点预测软件对 *EsAkt* 进行分析, 选择包含 siRNA 位点较多的区间片段进行干扰引物设计(表 1)。合成对应的干扰片段, 以中华绒螯蟹血淋巴细胞的 cDNA 作为模板, 将扩增产物进行回收、纯化, 用作双链 RNA(dsRNA) 的合成模板。此外, 还需要合成绿色荧光蛋白 (EGFP) 的 dsRNA 作为对照。dsRNA 的合成使用 *in vitro* Transcription T7 试剂盒 (TaKaRa)。dsRNA 准备好后, 挑选 36 只暂养 7 d 的中华绒螯蟹并随机分为 3 组 (正常组、dsEGFP 组及 ds*EsAkt* 组), 每组 12 只。正常组、dsEGFP 组及 *Akt* 干扰组分别注射 100 μL PBS、100 μL EGFP 和 100 μL *Akt* 的 dsRNA, dsRNA 的终浓度都为 1 μg/μL。并按照上述方法分别在注射后 0 和 24 h 进行血淋巴细胞收集, 用于 RNA 提取和 qRT-PCR 分析。

## 1.8 数据分析

实验数据用 SPSS 20 软件进行统计分析, 利用单因素方差分析方法 (ANOVA) 对不同处理组差异进行比较。 $P < 0.05$  代表差异显著,  $P < 0.01$  代表差异极显著。

## 2 结果

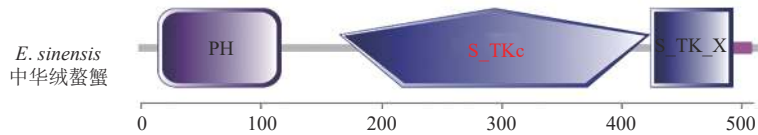
### 2.1 中华绒螯蟹 *Akt* 基因序列分析

从 NCBI 和中华绒螯蟹基因组 (PRJNA305216) 获得了中华绒螯蟹 *Akt* 的序列信息, 并利用特异性引物及 PCR 技术克隆得到了相关序列 (命名为 *EsAkt*)。利用生物信息学技术分析, *EsAkt* 的 cDNA 全长 2 200 bp, 其中开放阅读框 (ORF) 为 1 545 bp, 编码 514 个氨基酸。通过 SMART 结构域分析表明, *EsAkt* 分子包含 3 个保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域: PH 结构域、中心催化结构域 (S\_TKc) 和羧基端疏水结构域 (S\_TK\_X) (图 1)。

```

1 gcttgaaacagctgaggaagaagaagtggacgaggcggattttcagcagatTTTTTTTtagttttgagacagtgtgaccttaaacgtgaa
106 gtaagggtgaaacctgagaccttaagtcccttgtggccgagc tgaaggcgaaATGAGCGGCCACCATGGATGAGGCGCGGATCCCGCCCGGCCATCGTC
1 M S G T M D E A A I P P R P A I V
211 AAGGAGGGCTGGCTCAACAGCGAGGGGAGGCATCAAGAACTGGCGACACGCGTACTTCTCTGCGAGGAGGACCGCACACTCCTGGGGTTCAAGAACCAAGCT
18 K E G W L N K R G E H I K N W R Q R Y F F L Q E D G T L L G F K T K P
316 GAGCAAGGGCTGGAGGACCCTCAACAACTTCACAGTCAAGCGATGTCAGATCTGAAGACAGAGCGCGCGCGCAACCTTCATCATCCCGGGGCTTCAC
53 E H G L E D P L N N F T V K R C Q I L K T E R P R P N T F I R G L H
421 TGGACCCTGTCACTGAGAGAACATTCATGCCAGTACGGAGTGATAGGGAAGCATGGATGGAGGCGATCAAGCAGGTCGCGAGAGAATATCGGCAACACG
88 W T T V I E R T F N A Q S A S D R E A W M E A I K Q V S E R I S D N T
526 TCGGGCCGCTGTGTGGTATCCAGGAGCGTACTCGGTGGAGCAGATCCAAGTACTCCAGCGGATGACGACACACCTCACAGGGTTCTCGGGGACCAAG
123 S G R C V V I Q E A D S V E Q I Q L K Y S S D D D D T S Q G S R G T K
631 AAGAAGAGGAAAATCACACTGGACAACCTTGAGTTCCTTAAAGTGTTAGGGAAGGAACCTTCGGCAAAGTATCTCTGCGCGTAAAAGAGCGAACCAATTC
158 K K R K I T L D N F E F L K V L G K G T F G K V I L C R E K S S N H F
736 TAGCCCATCAAGATCTGCGCAAGACGTGATCATCAAGCGGACGAGGTCCTCACACTACCGGAAAACGGGTCCTGCAAGTAGTGCATCACCTTCCTT
193 Y A I K I L R K D V I I K R D E V A H T L T E N R V L Q V V D H P F L
841 ACTTACTCAAGTATCTCCAAACCAAGCAGCGTCTCTGCTGTCATGGAGTACGTCACAGCGGGGAGCTGTTCTCCACCTCAACAGGAGCGGAGTCTTC
228 T Y L K Y S F Q T N D R L C F V M E Y V N G G E L F F H L N Q R I F
946 CCGGAGGAGCGCGCAAGTTCTACGGGGCGGAGATCGCTTGCATGGGGTACTTGCATGAGGGAATATCATCTACCGGGACTTGAAGCTCGAAAACATTA
263 P E E R A K F Y G A E I C L A L G Y L H E R N I I Y R D L K L E N L L
1051 CTGGATGCCAGCTCACATAAAGATCGCGACTTTGGCTGTGCAAGGAAGACATCTGTCAGGCTCCACCAGGACGTTCTGCGGCACACCAGAACTACTG
298 L D A D G H I K I A D F G L C K E D I S Y G S T T R T F C G T P E Y L
1156 CCCCCAGAGTGCTAGAAAAGCAGACTACGGCGCTGTGACTGCTGGTGGCTACGGAGTCTGCTGTACAGAGATGATGTCGGCGCCCTCCCCTCTACGAC
333 A P E V L E E N D Y G R G V D W W G Y G V C L Y E M M V G R L P F Y D
1261 AAGACCACCAAGTGTTCAGCTCATGCTGTGAGGAGTCGGCTCCCAAGACCATCTCCAGGAGGACCGCGACTCTCAAGGGCTGCTACATAAG
368 K D H D K L F Q L I V C E D V R F P K T I S Q E A R D L L K G L L H K
1366 GACCCCAACAAGCGCTGGGAGGGGGCGGGTACGCCAAGGAGTCCAGAGTCAACCCCTCTATATCACCAATTAAGTGGAGCTCTGGAAGAGAAGAGCTC
403 D P N K R L G G G P G D A K E V Q S H P F Y I T I N W K L L E E K L
1471 ACCCGCCTTTCAAACCCCAAGTGAAGTGAGAGCAGACTCGCTACTTTGACCGAGAGTTTACTGGAGAGTCTGTGACGTCACCGCACCTGCAAGTGAG
438 T P P F K P Q V T S E T D T R Y F D R E F T G E S V Q L T P P D Q V E
1576 CCCCTGGACTATTGCTGAGGAGTCTGAAGCGGCTGCTTCAATCAGTTTTCATATCAAGATAACTCAACTCTAGGCGCTCCCTGCGCTCAAGCCTCAACTC
473 P L G P I A E E S E A A F N Q P S Y Q D N S T L G S S L A S L N S
1681 CTGGCATGGCTGAAGAGGGCTGAgctctggcctgcttagggatcagattaaagtaggaaacaaagttaactcaatgtgacttctcatctctgtgtgagagag
508 L G M A E E G *
1786 acaagctctgtgaagtgtgctcatttccaaccttgggtgaagcttctctgccccctgtcacactgcaagcaggcaggggggagacccecaagctgcactgetat
1891 gtgtccagcaacctcagctccgcttgggtgtgcaagactatagaggtgtggagcagcttctctattgcaagaatgaaatagcccaatggcttcttgacacag
1996 tgaataattatacattctgactctcatctagtcgcaatagctttttaggggtggagaatcagggttggcattgaaattgtgtgtcttatctgtgacttctctg
2101 catagataaattctacataatccaagttcctaantttgtgtcttaanaatgatataaagctttttagatgc taaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

(a)



(b)

图1 EsAkt 核酸序列、氨基酸序列和结构域分析

(a) EsAkt 核酸序列和氨基酸序列, \*表示为终止密码子(TGA); (b) EsAkt 结构域。

Fig. 1 Nucleotide, deduced amino acid sequence and protein domain of EsAkt

(a) nucleotide and deduced amino acid sequence of EsAkt, \* represents the stop codon (TGA), (b) protein domain of EsAkt.

## 2.2 中华绒螯蟹 Akt 基因组织分布

利用 qRT-PCR 技术分析 *EsAkt* 基因 mRNA 在各组织(肠、胃、心脏、血淋巴细胞、鳃、肝胰腺和肌肉)中的表达水平。结果表明, *EsAkt* 的 mRNA 在所有被检测的组织中呈现组成型表达, 在免疫相关组织(如肝胰腺、鳃和血淋巴细胞)中的表达量相对较高。*EsAkt* 在肌肉、肝胰腺、鳃、血淋巴细胞、心脏和胃中的表达分别为肠表达水平的 18.11±1.29 倍( $P<0.05$ )、11.45±1.61 倍( $P<0.05$ )、5.48±0.41 倍 ( $P<0.05$ )、2.47±0.44 倍 ( $P<0.05$ )、2.40±0.19 倍( $P<0.05$ )和 1.08±0.09 倍( $P>0.05$ )(图2)。

## 2.3 EsAkt 多克隆抗体制备及细胞定位

重组 EsAkt 质粒在表达菌株 BL21 (DE3) 中利用 IPTG 进行诱导表达, 然后用 GST 柱进行重组蛋白纯化。结果显示, 纯化后的 rEsAkt 条带单一, 蛋白分子量约为 86 ku (图 3-a)。将纯化得到的 rEsAkt 进行多克隆抗体的制备, 利用 Western blot

检验抗体的特异性, EsAkt 的多克隆抗体可以识别 rEsAkt (图 3-b)。利用免疫荧光技术检测 EsAkt

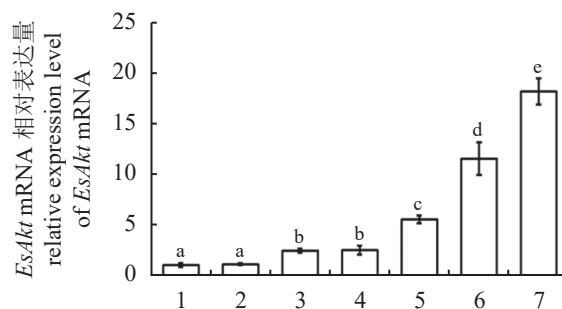


图2 EsAkt mRNA 在各组织中的相对表达量

1. 肠, 2. 胃, 3. 心脏, 4. 血淋巴细胞, 5. 鳃, 6. 肝胰腺, 7. 肌肉。柱形图上不同的字母代表组间存在显著差异 ( $P<0.05$ )。

Fig. 2 Relative mRNA expression of EsAkt in different tissues

1. intestine, 2. stomach, 3. heart, 4. hemocytes, 5. gills, 6. hepatopancreas, 7. muscle. Different letters indicate that there were significant differences between groups ( $P<0.05$ ).

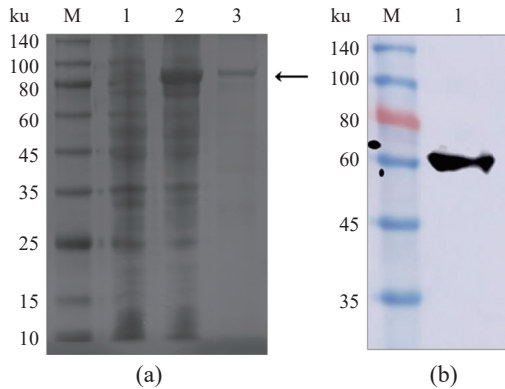


图3 *EsAkt* 重组蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

(a) M. 蛋白标准, 1. *EsAkt* 对照菌液 (未加 IPTG), 2. *EsAkt* 诱导菌液 (IPTG 诱导), 3. 纯化 *EsAkt* 重组蛋白; (b) 1. Western blot 检验 *EsAkt* 多克隆抗体。

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of *EsAkt*

(a) M. standard protein molecular weight marker, 1. negative control for r*EsAkt* (without IPTG induction), 2. IPTG induced r*EsAkt*, 3. purified r*EsAkt* protein; (b) 1. Western blot analysis of r*EsAkt* with prepared anti-*EsAkt* antibody.

蛋白在血淋巴细胞中的细胞定位情况, 绿色代表 *EsAkt* 蛋白的分布, 蓝色代表 DAPI 标示的细胞核, *EsAkt* 蛋白主要以弥散状的形式分布在血淋巴细胞的细胞质中 (图 4)。

#### 2.4 免疫刺激后血淋巴细胞中 *EsAkt* 的表达

本研究利用 LPS 和嗜水气单胞菌对中华绒螯

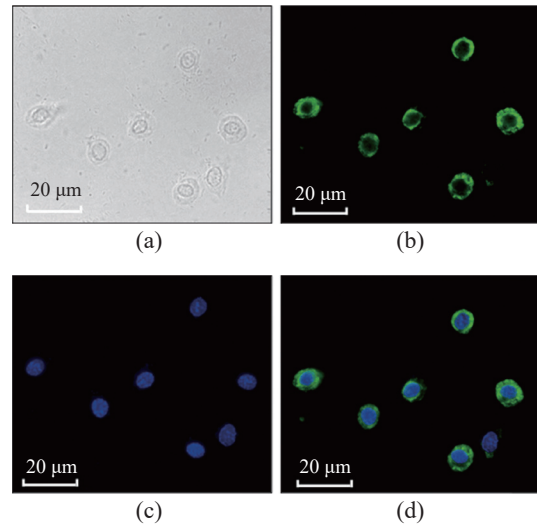


图4 *EsAkt* 在血淋巴细胞中的定位

(a) 明场下的细胞形态, (b) *EsAkt* 的阳性信号呈现绿色, (c) DAPI 对细胞核染色呈现蓝色, (d) 叠加图确定 *EsAkt* 的分布。

Fig. 4 Subcellular localization of *EsAkt* in hemocytes

(a) morphology of hemocytes were shown in bright field, (b) positive signals of *EsAkt* were shown in green, (c) nucleus stained by DAPI were shown in blue, (d) merge map to determine the distribution of *EsAkt*.

蟹进行免疫刺激, LPS 刺激 3 和 6 h 后, *EsAkt* 的 mRNA 表达量开始升高, 分别为 PBS 组的  $1.59 \pm 0.30$  倍 ( $P < 0.05$ ) 和  $2.81 \pm 0.15$  倍 ( $P < 0.01$ )。刺激 12 和 24 h 后, *EsAkt* 的 mRNA 表达量继续上升, 分别为对照组  $3.95 \pm 0.30$  倍和  $4.35 \pm 0.22$  倍 ( $P < 0.01$ )。刺激 48 h 后, *EsAkt* 的 mRNA 表达量有所降低, 但仍是 PBS 组的  $2.62 \pm 0.29$  倍 ( $P < 0.01$ ) (图 5)。嗜

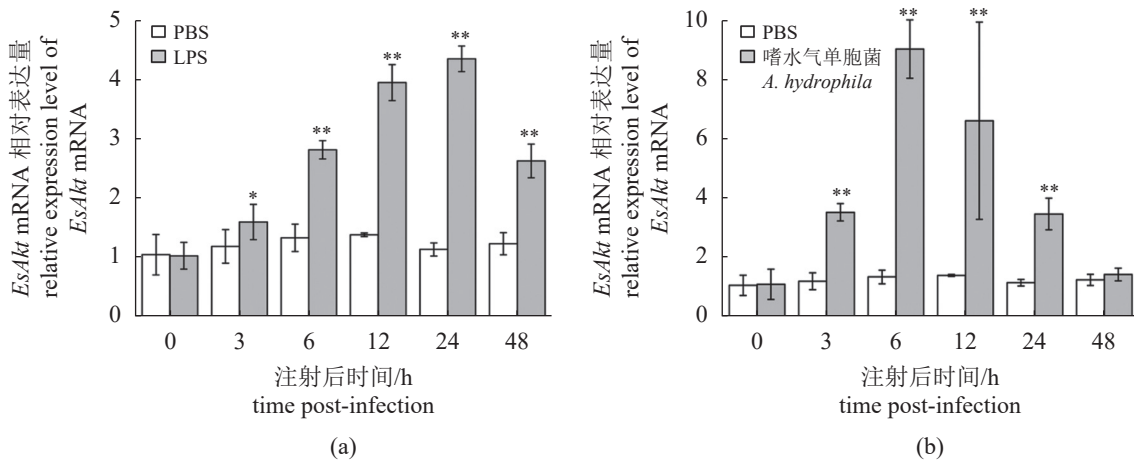


图5 免疫刺激后血淋巴细胞 *EsAkt* mRNA 的表达模式

(a) 脂多糖刺激后 *EsAkt* 在血淋巴细胞中的表达情况, (b) 嗜水气单胞菌刺激后 *EsAkt* 在血淋巴细胞中的表达情况, PBS 为对照组。“\*”代表  $P < 0.05$ , “\*\*”代表  $P < 0.01$ , 为组间差异。

Fig. 5 Temporal mRNA expression of *EsAkt* after immune challenges in hemocytes

(a) temporal expression of *EsAkt* after LPS stimulation, (b) temporal expression of *EsAkt* after *A. hydrophila* stimulation; PBS was used as control. One asterisk indicates significant difference at  $P < 0.05$ , and two asterisks indicate extremely significant difference at  $P < 0.01$ ; the differences are between groups.

水气单胞菌分别刺激 3 和 6 h 后, *EsAkt* 的 mRNA 表达量逐渐升高, 分别为 PBS 组的  $3.52 \pm 0.29$  倍和  $9.05 \pm 0.99$  倍 ( $P < 0.01$ )。刺激 12 和 24 h 后, *EsAkt* 的 mRNA 表达量下降, 分别为 PBS 组的  $6.62 \pm 3.34$  倍和  $3.46 \pm 0.53$  倍 ( $P < 0.01$ )。刺激 48 h 后, *EsAkt* 的 mRNA 表达量恢复正常 ( $1.40 \pm 0.21$  倍,  $P > 0.05$ )。

### 2.5 *EsAkt* 干扰后凋亡相关基因的表达

利用 dsRNA 对 *EsAkt* 基因进行干扰, 结果显

示, dsRNA 注射 24 h 后, 干扰组 *EsAkt* 的 mRNA 表达量显著低于正常组 ( $0.38 \pm 0.21$  倍,  $P < 0.05$ ), 正常组和 dsEGFP 组中 *EsAkt* 的 mRNA 表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 6-a)。此外, 为探究 *EsAkt* 是否参与调节凋亡相关基因表达, 在 *EsAkt* 干扰后检测凋亡相关基因 *EsCaspase-3-like* 的表达情况, 发现 *EsAkt* 干扰组的 *EsCaspase-3-like* 表达量显著上调, 为正常组的  $2.69 \pm 0.92$  倍 ( $P < 0.05$ ) (图 6-b)。

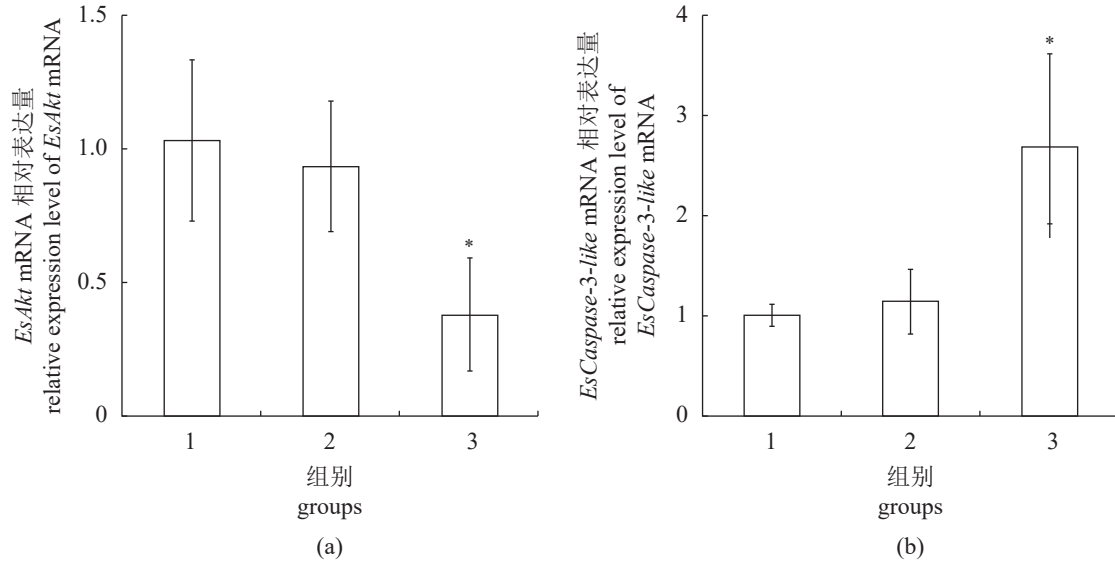


图 6 *EsAkt* 干扰及凋亡相关基因的表达

(a) *EsAkt* 在血淋巴细胞中的干扰效率, (b) 抑制 *EsAkt* 后 *EsCaspase-3-like* 的表达情况。1. 正常组, 2. dsEGFP 组, 3. dsEsAkt 组。“\*”代表  $P < 0.05$ 。

Fig. 6 Inhibition of *EsAkt* and expression of apoptosis related gene

(a) efficiency of *EsAkt* inhibition, (b) mRNA expression level of *EsCaspase-3-like* after the inhibition of *EsAkt*. 1. normal group, 2. dsEGFP group, 3. dsEsAkt group. "\*" indicates significant difference at  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

面对日益严峻的养殖环境, 中华绒螯蟹病害防御基础理论研究却很薄弱, 丰富中华绒螯蟹免疫防御基础理论知识, 寻找安全有效的病害防控方法成为中华绒螯蟹养殖产业中亟待解决的问题, 本研究针对这一问题, 主要探索 Akt 在中华绒螯蟹免疫防御中的功能和作用机制。本研究利用生物信息学技术, 克隆获得 *EsAkt* 的 cDNA 全长, 结果与田志环等<sup>[9]</sup>报道的中华绒螯蟹 Akt 序列一致。EsAkt 分子包含 PH 结构域、中心催化结构域 (S\_TKc) 和羧基端疏水结构域 (S\_TK\_X) 3 个保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域, 符合典型的 Akt 结构域特征<sup>[13]</sup>。*EsAkt* 的 mRNA 在所有被检测的组织中呈现组成型表达, 这与之前在斑马鱼<sup>[4]</sup>、

香港牡蛎<sup>[6]</sup>、仿刺参<sup>[7]</sup>和罗氏沼虾<sup>[8]</sup>中报道的情况类似, 说明 Akt 在各组织中广谱表达, 提示可能参与多种生命活动。在甲壳动物中, 肝胰腺、鳃和血淋巴细胞是其免疫过程的关键环节和重要参与者, 这些免疫器官或组织在受到外界刺激后能快速做出响应, 分泌凝集素、抗菌肽和溶菌酶等免疫分子, 有效清除入侵的病原体<sup>[14]</sup>。本研究中发现, *EsAkt* 在免疫相关组织 (如肝胰腺、鳃、血淋巴细胞) 中的表达量相对较高, 预示 Akt 可能参与中华绒螯蟹的免疫防御反应。此外, 基于 EsAkt 蛋白的细胞定位研究表明, EsAkt 蛋白主要是以弥散状的形式分布在血淋巴细胞的细胞质中。这与已报道的人和小鼠的 Akt 分布情况一致<sup>[15]</sup>, 活化的 Akt 可以磷酸化多种酶、激酶和转录因子等下游分子, 发挥调节细胞功能的作用。EsAkt

的细胞定位进一步证明其具有保守的功能, 可能在细胞免疫和维持稳态的过程中发挥重要作用。

PI3K-AKT 信号在细胞增殖、细胞代谢调控、细胞发育及存活等多种细胞过程中发挥重要作用, 同时也参与宿主抵抗外源刺激物引起的免疫过程。Tang 等<sup>[16]</sup>在克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 中对铜离子应激引起的免疫反应进行研究, 发现 PI3K-AKT 信号通路参与其中, 免疫相关基因被上调表达, 提示重金属铜可以引起克氏原螯虾氧化应激和免疫反应。Kong 等<sup>[17]</sup>对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 由溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 引起的免疫反应进行研究, 发现 PI3K-AKT 信号通路被激活, 从而增加抗菌肽 (LvPEN4) 的表达, 提高机体对溶藻弧菌的抵抗力。Ruan 等<sup>[18]</sup>克隆了凡纳滨对虾 *Akt* 基因 (*LvAkt*), 发现在白斑综合征病毒 (WSSV) 感染对虾的早期阶段, *LvAkt* 表达上调, 而 PI3K 特异性抑制剂可以降低病毒基因转录水平, 提示 PI3K-AKT 信号可能在凡纳滨对虾对抗 WSSV 的免疫应答中起重要作用。细菌性病害是中华绒螯蟹养殖过程中的主要致病因素之一, LPS 是构成革兰氏阴性菌细胞壁的重要成分, 可以用于模拟革兰氏阴性菌的攻击, 而嗜水气单胞菌属于革兰氏阴性菌, 是中华绒螯蟹养殖过程中的主要致病菌之一<sup>[19]</sup>。本研究中 LPS 刺激后 3~24 h, *EsAkt* 的 mRNA 表达量逐渐升高, 在刺激后 48 h 才开始下降, 嗜水气单胞菌刺激 6 h 后, *EsAkt* 的 mRNA 表达水平达到最高, 随后逐渐降低, 并在 48 h 恢复到正常水平, 中华绒螯蟹对嗜水气单胞菌的响应速率比 LPS 更快, 强度更高。*EsAkt* 免疫应激变化趋势与香港牡蛎 *ChAkt1* 响应溶藻弧菌和酵母菌变化趋势相近, 都是先升高, 后降低的过程<sup>[6]</sup>。

甲壳动物免疫系统主要由细胞免疫和体液免疫组成, 其中细胞免疫通常是指血淋巴细胞直接参与的防御反应, 主要包括细胞吞噬、包囊和焦化作用及凋亡等过程<sup>[20]</sup>。目前已在一些甲壳动物中观察到细胞皱缩、线粒体膜电位消失、膜内侧的磷脂酰丝氨酸暴露在外侧以及凋亡小体的形成等经典的凋亡特征<sup>[21]</sup>。细胞凋亡是免疫系统的一个重要调控特性, 可以有效清理机体老化、受损或是存在潜在危险的细胞 (如病毒感染细胞), 对维持机体免疫稳态具有重要意义。Caspases 是重要的半胱氨酸依赖的特异性蛋白酶, 在细胞凋亡过程中发挥着核心作用。在墨吉对虾 (*Penaeus merguensis*)<sup>[22]</sup>、凡纳滨对虾<sup>[23]</sup>、斑节对虾 (*P.*

*monodon*)<sup>[24]</sup> 和中华绒螯蟹<sup>[25]</sup> 等甲壳动物中发现了凋亡相关的多种 *Caspase* 基因, 较多的研究中采用注射细菌、病毒等方法对甲壳动物进行免疫刺激, 来探究 *Caspase* 基因在甲壳动物免疫中的作用。*Caspase-3* 在哺乳动物的细胞凋亡过程中发挥重要的作用, 在中华绒螯蟹中, Wu 等<sup>[26]</sup> 首次发现 *EsCaspase-3-like* 基因, 并发现其在甲壳动物血细胞凋亡过程中发挥重要的作用。本研究中采用 dsRNA 对 *EsAkt* 基因进行干扰后, 凋亡相关基因 *EsCaspase-3-like* 表达水平显著上调, 提示 *EsAkt* 可能通过调控 *Caspase* 介导的细胞凋亡, 发挥其免疫调节的作用。本研究结果丰富了中华绒螯蟹 PI3K-AKT 信号通路研究的基本资料, 为进一步探究甲壳动物免疫防御机制奠定了基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Hinz N, Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2019, 17(1): 154.
- [2] Narayanankutty A. Phytochemicals as PI3K/Akt/mTOR inhibitors and their role in breast cancer treatment[J]. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2020, 15(3): 188-199.
- [3] 刘丽, 孙景贤, 常亚青, 等. 水产动物 *Akt* 基因研究进展 [J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(4): 602-609.  
Liu L, Sun J X, Chang Y Q, et al. Research progress on *Akt* gene in aquatic animals: a review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(4): 602-609 (in Chinese).
- [4] 湛爽, 周建峰, 卢玲, 等. 斑马鱼 *akt3* 基因的克隆及其表达图谱与过表达分析 [J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 717-726.  
Chen S, Zhou J F, Lu L, et al. Molecular cloning, expression and overexpression analysis of *akt3* (*PKB $\gamma$* ) in zebrafish[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(5): 717-726 (in Chinese).
- [5] 王金凤, 胡鹏, 牛虹博, 等. 低温胁迫对鱼类 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  信号通路的影响 [J]. 生物学杂志, 2016, 33(6): 24-28.  
Wang J F, Hu P, Niu H B, et al. Effect of cold stress on PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  signal pathway in fishes[J]. *Journal of Biology*, 2016, 33(6): 24-28 (in Chinese).
- [6] Wang F X, Xiao S, Zhang Y, et al. *ChAkt1* involvement in orchestrating the immune and heat shock responses in *Crassostrea hongkongensis*: molecular cloning and func-

- tional characterization[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 1015-1023.
- [7] 刘丽, 陈阳, 任丽媛, 等. 仿刺参*Akt*基因的克隆及其表达和生物功能分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(12): 5705-5717.
- Liu L, Chen Y, Ren L Y, *et al.* Cloning, expression and biological function analysis of *Akt* gene from *Apostichopus japonicus*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(12): 5705-5717 (in Chinese).
- [8] Zhou T T, Liu J H, Chan S, *et al.* Molecular characterization and expression dynamics of three key genes in the PI3K-AKT pathway reveal its involvement in the immunotoxicological responses of the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* to acute ammonia and nitrite stress[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 208: 111767.
- [9] 田志环, 焦传珍, 成永旭, 等. 中华绒螯蟹*Akt*基因的cDNA克隆、序列分析及表达特征[J]. *水产学报*, 2018, 42(4): 485-494.
- Tian Z H, Jiao C Z, Cheng Y X, *et al.* Molecular cloning, sequence analysis and tissue expression of serine/threonine kinases *Akt* from *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(4): 485-494 (in Chinese).
- [10] Qu C, Yang W, Xu Q S, *et al.* A novel effector caspase (Caspase-3/7-1) involved in the regulation of immune homeostasis in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 83: 76-83.
- [11] Yu A Q, Jin X K, Li S, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of a dorsal homologue from *Eriocheir sinensis*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 723-727.
- [12] Qu C, Sun J J, Xu Q S, *et al.* An inhibitor of apoptosis protein (*EsIAP1*) from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* regulates apoptosis through inhibiting the activity of *EsCaspase-3/7-1*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 20421.
- [13] Sasaki T, Kuniyasu H. Significance of AKT in gastric cancer (review)[J]. *International Journal of Oncology*, 2014, 45(6): 2187-2192.
- [14] Lavine M D, Strand M R. Insect hemocytes and their role in immunity[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(10): 1295-1309.
- [15] Zhang Y, Yao X, Jiang C Q, *et al.* Expression of PI3K, PTEN and Akt in small intestinal adenocarcinoma detected by quantum dots-based immunofluorescence technology[J]. *Cancer Biomarkers*, 2013, 13(4): 299-305.
- [16] Tang D, Shi X L, Guo H Y, *et al.* Comparative transcriptome analysis of the gills of *Procambarus clarkii* provides novel insights into the immune-related mechanism of copper stress tolerance[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 96: 32-40.
- [17] Kong J R, Wei W, Liang Q J, *et al.* Identifying the function of LvPI3K during the pathogenic infection of *Litopenaeus vannamei* by *Vibrio alginolyticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 76: 355-367.
- [18] Ruan L W, Liu R D, Xu X, *et al.* Molecular cloning and characterization of a threonine/serine protein kinase *lvakt* from *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 32(4): 792-798.
- [19] Wang J J, Yang B, Wang W L, *et al.* The enhanced immune protection in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* against the second exposure to bacteria *Aeromonas hydrophila*[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2041.
- [20] Rowley A F, Powell A. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific?[J]. *Journal of Immunology*, 2007, 179(11): 7209-7214.
- [21] Wongprasert K, Khanobdee K, Glunukarn S S, *et al.* Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 55(1): 3-10.
- [22] Phongdara A, Wanna W, Chotigeat W. Molecular cloning and expression of caspase from white shrimp *Penaeus merguensis*[J]. *Aquaculture*, 2006, 252(2-4): 114-120.
- [23] Wang P H, Wan D H, Chen Y G, *et al.* Characterization of four novel caspases from *Litopenaeus vannamei* (Lv-caspase2-5) and their role in WSSV infection through dsRNA-mediated gene silencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80418.
- [24] Leu J H, Wang H C, Kou G H, *et al.* *Penaeus monodon* caspase is targeted by a white spot syndrome virus anti-apoptosis protein[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(5): 476-486.
- [25] Jin X K, Li W W, He L, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of two apoptosis genes, caspase and nm23, involved in the antibacterial response in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 263-272.
- [26] Wu M H, Jin X K, Yu A Q, *et al.* Caspase-mediated apoptosis in crustaceans: Cloning and functional characterization of *EsCaspase-3-like* protein from *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 625-632.



## Function of Akt in immunity in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

XU Qingsong<sup>1\*</sup>, LI Bing<sup>1</sup>, YANG Binghui<sup>1</sup>, MA Jinlong<sup>1</sup>, YANG Wen<sup>2</sup>, QU Chen<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** *Eriocheir sinensis* is one of the most important aquaculture species in China. With intensification of high-intensity feeding and degradation of the environment, the increasing diseases caused by bacteria infections have resulted in enormous economic loss in crab aquaculture. Akt is a core molecule of PI3K-AKT signaling pathway, which is highly conserved from invertebrate to vertebrate that plays essential roles in various physiological and pathological processes, such as cell proliferation, metabolism, development and survival. Although several Akts among invertebrates have been explored, the identities of Akt and their downstream effectors, especially in pathogen infection of crustaceans, remains poorly understood. In the present study, an *Akt* gene (designated as *EsAkt*) was identified in Chinese mitten crab *E. sinensis*, and the mRNA expression patterns of *EsAkt* in response to immune stimulations were investigated. The specific primers and PCR technology were used to clone and obtain the *E. sinensis Akt* gene (*EsAkt*). The expression level *EsAkt* in different tissues and after different immune stimulations were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The cellular localization of *EsAkt* protein was detected by immunofluorescence assay. The changes of apoptotic gene after *EsAkt* RNA interference were analyzed by double stranded RNA interference. The results showed that *EsAkt* molecule contained the PH domain, the central catalytic domain (S\_TKc) and the carboxy-terminal hydrophobic domain (S\_TK\_X). *EsAkt* was constitutively expressed in all tested tissues, and its expression in immunity related tissues (such as hepatopancreas, gills and blood lymphocytes) was significantly higher than that in stomach and intestine ( $P < 0.01$ ). Immunofluorescence assay results indicated that the oval hemocytes were observed in the bright field, and the cell nuclei were stained by DAPI in blue. The *EsAkt*-reactive areas were stained in green, and the positive green signals were mainly diffuse localization in the cytoplasm. After injecting lipopolysaccharide (LPS) and *Aeromonas hydrophila* into *E. sinensis*, the expression of *EsAkt* was significantly induced. After LPS immune stimulation for 12 h, the response of *EsAkt* reached the peak, which was 4.35 times that of the control group ( $P < 0.01$ ). After stimulation for 48 h, the mRNA expression level of *EsAkt* decreased, but it was still 2.62 times that of the control group ( $P < 0.01$ ); After 6 h of *A. hydrophila* immune stimulation, the response of *EsAkt* reached the peak, which was 9.05 times higher than that of the control group ( $P < 0.01$ ). After 48 h of stimulation, the mRNA expression level of *EsAkt* fell back to normal. Upon double stranded RNA interference with *EsAkt*, the mRNA expression level of *EsAkt* was 0.38 times higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ), while the expression level of apoptosis related gene *Escaspase-3-like* was significantly up-regulated, which was 2.69 times higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). These results imply that *EsAkt* plays an important role in pathogen challenge by regulating the apoptosis related gene expression in *E. sinensis*, which enriches the basic data of the PI3K-AKT signaling pathway in *E. sinensis* and lays a foundation for further research on the immune defense mechanism of crustaceans.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; protein kinase B; gene expression; immunity; apoptosis

**Corresponding author:** XU Qingsong. E-mail: qingsongxu2003@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31372347); Special Project of Dalian Minzu University for Service National Strategy (0970-110007); Scientific Research Fund Project of Dalian Minzu University (110181)