



低氧胁迫下中华绒螯蟹血淋巴细胞的转录组学

候利波¹, 陆银月², 任秋霖¹, 孔祥会¹,
朱雷¹, 顾伟², 孟庆国^{2*}

(1. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007;

2. 南京师范大学海洋科学与工程学院, 江苏省水生甲壳动物病害重点实验室, 江苏 南京 210046)

摘要: 为了探究低氧胁迫对中华绒螯蟹血淋巴细胞影响的分子机制, 实验通过使用 Nova Seq 6000 测序技术, 检测了低氧组 (1.5±0.5) mg/L 和对照组 (6.0±0.5) mg/L 分别处理 24 h 后的中华绒螯蟹血淋巴细胞的转录组数据变化。首先, 对测序得到的原始数据进行拼接、注释以及筛选, 分析获得的 128 614 个转录本和 128 614 条基因, 平均长度为 2 634 bp (N50), Q30 > 92%。其次, 以 1.2 倍为阈值, 共筛选出 1 687 个差异表达基因, 其中上调基因 899 个, 下调基因 788 个。GO 和 KEGG 分析发现, 低氧胁迫对中华绒螯蟹血淋巴细胞的三羧酸循环、糖酵解途径、ECM-受体相互作用、间隙连接、细胞凋亡、酚氧化酶系统以及其他免疫相关基因等产生了显著影响。最后, 随机挑选转录组数据中的 10 个基因进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 验证, 结果显示与转录组数据分析相一致, 其中包括 6 个上调的基因: 整合素 1、铜/锌超氧化物歧化酶、磷酸肌醇 3 激酶、磷酸甘油酸突变酶 2、PDGF/VEGF 相关因子 1 和 relish; 4 个下调的基因: 无脊椎连接蛋白 7、热休克蛋白 90、线粒体 ATP 合成酶 α 和天冬氨酸转氨酶。本研究初步阐明了中华绒螯蟹血淋巴细胞短时间内应对低氧胁迫的分子机制, 同时该结果也可为今后研究其他甲壳动物在应对低氧胁迫时的生理机制和分子机制提供参考。

关键词: 中华绒螯蟹; 血淋巴细胞; 低氧胁迫; 转录组分析

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 俗称河蟹, 其味道鲜美、营养丰富, 是我国重要的淡水经济养殖品种之一。但是近些年来, 随着养殖规模以及养殖密度的不断增加, 中华绒螯蟹养殖业面临着诸如低氧胁迫、高温、氨氮胁迫以及病原菌感染等的影响^[1]。在水环境中, 溶解氧 (DO) 容易受到水体的富营养化、极端天气 (如大风、暴雨等)、高密度养殖等多种因素影响, 导致低氧胁迫, 是对水产养殖影响最大的外界压力之一^[2-5]。到目前为止, 已证实低氧胁迫可以给水产养殖动物带来

严重的影响, 如抑制生长、免疫系统破坏、呼吸系统紊乱等^[6-7]。

研究表明, 水生甲壳动物可以采取多种不同的方法来应对短时间内低氧胁迫带来的不利影响。如拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 可以通过直接利用空气中的氧气, 或者利用外壳上残存的水中所溶解的氧气进行呼吸^[8]。克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 和普通滨蟹 (*Carcinus maenas*) 在面对环境缺氧时, 可以转移到含氧量较高的地方进行活动, 以降低缺氧所带来的危害^[9]。但是, 如果

收稿日期: 2021-08-08 修回日期: 2021-10-09

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0900602); 国家自然科学基金 (31870168); 江苏现代农业产业技术体系专项 [JATS(2020)303]; 河南省自然科学基金 (212300410175)

第一作者: 候利波 (照片), 从事水产甲壳动物病害与免疫研究, E-mail: houlib0106@163.com

通信作者: 孟庆国, 从事水生动物病害研究, E-mail: mlzxcd@aliyun.com



长时间处于低氧的环境当中, 甲壳动物正常的生理代谢、免疫系统等都会受到严重的损伤, 从而使得机体更容易受到病原的感染, 最终造成严重的经济损失^[10]。由于缺少获得性免疫, 甲壳动物完全依赖先天免疫抵抗外来病原微生物的感染, 而血淋巴细胞是其最为重要的免疫细胞^[11-12]。甲壳动物的血淋巴细胞不仅是一种重要的免疫细胞外, 其更重要的生物学功能是氧气的传递, 因此血淋巴细胞被认为是应对低氧环境的第一道屏障。例如, 研究证实低氧胁迫可以通过破坏凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 血淋巴细胞的正常代谢以及先天免疫系统, 使得对虾更容易受到病原的感染, 进而造成大量死亡^[13]。同时低氧胁迫也可以通过影响中华绒螯蟹血淋巴细胞总数、酚氧化酶活性、以及抗氧化应激的能力引起中华绒螯蟹血淋巴细胞的免疫损伤^[14], 但是中华绒螯蟹血淋巴细胞应对低氧胁迫的具体分子机制还不清楚。

目前已有多种方法应用在环境胁迫与生物个体之间相互作用关系的研究中, 如 Xiu 等^[15]通过对日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 单个基因热休克蛋白 70 的研究, 发现该基因在日本沼虾应对环境温度变化以及病原感染过程中具有重要作用。Xu 等^[16]通过高通量测序分析, 初步阐明了凡纳滨对虾应对低盐胁迫的分子机制。而转录组分析作为高通量测序的一种, 由于其具有检测覆盖面广、准确率高等特点, 被广泛应用到探究个体与外界环境之间关系、宿主与病原感染之间关系等相关研究中^[8-9]。为了进一步探究中华绒螯蟹血淋巴细胞和低氧应激之间的相互作用关系, 阐明中华绒螯蟹血淋巴细胞应对低氧胁迫的分子机制, 本研究通过使用 Nova Seq 6000 测序技术, 分别检测了中华绒螯蟹低氧组 (1.5±0.5) mg/L 和对照组 (6.0±0.5) mg/L 在处理 24 h 后的血淋巴细胞的转录组数据变化, 发现多种生物学过程或者信号通路参与到了中华绒螯蟹血淋巴细胞应对低氧胁迫的过程当中。这一结果为阐明中华绒螯蟹应对低氧胁迫的分子机制, 以及为今后研究其他甲壳动物在应对低氧胁迫时的生理机制和分子机制提供了重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象

实验所用中华绒螯蟹采自江苏省宝应县养殖塘口, 体重 (25±5) g, 暂养于紫外循环控温养殖

缸中 [DO 为 (6.0±0.5) mg/L, 温度为 28 °C], 1 周后, 选取体表无损伤, 附肢完整, 活力较好的个体进行实验。本实验所有操作严格遵守实验动物福利伦理和动物实验安全审查规范, 并按照本单位动物实验伦理审查委员会制定的规章制度执行。

1.2 主要实验器材和试剂

匀浆机 (IKA[®], 德国); 1 mL 一次性无菌注射器 (康德莱, 上海); -80 °C 超低温冰箱 (Thermo, 美国); 高速冷冻离心机 (Eppendorf, 德国); 溶氧仪 (Bante821, 中国); 荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD, 美国); NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo, 美国); Nova Seq 6000 高通量测序系统 (illumina, 美国); PBS 缓冲液 (Solarbio, 北京); 实时荧光定量试剂盒 Hieff[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix (翊圣, 上海); DEPC 水 (捷瑞, 上海); 超纯总 RNA 提取试剂盒 (RP5611, BioTeke, 北京)。

1.3 低氧胁迫处理

随机挑选 20 只健康的中华绒螯蟹置于覆盖有保鲜膜的箱中 (80 cm×60 cm×35 cm), 向箱内充氮气, 将溶解氧含量降至 (1.5±0.5) mg/L。按照通常研究定义, 当水中的溶解氧含量低于 2.8 mg/L 即为低氧, 同时根据以往研究, 本实验设置 (1.5±0.5) mg/L 为实验浓度^[17-18]。实验期间, 使用溶氧仪随时检测溶解氧含量, 使得实验组中中华绒螯蟹处于相对稳定的低氧环境。对照组中华绒螯蟹置于循环水中, 保持溶解氧含量维持在 (6.0±0.5) mg/L。24 h 后分别从实验组和对照组随机挑选 10 只中华绒螯蟹抽取血淋巴, 并将实验组和对照组 10 只中华绒螯蟹的血淋巴分别混合为一个样品, 即实验组 1 和对照组 1, 离心后收集的血淋巴细胞存于液氮罐中用于后续实验。实验组和对照组分别进行 2 次上述实验过程。

1.4 中华绒螯蟹血淋巴细胞 RNA 的提取及 cDNA 反转

抽取中华绒螯蟹血淋巴, 与抗凝剂以体积比 1:1 混合, 4 °C 下, 以 1 000 r/min 离心 6 min。离心后弃去上清液, 在沉淀中加入 1 mL 的裂解液 RL (超纯总 RNA 提取试剂盒), 使用匀浆仪进行破碎。根据超纯总 RNA 提取试剂盒说明书提取中华绒螯蟹血淋巴细胞总 RNA; 使用 NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers 检测 RNA

纯度和浓度, 同时通过核酸电泳确定 RNA 的完整度。提取完成的 RNA 一部分用于转录组测序, 一部分用于后续的荧光定量 PCR(qRT-PCR) 验证。根据 cDNA 反转录试剂盒说明书, 在 200 μ L 的 RNase-free 离心管中配制混合液: 模板 RNA 1 μ g, 4 \times gDNA wiper Mix 4 μ L, RNase-free ddH₂O 加至 16 μ L。将上述混合液混匀, 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中放置 2 min, 随后在上述反应液中加入 5 \times HiScript III qRT SuperMix 4 μ L, 用移液枪吹打混匀后, 按照下述反应程序在 PCR 仪中进行逆转录反应: 37 $^{\circ}$ C, 15 min; 85 $^{\circ}$ C, 5 s。最终合成的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.5 转录组数据预处理与拼接

使用 NovaSeq 6000 系统对 cDNA 文库进行测序, 通过 LC Sciences 分析仪 (美国) 产生了大于 100 bp 的原始数据 (raw reads)。使用 FASTX-Toolkit 过滤原始测序数据以获取有效数据 (clean reads)。具体获得有效数据的参数设置: ①去除 reads 中的接头序列和由于测序仪器硬件等原因而未插入片段的 reads; ②去除含 N 比率超过 10% 的 reads; ③去除总体质量偏低的 reads, 即 Q=20、碱基比例小于 50% 的 reads; ④舍弃 adapter 及质量修剪后长度小于 20 bp 的序列。然后使用 Trinity 系统 (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net>) 对获得的高通量测序数据进行组装拼接。

1.6 转录组注释

对 Trinity 系统拼接获得的 unigenes 进行开放阅读框 (ORF) 预测, 并进行 BLASTx 相似性搜索。然后再分别与 NR、Swiss-Prot、Pfam、COG、GO、KEGG 数据库进行比对注释。NR 注释: NR 数据库属于非冗余蛋白序列数据库, 将得到的序列与之比对, 进行功能注释。Swiss-Prot 注释: 将获得的序列在 Swiss-Prot 数据库中注释, 可得到更高质量的注释结果 (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>)。Pfam 注释: Pfam 是一个被广泛使用的蛋白家族数据库, 可将蛋白质分为不同的家族, 具体可见 <http://pfam.xfam.org/>。COG 注释: COG 数据库为原核生物提供相似的基因同源物的分类信息 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)。GO 注释: GO 是由基因本体联合会开发, 为解决不同生物学数据库间的各种问题, 将其统一适用于各种生物的一个数据库, 主要包括三个方面: 分子功能、生物过程和细胞组成 (<http://www.geneontology.org/>)。

KEGG 注释: KEGG 是进行生物体内代谢分析、代谢网络研究的强有力工具 (<http://www.genome.jp/kegg/>)。

1.7 转录组中差异基因筛选与分析

为筛选低氧胁迫下中华绒螯蟹血淋巴细胞差异表达的基因, 使用 Reads Per Kilobase per Million mapped reads (RPKM) 方法进行差异表达分析^[19]。分析过程中以 Fold change ≥ 1.2 为阈值。最后对所有基因在各个样本中的表达情况进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)^[20]。

1.8 qRT-PCR 验证

为了进一步验证转录组数据的准确性, 随机挑选转录组数据中的 10 个显著差异的基因进行 qRT-PCR 分析验证, 包括 6 个上调的基因: 整合素 1、铜/锌超氧化物歧化酶、磷酸肌醇 3 激酶、磷酸甘油酸突变酶 2、PDGF/VEGF 相关因子 1 和 relish 等基因。4 个下调的基因: 无脊椎连接蛋白 7、热休克蛋白 90、线粒体 ATP 合成酶 α 和天冬氨酸转氨酶等基因。所有引物序列见表 1, 所选用的内参基因为 18S rDNA。每组 3 个重复, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法分析基因的相对表达量 ($P < 0.05$)^[21]。

2 结果

2.1 转录组数据

使用 NovaSeq 6000 平台对常氧组 (Normoxia_hemocytes, N_h) 和低氧组 (Hypoxia_hemocytes, H_h) 中华绒螯蟹血淋巴细胞进行高通量测序。通过对所得到的原始数据进行筛选后, 每个测序文库至少得到 4 600 万个 clean reads, 且每个样品的 GC 含量为 50.05%~51.85%, Q30 都超过 92%。通过 Trinity 组装, 一共得到了 128 614 个基因, 其平均长度 (N50) 为 2 634 bp。统计获得的基因 COG 分布图见图 1。将组装拼接所得基因序列分别进行 NR、Swiss-Prot、Pfam、COG、GO 以及 KEGG 注释, 其得到的结果依次为 64 154 个 (64.77%)、49 195 个 (49.67%)、51 654 个 (52.15%)、52 919 个 (53.43%)、52 865 个 (53.37%) 和 37 022 个 (37.38%) (图 2-a)。其中在 NR 数据库的匹配基因中, 与凡纳滨对虾具有相似性的基因占 61.30%, 与中华绒螯蟹具有相似性的基因占 8.40%, 14.68% 的基因与数据库中其他物种没有高度相似性 (图 2-b)。

表 1 荧光定量 PCR 所用引物

Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名称 primers name	引物序列 sequences (5'-3')
Es18S-F	TCCAGTTCGCAGCTTCTTCTT
Es18S-R	AACATCTAAGGGCATCACAGA
EsIntegrin-β1-F	TGCTCGCTGGAACGGGTCA
EsIntegrin-β1-R	CGCCAAATCGTCACGACACTG
EsInnexin-7-F	GCCAGGGATACAGATTCCGGTA
EsInnexin-7-R	TGTCCTACTCGCAGCATAGAA
EsHsp90-3-F	GCACAACTCTGCCTTTGTGG
EsHsp90-3-R	ACTCCTTCAGTTGCTGGACG
EsPI3K-F	GGGACAGAGCAGAACGGATG
EsPI3K-R	GCTGATCCGGTACATTGGGT
EsPGAM 2-F	GGAAACTCTCTCCGTGGCAT
EsPGAM 2-R	GGCCTTACGCACTGTCTCTT
EsAST-F	CCGCAATCCTACCAATCCT
EsAST-R	GGGGTCATTCCAGTGAAGCA
EsRelish-Q-F	ACAACAGCCGAAGGAGTCAG
EsRelish-Q-R	AGACTCTCAGCAGCACTCAC
EsSOD3-F	GATATGGTCCCTGGCGTTGA
EsSOD3-R	GTGCACTGCTCTGAGAGGTC
EsVEGF1-F	GACAAACCCTGAACCACACC
EsVEGF1-R	AGCGTTGTACCTTGCTCCA
EsATPα-F	CGGTAACGACAAGCTGATCC
EsATPα-R	TAATGCCAGGAGCCTTCACA

在本实验中, 56 825 个 unigenes 根据 GO 分类被分为 3 个功能类别项, 共包括 51 个功能集合 (图 3-a)。其中生物过程 20 个、细胞成分 15 个、分子功能 16 个。KEGG 注释结果显示, 37 022 个 unigenes 得到了匹配。根据这些信号通路的生物学功能, 可以大概分为新陈代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、组织系统和疾病 6 大类 (图 3-b)。

2.2 差异表达分析的 GO 与 KEGG 富集分析

为研究中华绒螯蟹血淋巴细胞在低氧胁迫下的分子机制, 以 1.2 倍 ($P < 0.05$) 为阈值分析低氧胁迫下中华绒螯蟹血淋巴细胞中差异表达的基因。在低氧胁迫 24 h 后, 共筛选出 1 687 个差异表达基因, 其中上调基因 899 个, 下调基因 788 个 (图 4)。GO 富集分析显示, 这些差异表达的基因主要集中在丝氨酸型内肽酶抑制因子、生长因子活性、糖酵解过程等生理活动 (图 5-a)。KEGG 数据库中, 对低氧胁迫后中华绒螯蟹血淋巴细胞差

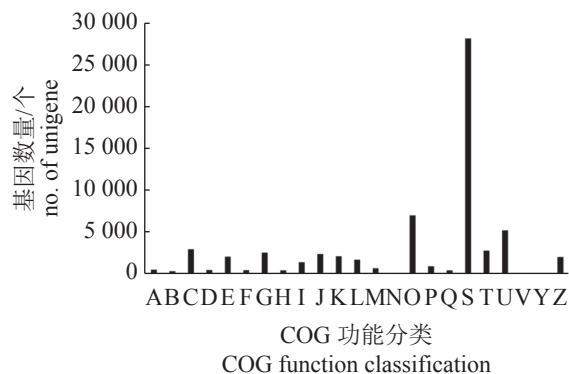


图 1 unigenes 长度的分布

A. RNA 加工和修饰; B. 染色体结构和动力; C. 能量产生与转换; D. 细胞周期; E. 氨基酸转运和代谢; F. 核酸转运和代谢; G. 碳水化合物转运和代谢; H. 辅酶转运和代谢; I. 脂质转运和代谢; J. 翻译, 核糖体结构与合成; K. 转录; L. 复制、合成、修复; M. 细胞壁和细胞膜合成; N. 细胞运动; O. 翻译后修饰、蛋白转运; P. 无机离子转运和代谢; Q. 次要代谢物合成、代谢以及转运; S. 未知功能基因; T. 信号转导; U. 细胞分泌以及膜泡运输; V. 防御机制; Y. 核酸结构; Z. 细胞骨架。

Fig. 1 Distribution of the unigenes length

A. RNA processing and modification; B. chromatin structure and dynamics; C. energy production and conversion; D. cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E. amino acid transport and metabolism; F. nucleotide transport and metabolism; G. carbohydrate transport and metabolism; H. coenzyme transport and metabolism; I. lipid transport and metabolism; J. translation, ribosomal structure and biogenesis; K. transcription; L. replication, recombination and repair; M. cell wall/membrane/envelope biogenesis; N. cell motility; O. posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P. inorganic ion transport and metabolism; Q. secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; S. function unknown; T. signal transduction mechanisms; U. intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V. defense mechanisms; Y. nuclear structure; Z. cytoskeleton.

异表达基因的富集分析结果见图 5-b, 包括 ECM-受体相互作用、间隙连接、吞噬体等免疫相关通路, 以及半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、糖酵解、醚脂质代谢、淀粉和蔗糖代谢、果糖和甘露糖代谢等代谢通路。

2.3 qRT-PCR 验证分析

为验证转录组得到的差异表达基因, 随机选择其中的 10 个进行 qRT-PCR 分析。结果显示, 所有挑选基因的表达趋势 (即上调和下调的趋势) 与 RNA-seq 分析结果一致 (图 6)。

3 讨论

在水产养殖中, 低氧胁迫作为一种常见的外界应激压力, 给水产养殖业的可持续发展带来严

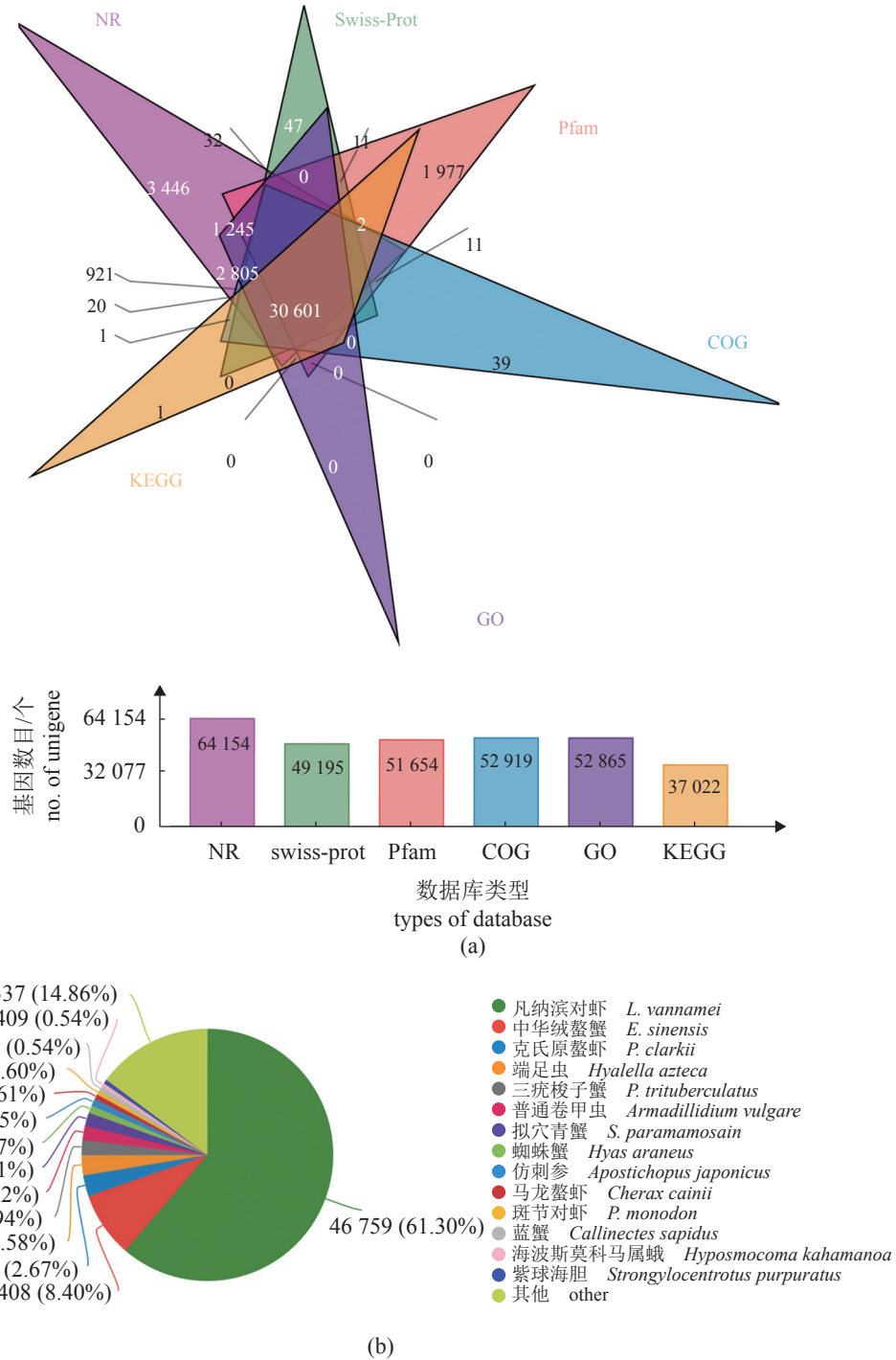


图 2 unigenes 功能注释统计分析

(a) 各数据库功能注释统计韦恩图; (b) 基于 NR 数据库的物种类别比较, 数字代表本研究中所得到的 unigenes 在 NR 数据库中所匹配到的与不同物种相似基因个数, 括号内数字代表这些基因在本研究所鉴定到的 unigenes 所占比。

Fig. 2 Functional annotation analysis of unigenes

(a) Venn diagram of statistics of functional annotation of each database; (b) species category comparison based on the NR database, the number represents the number of genes similar to different species matched by unigenes in the NR database, and the number in brackets represents the proportion of these genes in the unigenes identified in this paper.

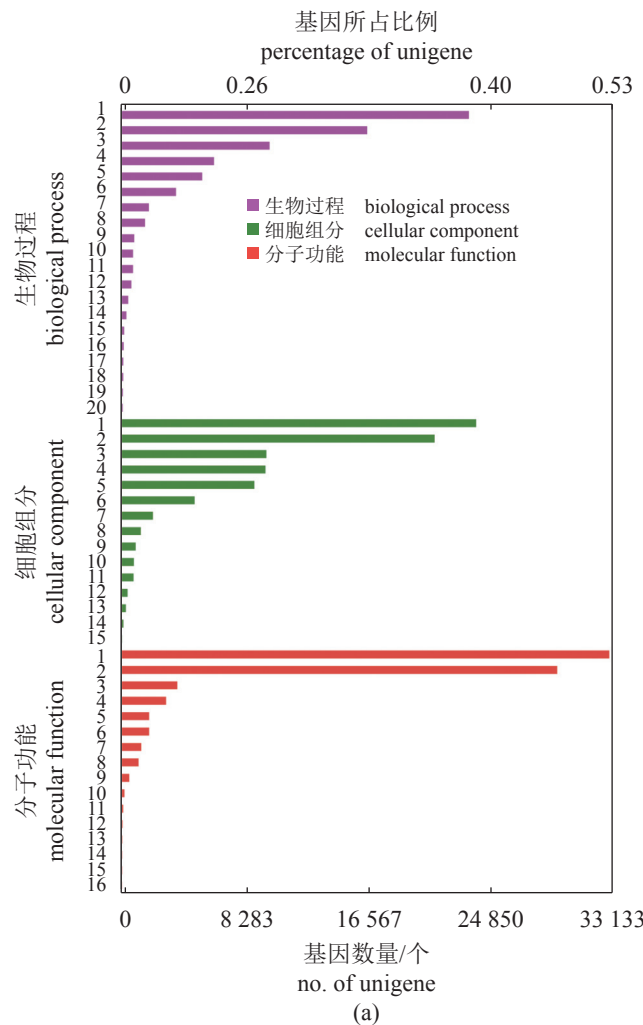
重的影响。甲壳动物的血淋巴细胞在个体的先天免疫和代谢过程中发挥着重要作用^[7, 12, 14], 但目前

尚无中华绒螯蟹血淋巴细胞应对低氧胁迫分子机制的转录组研究。本研究的目的是利用转录组分

析, 鉴定有哪些基因或信号通路参与到了中华绒螯蟹血淋巴细胞应对低氧胁迫的过程中, 从而阐明中华绒螯蟹血淋巴细胞应对低氧胁迫的分子机制。本研究中, 通过转录组测序分析发现, 在中华绒螯蟹血淋巴细胞面对低氧胁迫 24 h 时, 一共有 1 687 个基因的表达发生了显著变化, 其中包括 899 个上调基因和 788 个下调基因。通过对这些差异表达基因进行生物信息学分析, 发现这些差异表达基因参与到多个生物学过程, 例如三羧酸循环、糖酵解、ECM-receptor 相互作用、细胞间隙连接、细胞凋亡、酚氧化酶系统等。本研究结果显示, 这些信号通路或生理过程在中华绒螯蟹血淋巴细胞应对低氧刺激过程中发挥了重要作用。

对于所有的有氧呼吸的生物体来说, 三羧酸循环是一个由许多蛋白组成的不可或缺的能量代谢网络, 而这些蛋白的正常表达是该代谢过程正常运行的必要条件^[22-24]。例如, NADH 脱氢酶可以促使电子进入线粒体呼吸链, 进而参与 ATP 合

成的重要蛋白, 该蛋白的异常将会严重影响 ATP 的合成^[22]。苹果酸脱氢酶作为参与 TCA 循环的一种关键酶, 在葡萄糖代谢和能量产生中发挥着必不可少的作用^[23-24]。延胡索酸水合酶作为一种典型的 TCA 循环线粒体酶, 在催化延胡索酸转化为苹果酸的过程中发挥着不可替代的作用^[25]。除了上述提到的几种 TCA 循环关键酶外, 还有很多酶在这一过程中发挥着至关重要的作用, 如 ATP 合酶、2,4-二烯酰辅酶 A 还原酶等。在本研究中发现, 中华绒螯蟹血淋巴细胞在低氧胁迫的应激下, TCA 循环的多种酶的基因表达量显著下调, 其中包括多种 NADH 脱氢酶、多个 ATP 合成酶、2,4-二烯酰辅酶 A 还原酶、延胡索酸水合酶以及苹果酸脱氢酶等。这些结果充分说明, 当中华绒螯蟹处于低氧环境时, 血淋巴细胞的 TCA 循环受到了严重的影响, 进而使得机体的能量代谢和 ATP 合成过程受到抑制。为了应对环境中氧气含量的降



(图 3 Fig. 3)

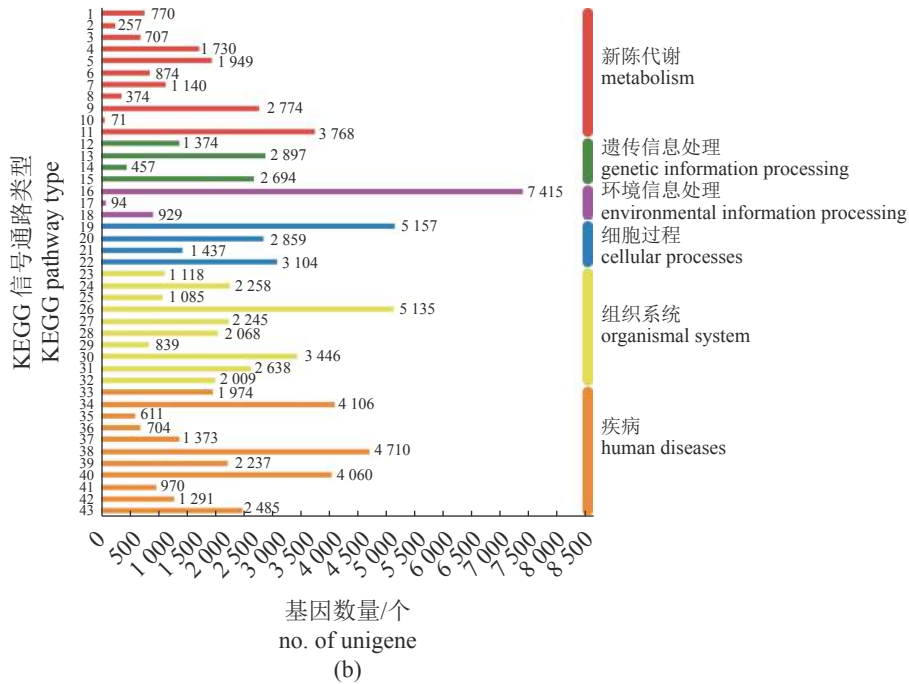


图3 unigenes的GO和KEGG分析

(a) 中华绒螯蟹血淋巴细胞转录组 unigenes 的 GO 分类; 横坐标轴表示 unigene 的数量, 纵坐标轴表示 GO 的三种分类, 即生物过程、细胞组分以及分子功能, 其中, 生物过程包括: 1. 细胞过程, 2. 代谢过程, 3. 生物调节, 4. 细胞定位, 5. 细胞组成或生物发生, 6. 应激反应, 7. 多重生物过程, 8. 发育过程, 9. 生物黏附, 10. 细胞死亡, 11. 多细胞生物的过程, 12. 复制过程, 13. 免疫系统过程, 14. 运动相关, 15. 生长相关, 16. 信号传递相关, 17. 细胞增殖相关, 18. 细胞行为相关, 19. 脱毒相关, 20. 节律过程; 细胞组分包括: 1. 细胞部分, 2. 细胞膜部分, 3. 细胞器, 4. 蛋白复合物, 5. 细胞器部分, 6. 细胞膜, 7. 胞外区域, 8. 胞外区域部分, 9. 细胞, 10. 超分子复合物, 11. 细胞连接, 12. 膜结构包裹的腔, 13. 突触部分, 14. 突触, 15. 拟核; 分子功能包括: 1. 结合, 2. 催化活性, 3. 转运活性, 4. 分子功能调节, 5. 翻译调节活性, 6. 结构分子活性, 7. 活动分子传感器, 8. 转录调节活性, 9. 抗氧化活性, 10. 受体活性, 11. 标签蛋白, 12. 物质转运活性, 13. 毒素活性, 14. 分子载体, 15. 分子伴侣, 16. 小分子感应器。(b) 中华绒螯蟹血淋巴细胞转录组 unigenes 的 KEGG 通路注释分析, 横坐标轴表示 unigene 的数量, 纵坐标轴表示 KEGG 信号通路种类, 1. 核酸代谢, 2. 萜类和多酮类代谢, 3. 多糖生物合成与代谢, 4. 脂质代谢, 5. 能量代谢, 6. 其他氨基酸代谢, 7. 辅助因子和维生素代谢, 8. 外来生物的降解和代谢, 9. 氨基酸代谢, 10. 其他二级代谢产物合成, 11. 碳水化合物代谢, 12. 转录, 13. 翻译, 14. 复制和修复, 15. 折叠分装盒降解, 16. 信号转导, 17. 生物膜运输, 18. 信号分子和相互作用, 19. 运输和代谢, 20. 细胞免疫-真核, 21. 细胞运动, 22. 细胞生长和死亡, 23. 增殖, 24. 消化系统, 25. 细胞衰老, 26. 内分泌系统, 27. 排泄系统, 28. 环境适应, 29. 感觉系统, 30. 免疫系统, 31. 神经系统, 32. 循环系统, 33. 癌症-特定类型, 34. 细菌传染病, 35. 物质依赖性, 36. 抗肿瘤药耐药性, 37. 心血管疾病, 38. 病毒传染病, 39. 神经退行性疾病, 40. 癌症-概述, 41. 免疫疾病, 42. 寄生虫传染病, 43. 内分泌代谢疾病。

Fig. 3 Analysis of unigenes GO and KEGG

(a) GO classification of unigenes of *E. sinensis* hemocyte; the x-axis represents the number of unigene; the y-axis represents the three classifications of GO: biological processes, cellular components, and molecular functions; for biological processes: 1. cellular process, 2. metabolic process, 3. biological regulation, 4. localization, 5. cellular component organization or biogenesis, 6. response to stimulus, 7. multi-organism process, 8. developmental process, 9. biological adhesion, 10. cell killing, 11. multicellular organismal process, 12. reproductive process, 13. immune system process, 14. locomotion; 15. growth, 16. signaling, 17. cell population proliferation, 18. behavior, 19. detoxification, 20. rhythmic process, for cellular components: 1. cell part, 2. membrane part, 3. organelle, 4. protein-containing complex, 5. organelle part, 6. membrane, 7. extracellular region, 8. extracellular region part, 9. cell, 10. supramolecular complex, 11. cell junction, 12. membrane-enclosed lumen, 13. synapse part, 14. synapse, 15. nucleoid, for molecular functions: 1. binding, 2. catalytic activity, 3. transporter activity, 4. molecular function regulator, 5. translation regulator activity, 6. structural molecule activity, 7. molecular transducer activity, 8. transcription regulator activity, 9. antioxidant activity, 10. cargo receptor activity, 11. protein tag, 12. cargo adaptor activity, 13. toxin activity, 14. molecular carrier activity, 15. protein folding chaperone, 16. small molecule sensor activity. (b) KEGG pathways assignment unigenes of *E. sinensis* hemocyte. the y-axis represents the KEGG pathway; the x-axis represents the number of unigene; 1. nucleotide metabolism, 2. metabolism of terpenoids and polyketides, 3. glycan biosynthesis and metabolism, 4. lipid metabolism, 5. energy metabolism, 6. metabolism of other amino acids, 7. metabolism of cofactors and vitamins, 8. xenobiotics biodegradation and metabolism, 9. amino acid metabolism, 10. biosynthesis of other secondary metabolites, 11. carbohydrate metabolism, 12. transcription, 13. translation, 14. replication and repair, 15. folding, sorting and degradation, 16. signal transduction, 17. membrane transport, 18. signaling molecules and interaction, 19. transport and catabolism, 20. cellular community-eukaryotes, 21. cell motility, 22. cell growth and death, 23. development, 24. digestive system, 25. aging, 26. endocrine system, 27. excretory system, 28. environmental adaptation, 29. sensory system, 30. immune system, 31. nervous system, 32. circulatory system, 33. cancers: specific types, 34. infectious diseases: bacterial, 35. substance dependence, 36. drug resistance: antineoplastic, 37. cardiovascular diseases, 38. infectious diseases: viral, 39. neurodegenerative diseases, 40. cancers: overview, 41. immune diseases, 42. infectious diseases: parasitic, 43. endocrine and metabolic diseases.

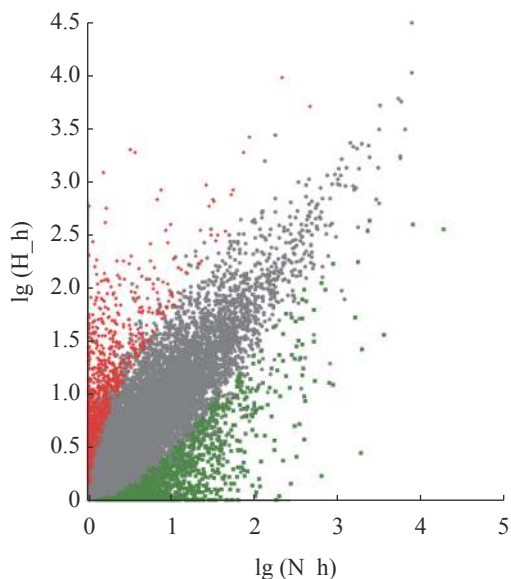


图4 低氧组(H_h)与常氧组(N_h)
差异基因分布趋势

红色散点表示上调基因(899个), 绿色散点表示下调基因(788个), 灰色散点表示没有变化的基因。

Fig. 4 Overview of DEGs distribution trends between the hypoxia (H_h) and normoxia (N_h) group

Red scatters indicate up-regulated genes (899), green scatters indicate down-regulated genes (788), and gray scatters indicate no genes.

低, 水生生物通常会调整其代谢途径以获得更多的能量, 例如拟穴青蟹可以通过增加无氧呼吸过程(糖酵解)应对低氧胁迫的影响^[26]。在本研究中, 通过转录组学分析得到中华绒螯蟹血淋巴细胞在应对低氧胁迫时, 多种糖酵解相关酶的基因发生了显著上调, 例如, 两种L-乳酸脱氢酶、磷酸甘油酸激酶、磷酸甘油酸变位酶、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、磷酸丙糖异构酶。这一结果说明低氧胁迫严重影响了中华绒螯蟹血淋巴细胞TCA循环的进行, 而机体为了应对这一影响, 通过调整多种糖酵解相关酶的表达变化, 增强无氧呼吸过程, 进而为机体提供更多的能量。这一结果与之前报道的有关水生生物应对低氧刺激时的机制相似^[3, 27-28]。

目前多个报道已经证实, 在低氧条件下, 线粒体可以产生大量的活性氧(ROS)^[29-30]。而过多的ROS会破坏一些重要的生物大分子, 如蛋白质、脂类、DNA等, 从而严重影响细胞的结构和功能^[31]。无论在脊椎动物还是在无脊椎动物中, 由超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和硫氧还蛋白组成的抗氧化防御系统, 在维持机体ROS的平衡和避免机体受到氧化应激带来

的损伤方面发挥着重要的作用^[32]。本研究通过转录组学分析得到, 中华绒螯蟹血淋巴细胞面对低氧胁迫时, 有多种抗氧化应激相关的蛋白基因的表达水平显著上调, 其中包括三种超氧化物歧化酶、两种硫氧还蛋白、两种谷胱甘肽转移酶等。这些结果说明, 当中华绒螯蟹血淋巴细胞面对低氧胁迫应激时, 可能通过提高这些关键的抗氧化酶的表达水平, 减少ROS给机体带来的损伤, 从而帮助机体抵抗低氧引发的氧化应激反应。已有多个研究表明, 在缺氧条件下, 抗氧化应激系统的激活是机体应对ROS带来损伤的预备机制^[33-34]。

细胞外基质是分泌到细胞外空间的生物大分子, 它参与到了生物体多种生理活动的调节当中, 例如信号传递、脂肪生成、细胞迁移、细胞凋亡等^[35-36]。整合素作为介导细胞与细胞外基质相互作用最常见的受体, 当受到胞外信号刺激后, 整合素会被激活, 而激活的整合素可以招募下游的多个蛋白, 形成一个信号传递网络, 将胞外信号传递到胞内, 例如整合素可以通过招募活化蛋白激酶C受体、肌动蛋白相关蛋白2/3、酪氨酸蛋白激酶Src、肌动蛋白(actin)等, 最终引起细胞骨架的重排^[37-38]。在哺乳动物中, 缺氧可以通过影响整合素以及整合素介导的相关信号通路, 诱导心肌成纤维细胞转化为肌成纤维细胞^[39]。在本研究中, 通过与对照组比较, 在低氧胁迫下中华绒螯蟹血淋巴细胞的多个整合素相关基因的表达都发生了显著的变化, 例如, 整合素β1、整合素α-PS3、蛋白激酶C受体、肌动蛋白相关蛋白2/3、β-actin等。这一结果说明, 低氧应激可能通过中华绒螯蟹血淋巴细胞膜表面的整合素受体, 将信号传递到细胞内部, 从而通过细胞骨架的重排影响细胞的运动等生理活动。在多细胞生物中, 细胞间的通讯在维持组织或器官内环境的稳定方面发挥着重要的作用。由相邻细胞的两个连接蛋白相互作用形成的Gap连接为细胞间小分子物质的直接交换提供了通道, 例如环磷酸腺苷、Ca²⁺、肌醇三磷酸等小分子物质都可以通过该通道进行传递^[40]。由连接蛋白形成的Gap连接参与到了多种细胞生理活动的调节当中, 例如有研究证实, 缺氧可以影响细胞内的Ca²⁺浓度, 破坏心肌细胞的Gap连接, 进而影响细胞间的通讯, 同时随着缺氧时间的延长, Gap连接的功能将受到显著抑制^[41]。大量研究表明, 无脊椎动物的间隙连接蛋白与脊椎动物的连接蛋白具有相同的拓扑结构,

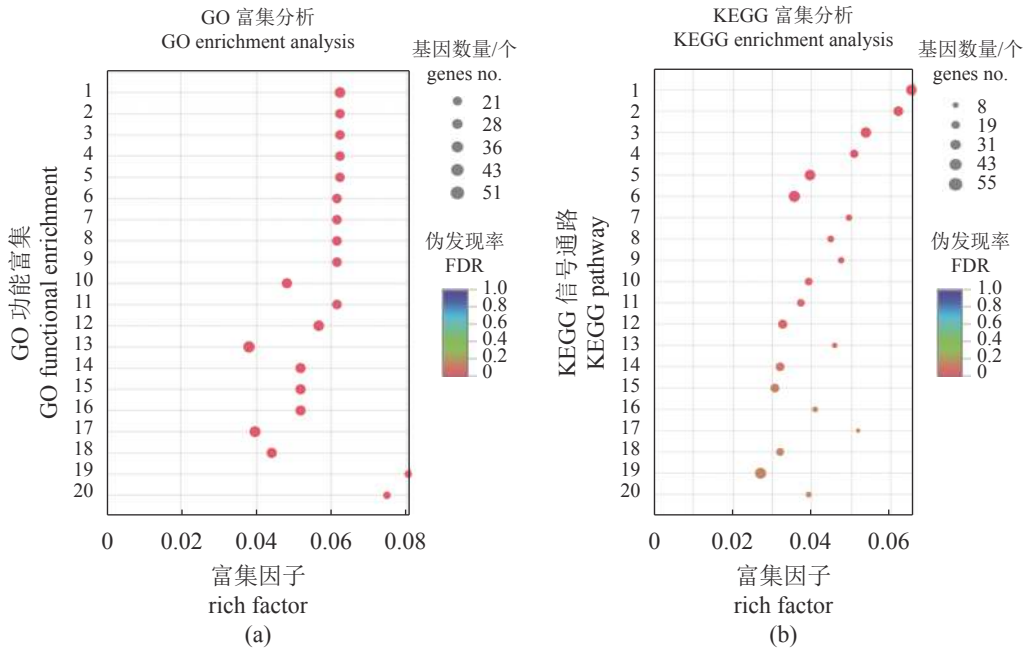


图 5 差异基因的富集分析

(a) DEGs 的 GO 富集分析; 1. 单细胞生物碳水化合物分解过程, 2. 糖酵解过程, 3. ATP 合成, 4. 核苷酸磷酸化, 5. 二磷酸核苷磷酸化, 6. ADP 代谢过程, 7. 二磷酸核糖核苷代谢过程, 8. 嘌呤核苷二磷酸代谢过程, 9. 嘌呤二磷酸核糖核苷的代谢过程, 10. 氧化还原辅酶代谢过程, 11. 核苷二磷酸代谢过程, 12. 碳水化合物代谢过程, 13. 代谢物和能量前体生成过程, 14. 烟酰胺核苷酸代谢过程, 15. 吡啶核苷酸代谢过程, 16. 含吡啶化合物的代谢过程, 17. 磷酸化, 18. 丙酮酸代谢过程, 19. 丝氨酸型内肽酶抑制剂活性, 20. 生长因子活性。(b) DEGs 的 KEGG 富集通路散点图; 1. 细胞外基质-受体相互作用, 2. 戊糖途径, 3. 军团菌属, 4. 果糖甘露糖代谢, 5. 糖异生作用, 6. RNA 转运, 7. 半胱氨酸甲硫氨酸代谢, 8. 麻疹, 9. 抗原处理与呈递过程, 10. 雌激素信号通路, 11. 间隙连接, 12. 内质网蛋白加工, 13. 补体系统, 14. 甲型流感, 15. 剪接体, 16. 前列腺癌, 17. 脂肪消化与吸收, 18. 肺结核, 19. 吞噬体, 20. 丙酸代谢。横坐标轴表示 rich factor, rich factor 越大, 富集程度越大, 纵坐标轴表示 GO term 和通路名称。

Fig. 5 Enrichment analysis of different expression genes

(a) relative GO enrichment for DEGs; 1. single-organism carbohydrate catabolic process, 2. glycolytic process, 3. ATP generation from ADP, 4. nucleotide phosphorylation, 5. nucleoside diphosphate phosphorylation, 6. ADP metabolic process, 7. ribonucleoside diphosphate metabolic process, 8. purine nucleoside diphosphate metabolic process, 9. purine ribonucleoside diphosphate metabolic process, 10. oxidoreduction coenzyme metabolic process, 11. nucleoside diphosphate metabolic process, 12. carbohydrate catabolic process, 13. generation of precursor metabolites and energy, 14. nicotinamide nucleotide metabolic process, 15. pyridine nucleotide metabolic process, 16. pyridine-containing compound metabolic process, 17. phosphorylation; 18. pyruvate metabolic process, 19. serine-type endopeptidase inhibitor activity, 20. growth factor activity. (b) scatterplot of enriched KEGG pathways for DEGs, 1. ECM-receptor interaction, 2. pentose phosphate pathway, 3. legionellosis, 4. fructose and mannose metabolism, 5. glycolysis / gluconeogenesis, 6. RNA transport, 7. cysteine and methionine metabolism, 8. measles, 9. antigen processing and presentation, 10. estrogen signaling pathway, 11. gap junction, 12. protein processing in endoplasmic reticulum, 13. complement and coagulation cascades, 14. influenza A, 15. spliceosome, 16. prostate cancer, 17. fat digestion and absorption, 18. tuberculosis, 19. phagosome, 20. propanoate metabolism. x-axis: the rich factor, the higher the rich factor, the greater the degree of enrichment; y-axis: GO term and the pathways.

并且在无脊椎动物中扮演着相似的角色^[42-44]。而在本研究当中, 中华绒螯蟹血淋巴细胞在面对低氧胁迫时, 间隙连接蛋白 2/3/7 的基因都发生显著下调, 说明缺氧可能通过间隙连接蛋白, 影响细胞间的信号传递, 最终导致细胞凋亡或死亡。

细胞凋亡是一种受到精细调控且高度复杂的程序性死亡过程, 线粒体(内源性)途径和死亡受体(外源性)途径是启动细胞凋亡最主要的两个途径^[45]。低氧胁迫是一种重要的细胞凋亡的诱因, 例如在缺氧条件下, 线粒体可以产生过多的 ROS,

释放细胞色素 C (Cyt-C) 到细胞质基质, 进而激活 caspase 依赖的凋亡途径^[46-49]。B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因 (Bcl-2) 是一种非常重要的凋亡抑制蛋白, 过表达 Bcl-2 可以减少线粒体 ROS 的产生以及 Cyt-C 的释放, 从而抑制细胞凋亡的启动^[50]。BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 ku protein-interacting protein 3) 作为一种凋亡促进蛋白, 可以抑制 Bcl-2 的功能发挥, 过表达 BNIP3 会增强由缺氧导致的细胞凋亡增加^[51]。Hsp70 和 Hsp90 作为热休克蛋白家族中重要的两个成员, 也被称为抗凋亡

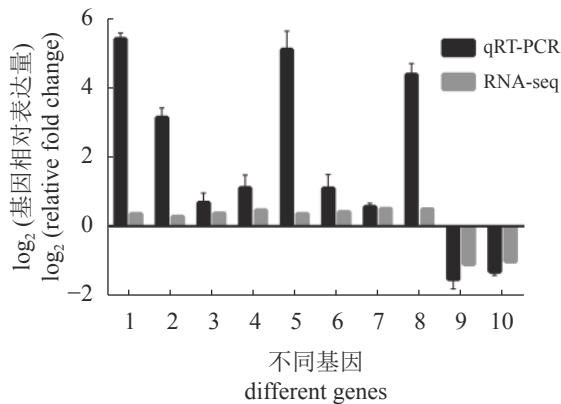


图 6 qRT-PCR 验证 10 个差异基因的表达结果对比

1. 整合素 1 (Esintegrin-β1), 2. 铜/锌超氧化物歧化酶 (EsSOD3), 3. 无脊椎连接蛋白 7 (Esinnexin-7), 4. 热休克蛋白 90 (EsHsp90-3), 5. 线粒体 ATP 合成酶 α (EsATPa), 6. PDGF/VEGF 相关因子 1 (EsVEGFR-1), 7. 磷酸肌醇 3 激酶 (EsPI3K), 8. relish (EsRelish), 9. 天冬氨酸转氨酶 (EsAST), 10. 磷酸甘油酸突变酶 2 (EsPGAM-2).

Fig. 6 Comparison of the expression profiles of 10 selected genes as determined by real-time PCR and by RNA-seq

1. integrin-β1 (EsIntegrin-β1), 2. extracellular Cu/Zn-superoxide dismutase (EsSOD3), 3. innexin-7 (Esinnexin-7), 4. 90 ku heat shock protein (EsHsp90-3), 5. mitochondrial ATP synthase subunit α (EsATPa), 6. PDGF/VEGF-related factor 1 (EsEGF1), 7. phosphoinositide-3 kinase (EsPI3K), 8. relish (Esrelish), 9. aspartate aminotransferase (EsAST), 10. phosphoglycerate mutase 2 (EsPGAM 2).

蛋白。已有多种研究证实, Hsp70 和 Hsp90 可以通过直接或间接参与阻断 caspase 的激活过程^[52-53]。在本研究中, 中华绒螯蟹血淋巴细胞在面对缺氧应激时, 多个与凋亡相关的基因都发生显著变化, 其中包括凋亡诱导蛋白 BNIP3、Cyt-C 和 caspase 7 的基因显著上调, 而抗凋亡蛋白 Hsp70 和 Hsp90 的基因表达量都发生显著下调。这一结果说明, 低氧胁迫可以通过造成线粒体的损伤导致 Cyt-C 释放到细胞质基质, 进而激活 caspase 依赖型的细胞凋亡途径。作为血管内皮生长因子受体 (VEGFRs) 下游主要的信号通路之一, MAPK 信号通路参与了细胞内的多种生理活动的调节。MAPK 信号通路主要分为 ERK1/2、JNK、p38 MAPK 三个分支, 其中 ERK1/2 的激活可以促进细胞的存活, 而 JNK 和 p38 MAPK 的激活则可以诱导细胞凋亡的发生^[54]。MAPK 相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 (MKNK2) 是 MAPK 通路的关键激酶之一, 可以被 p38 MAPK 激活^[55-56]。前期研究表明, MAPK 信号通路在调控缺氧引起的细胞凋亡中发挥重要作用, 如缺氧应激可通过激活 p38 MAPK 信号通路, 诱导人白血病细胞凋亡^[57]。在本研究

中, 通过转录组分析, 发现在中华绒螯蟹血淋巴细胞面对缺氧应激时, 有多个 VEGFR/p38 MAPK 信号通路的基因发生显著上调, 其中包括 VEGFR 2 和 5、VEGFR 配体蛋白 VEGF-1/-2/-5、p38 MAPK 以及 MKNK2。这一结果说明, 缺氧应激可能通过激活中华绒螯蟹血淋巴细胞的 p38 MAPK 信号通路, 参与到了诱导细胞凋亡发生的过程中。

以往研究表明, 低氧胁迫也可以影响宿主细胞多种先天免疫过程, 如酚氧化酶原系统、吞噬作用、抗菌肽和细胞因子的产生等。其中酚氧化酶原系统作为先天免疫的重要组成部分, 仅存在于无脊椎动物当中^[58]。该系统由多种蛋白组成, 其中主要包括脂多糖和-1,3-葡聚糖结合蛋白 (LGBP)、酚氧化酶原 (proPO)、酚氧化酶活化因子 (PPAF)、丝氨酸蛋白酶 (SP) 和丝氨酸蛋白酶抑制剂 (SPI) 等。当外来的病原感染宿主细胞时, 病原一旦被细胞膜表面的受体识别后, 该系统就会被激活, 随后将酚氧化酶原转换为具有活性的酚氧化酶, 最后帮助宿主细胞抵御外来病原的入侵^[59]。近期研究表明, 除病原菌感染外, 缺氧也能提高中华绒螯蟹血淋巴细胞酚氧化酶活性, 但是相应的分子机制并不清楚^[14]。在本研究中, 根据转录组分析发现, 中华绒螯蟹血淋巴细胞酚氧化酶系统的多个基因在低氧胁迫时发生了显著变化, 如 LGBP、proPO、PPAF 1 和 PPAF 2, 以及 5 种丝氨酸蛋白酶 (trypsin-like SP、SP、clip domain SP 3、masquerade-like SP 3、masquerade-like SP 2) 基因的表达水平都显著上调。同时, 相应的也有 3 种丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Kazal-type SPI、SPI、serpin) 的基因表达水平发生显著下调。这些结果说明, 当中华绒螯蟹血淋巴细胞处于低氧胁迫状态时, 细胞的酚氧化酶系统被激活。低氧胁迫除了能够影响中华绒螯蟹血淋巴细胞的酚氧化酶系统, 本研究还鉴定到了多个其他的免疫相关蛋白基因的表达水平发生显著变化, 如铁蛋白 1 和 2、抗脂多糖因子 1 和 2、α 巨球蛋白 1/2/3、14-3-3 蛋白、凝集素蛋白、组织蛋白酶 A/F/D 等。铁蛋白是一种广泛存在且非常重要的储铁蛋白, 该蛋白在宿主细胞应对外源性的刺激过程中具有重要的作用^[60]。抗脂多糖因子是一种分子量较小的碱性抗菌肽, 可以与脂多糖结合, 具有广谱的抗菌活性^[61]。C 型凝集素作为一种模式识别受体, 能够识别并结合病原体表面的一些保守的相关分子, 是甲壳动物先天免疫系统的重要组成部分^[62]。组织蛋白

酶作为溶酶体中的一类酸性水解酶, 在吞噬泡、自噬底物以及一些大分子降解过程中发挥不可替代的作用, 是先天免疫系统不可或缺的一部分^[63]。

本研究通过转录组学分析, 初步阐明了中华绒螯蟹血淋巴细胞应对低氧胁迫的分子机制 (图 7)。

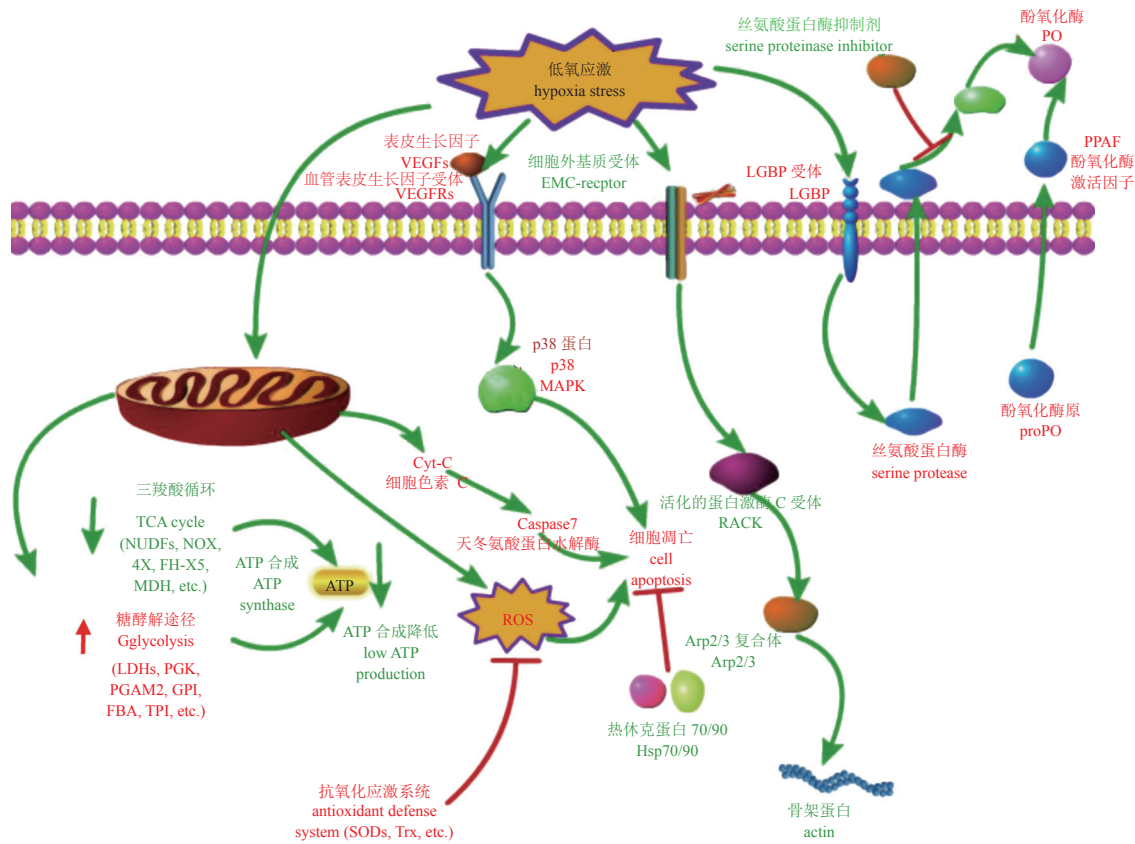


图 7 中华绒螯蟹血淋巴细胞应对低氧胁迫机制图

红色字母代表上调, 绿色代表下调。

Fig. 7 A schematic model of the molecular mechanism of *E. sinensis* hemocytes response to hypoxia stress

Red color represents up-regulated genes, green color represents the down-regulated genes.

4 结论

综上所述, 低氧胁迫对中华绒螯蟹血淋巴细胞的三羧酸循环、糖酵解途径、ECM-受体相互作用、间隙连接、细胞凋亡、酚氧化酶系统及其他免疫相关基因等产生了显著影响。此外, 随机挑选转录组数据中的 10 个基因进行 qRT-PCR 分析验证, 结果证明与转录组数据分析相一致。上述结果初步阐明了中华绒螯蟹血淋巴应对低氧胁迫的分子机制, 其相关的生物学过程或信号通路发挥作用的具体机制需要深入研究。本实验为分析其他甲壳动物在应对低氧胁迫时的生理机制和分子机制提供了重要的理论依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Guo Z X, He J G, Xu H D, *et al.* Pathogenicity and complete genome sequence analysis of the mud crab dicistrovirus-1[J]. *Virus Research*, 2013, 171(1): 8-14.
- [2] Diaz R J. Overview of hypoxia around the world[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2001, 30(2): 275-281.
- [3] Bao J, Li X D, Yu H, *et al.* Respiratory metabolism responses of chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* and Chinese grass shrimp, *Palaemonetes sinensis*, subjected to environmental hypoxia stress[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1559.
- [4] Lehtonen M P, Burnett L E. Effects of hypoxia and hypercapnic hypoxia on oxygen transport and acid-base status in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*, during exercise[J]. *JEZ-A Ecological and Integrative*

- Physiology, 2016, 325(9): 598-609.
- [5] Tanner C A, Burnett L E, Burnett K G. The effects of hypoxia and pH on phenoloxidase activity in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2006, 144(2): 218-223.
- [6] Tomasetti S J, Morrell B K, Merlo L R, *et al.* Individual and combined effects of low dissolved oxygen and low pH on survival of early stage larval blue crabs, *Callinectes sapidus*[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0208629.
- [7] Wei L, Li Y H, Qiu L G, *et al.* Comparative studies of hemolymph physiology response and HIF-1 expression in different strains of *Litopenaeus vannamei* under acute hypoxia[J]. *Chemosphere*, 2016, 153: 198-204.
- [8] Cheng C H, Ma H L, Deng Y Q, *et al.* Transcriptome analysis and histopathology of the mud crab (*Scylla paramamosain*) after air exposure[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2020, 228: 108652.
- [9] Chen X W, Wang J, Hou X, *et al.* Gene expression profiles of gill provide insights into the aerial respiration capacity of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture*, 2019, 506: 148-153.
- [10] Pan L Q, Zhang X, Yang L B, *et al.* Effects of *Vibrio harveyi* and *Staphylococcus aureus* infection on hemocyanin synthesis and innate immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 659-668.
- [11] Hauton C. The scope of the crustacean immune system for disease control[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(2): 251-260.
- [12] Söderhäll K, Smith V J, Johansson M W. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods[J]. *Cell and Tissue Research*, 1986, 245(1): 43-49.
- [13] Ulaje S A, Rojo-Arreola L, Lluch-Cota S E, *et al.* Gene expression and energetic metabolism changes in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to short-term hypoxia[J]. *Aquaculture Research*, 2019, 50(4): 994-1004.
- [14] Song Y M, Wu M Y, Pang Y Y, *et al.* Effects of melatonin feed on the changes of hemolymph immune parameters, antioxidant capacity, and mitochondrial functions in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) caused by acute hypoxia[J]. *Aquaculture*, 2021, 535: 736374.
- [15] Xiu Y J, Feng J, Lu W Q, *et al.* Identification of a novel cognate cytosolic Hsp70 gene (MnHsc70-2) from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and comparison of its expressions with the first cognate Hsc70 (MnHsc70-1) under different stresses[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2014, 19(6): 949-961.
- [16] Xu C, Li E C, Liu Y, *et al.* Comparative proteome analysis of the hepatopancreas from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under long-term low salinity stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2017, 162: 1-10.
- [17] Diaz J R, Rosenberg R. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna[J]. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 1995, 33: 245-303.
- [18] Wu R S S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(1-12): 35-45.
- [19] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.
- [20] Kanehisa M, Goto S, Hattori M, *et al.* From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(S1): D354-D357.
- [21] 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.
- [22] Yagi T. The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1993, 1141(1): 1-17.
- [23] Minárik P, Tomášková N, Kollárová M, *et al.* Malate dehydrogenases-structure and function[J]. *General Physiology and Biophysics*, 2002, 21(3): 257-265.
- [24] Sundaram T K, Wright I P, Wilkinson A E. Malate dehydrogenase from thermophilic and mesophilic bacteria. Molecular size, subunit structure, amino acid composition, immunochemical homology, and catalytic activity[J]. *Biochemistry*, 1980, 19(10): 2017-2022.
- [25] Tomlinson I P M, Alam N A, Rowan A J, *et al.* Germline mutations in *FH* predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papil-

- lary renal cell cancer[J]. *Nature Genetics*, 2002, 30(4): 406-410.
- [26] Jie Y K, Cheng C H, Wang L C, *et al.* Hypoxia-induced oxidative stress and transcriptome changes in the mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2021, 245: 109039.
- [27] Sun S M, Guo Z B, Fu H T, *et al.* Integrated metabolomic and transcriptomic analysis of brain energy metabolism in the male oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in response to hypoxia and reoxygenation[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 243: 1154-1165.
- [28] Tomanek L. Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2015, 218(12): 1867-1879.
- [29] Murphy M P. How mitochondria produce reactive oxygen species[J]. *Biochemical Journal*, 2009, 417(1): 1-13.
- [30] Wang W N, Zhou J, Wang P, *et al.* Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 150(4): 428-435.
- [31] He L, He T, Farrar S, *et al.* Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 44(2): 532-553.
- [32] Hermes-Lima M, Storey J M, Storey K B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 120(3): 437-448.
- [33] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 13-30.
- [34] Fu Y Y, Zhu F, Liu L, *et al.* iTRAQ-based proteomic analysis identifies proteins involved in limb regeneration of swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2018, 26: 10-19.
- [35] Lee H J, Jang M, Kim H, *et al.* Comparative transcriptome analysis of adipose tissues reveals that ECM-receptor interaction is involved in the depot-specific adipogenesis in cattle[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66267.
- [36] Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, *et al.* Functional atlas of the integrin adhesion[J]. *Nature Cell Biology*, 2007, 9(8): 858-867.
- [37] Sun Z, Li S H, Li F H, *et al.* Bioinformatic prediction of WSSV-Host protein-protein interaction[J]. *Biomed Research International*, 2014, 2014: 416543.
- [38] 严俊. 缺氧时大鼠心脏成纤维细胞与细胞外基质相互作用及机制的研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2005: 10-33.
- Yan J. Study of interactions and mechanisms between cardiac fibroblasts and extracellular matrix during hypoxia[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2005: 10-33 (in Chinese).
- [39] Defranco B H, Nickel B M, Baty C J, *et al.* Migrating cells retain gap junction plaque structure and function[J]. *Cell Communication & Adhesion*, 2008, 15(3): 273-288.
- [40] 迟路湘, 杨宗城, 王旭, 等. 烧伤后心肌细胞间隙连接通讯变化的机制研究[J]. *第三军医大学学报*, 1999, 21(3): 172-174.
- Chi L X, Yang Z C, Wang X, *et al.* Changes of gap junctional intercellular communication in the myocardial cells and its mechanism after burns[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 1999, 21(3): 172-174 (in Chinese).
- [41] Landesman Y, White T W, Starich T A, *et al.* Innexin-3 forms connexin-like intercellular channels[J]. *Journal of Cell Science*, 1999, 112(14): 2391-2396.
- [42] Phelan P, Stebbings L A, Baines R A, *et al.* Drosophila Shaking-B protein forms gap junctions in paired *Xenopus* oocytes[J]. *Nature*, 1998, 391(6663): 181-184.
- [43] Stebbings L A, Todman M G, Phelan P, *et al.* Two *Drosophila* innexins are expressed in overlapping domains and cooperate to form gap-junction channels[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2000, 11(7): 2459-2470.
- [44] Igney F H, Krammer P H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2(4): 277-288.
- [45] DeGracia D J, Kumar R, Owen C R, *et al.* Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2002, 22(2): 127-141.
- [46] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell

- death[J]. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35(4): 495-516.
- [47] Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, *et al.* Mechanisms of cytochrome *c* release from mitochondria[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2006, 13(9): 1423-1433.
- [48] Jiang X J, Wang X D. Cytochrome *C*-mediated apoptosis[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, 73: 87-106.
- [49] Tang X Q, Feng J Q, Chen J, *et al.* Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H₂O₂ in PC12 cells: mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2[J]. *Brain Research*, 2005, 1057(1-2): 57-64.
- [50] Kammouni W, Wong K, Ma G P, *et al.* Regulation of apoptosis in fibroblast-like synoviocytes by the hypoxia-induced Bcl-2 family member Bcl-2/adenovirus E1B 19-kd protein-interacting protein 3[J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2007, 56(9): 2854-2863.
- [51] Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, *et al.* Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 304(3): 505-512.
- [52] Sreedhar A S, Kalmár É, Csermely P, *et al.* Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance[J]. *FEBS Letters*, 2004, 562(1-3): 11-15.
- [53] 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.
- [54] Hoefen R J, Berk B C. The role of MAP kinases in endothelial activation[J]. *Vascular Pharmacology*, 2002, 38(5): 271-273.
- [55] Chang L F, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades[J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 37-40.
- [56] Ikeda R, Che X F, Ushiyama M, *et al.* 2-Deoxy-D-ribose inhibits hypoxia-induced apoptosis by suppressing the phosphorylation of p38 MAPK[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 342(1): 280-285.
- [57] Fukunaga R, Hunter T. MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates[J]. *The EMBO Journal*, 1997, 16(8): 1921-1933.
- [58] Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 116-126.
- [59] Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1-3): 13-21.
- [60] Torti F M, Torti S V. Regulation of ferritin genes and protein[J]. *Blood*, 2002, 99(10): 3505-3516.
- [61] Tanaka S, Nakamura T, Morita T, *et al.* Limulus anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin-mediated activation of limulus coagulation system[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1982, 105(2): 717-723.
- [62] Wei X Y, Wang L M, Sun W W, *et al.* C-type lectin B (*SpCTL-B*) regulates the expression of antimicrobial peptides and promotes phagocytosis in mud crab *Scylla paramamosain*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 84: 213-229.
- [63] Niu D H, Jin K, Wang L, *et al.* Identification of cathepsin B in the razor clam *Sinonovacula constricta* and its role in innate immune responses[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(1): 94-99.

Transcriptome analysis of *Eriocheir sinensis* hemocytes in response to hypoxia

HOU Libo¹, LU Yinyue², REN Qiulin¹, KONG Xianghui¹,
ZHU Lei¹, GU Wei², MENG Qingguo^{2*}

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Aquatic Crustacean Diseases, College of Marine Science and Engineering,
Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: To understand the effect of hypoxia on Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*, the transcriptomic profiles of hemocytes in the hypoxia (1.5±0.5) mg/L and the normoxia groups [(6.0±0.5) mg/L of DO] were obtained using Nova Seq 6000. Firstly, by splicing, annotating and screening the original data, in total, 128 614 transcripts were obtained with an average length of 2 634 bp. Meanwhile, using a 1.2-fold change ($P<0.05$) in expression as a physiologically significant benchmark. A total of 1 687 differentially expressed genes were identified, including 899 up-regulated and 788 down-regulated genes. GO and KEGG analysis showed that many processes or pathways are involved in the crab against hypoxia stress, such as tricarboxylic acid cycle (TCA cycle), glycolysis, ECM-receptor interaction, gap junction, cell apoptosis, prophenoloxidase system (proPO), etc. Finally, ten selected genes from these processes or pathways were verified by qRT-PCR analysis. The results showed 6 up-regulated genes (integrin- β 1, extracellular Cu/Zn-superoxide dismutase, phosphoinositide-3 kinase, phosphoglycerate mutase 2, PDGF/VEGF-related factor 1, and relish) and 4 down-regulated genes (innexin-7, 90 ku heat shock, mitochondrial ATP synthase subunit α , and aspartate aminotransferase) corresponded with the transcriptome analysis. This study preliminarily elucidated the molecular mechanism of hemolymph response to short-time hypoxic stress, and provided some valuable information for the further analysis of the mechanism under hypoxia stress in crabs.

Key words: *Eriocheir sinensis*; hemocytes; hypoxia; transcriptome

Corresponding author: MENG Qingguo. E-mail: mlzzcld@aliyun.com

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900602); National Natural Science Foundation of China (31870168); Jiangsu Modern Agricultural Industrial Technology System [JATS (2020) 303]; Natural Science Foundation of Henan Province (212300410175)