

斑马鱼新型肽聚糖结合蛋白KRT8的模式识别活性和多肽抑菌活性鉴定

刘龙霄¹, 何静¹, 范传浩¹, 殷丽娟², 王霞^{1*}

¹青岛科技大学生物工程学院, 山东 青岛

²山东新华制药股份有限公司技术质量保证部, 山东 淄博

收稿日期: 2026年5月28日; 录用日期: 2026年6月26日; 发布日期: 2026年7月8日

摘要

目的: 研究角蛋白KRT8在斑马鱼中的免疫相关功能, 并在该蛋白的基础上筛选抗菌肽。方法: 以斑马鱼KRT8为研究对象, 通过蛋白免疫印记和酶联免疫吸附实验, 研究该蛋白是否具有与肽聚糖、脂多糖以及革兰氏阴性与阳性菌结合的能力; 通过脂多糖诱导斑马鱼发生炎症, 探究*krt8*在炎症反应中的作用; 通过斑马鱼体内细菌感染实验, 进一步研究KRT8对炎症的作用; 在该蛋白的基础上筛选抗菌肽, 然后验证筛选出候选肽的抑菌能力。结果: 本研究发现, KRT8可以与肽聚糖、脂多糖、革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌结合。在脂多糖诱导的斑马鱼炎症模型中, *krt8*的表达水平发生变化, 这说明*krt8*可能参与炎症反应。进一步研究发现, KRT8可缓解细菌诱导的炎症反应。从KRT8中筛选出的抗菌肽mP₉₀₋₁₀₃具有直接杀菌作用, 且无溶血活性。结论: KRT8可作为模式识别受体参与斑马鱼炎症免疫调控; 其衍生肽mP₉₀₋₁₀₃具有优良的抗菌活性和生物安全性。本研究为解释多种动物体内角蛋白的免疫功能提供了新见解。

关键词

细菌耐药性, KRT8, 抗菌肽, mP₉₀₋₁₀₃, 抑菌活性

Pattern Recognition and Antibacterial Activity Identification of Zebrafish Novel Peptidoglycan-Binding Protein KRT8

Longxiao Liu¹, Jing He¹, Chuanhao Fan¹, Lijuan Yin², Xia Wang^{1*}

¹College of Bioengineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao Shandong

²Technical Quality Assurance Department, Shandong Xinhua Pharmaceutical Company Limited, Zibo Shandong

*通讯作者。

文章引用: 刘龙霄, 何静, 范传浩, 殷丽娟, 王霞. 斑马鱼新型肽聚糖结合蛋白 KRT8 的模式识别活性和多肽抑菌活性鉴定[J]. 食品与营养科学, 2026, 15(4): 362-377. DOI: 10.12677/hjfn.2026.154041

Abstract

Objective: To investigate the immune-related functions of keratin KRT8 in zebrafish, and screen antimicrobial peptides derived from KRT8. **Methods:** Taking zebrafish KRT8 as the research object, Western blot and ELISA were performed to detect the binding capacity of KRT8 to peptidoglycan (PGN), lipopolysaccharide (LPS), Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria. An LPS-induced zebrafish inflammatory model was constructed to explore the role of *krt8* in inflammatory responses. *In vivo* bacterial infection assays in zebrafish were conducted to further clarify the regulatory effect of KRT8 on inflammation. Moreover, candidate antimicrobial peptides were screened based on the KRT8 sequence, and their antibacterial activities were verified subsequently. **Results:** KRT8 was capable of binding to PGN, LPS, Gram-negative and Gram-positive bacteria. In the LPS-induced inflammatory model, the expression of *krt8* was significantly altered, suggesting that *krt8* is involved in the inflammatory response. Further *in vivo* experiments confirmed that KRT8 could alleviate bacteria-triggered inflammatory reaction. The derived peptide mP₉₀₋₁₀₃ screened from KRT8 exerted direct bactericidal activity with no hemolytic toxicity. **Conclusion:** KRT8 acts as a pattern recognition receptor and participates in the regulation of inflammatory immunity in zebrafish. Its derivative peptide mP₉₀₋₁₀₃ possesses favorable antibacterial activity and high biosafety. This study provides novel insights into the immunological functions of keratins among diverse animal species.

Keywords

Bacterial Resistance, KRT8, Antimicrobial Peptides, mP₉₀₋₁₀₃, Antibacterial Activity

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

细菌耐药性(AMR)的全球蔓延对公共卫生构成严重威胁, 不仅给医疗体系带来沉重的经济负担, 还加剧了传染病的发病率与死亡率——每年约有 100 万人死于耐药细菌感染[1]。因此, 亟需寻找抗生素替代品。

抗菌肽(AMPs)是所有生物体都会产生的一类小分子生物活性物质(含 10 到 100 个氨基酸残基), 作为先天免疫系统的关键组成部分可有效抑制或杀灭入侵病原体[2]。与传统抗生素不同, 抗菌肽具有广谱抗菌、抗病毒、抗肿瘤、对宿主无毒、不易诱导耐药性产生的优点[3]。因此, 抗菌肽有望成为抗生素的理想替代物。

角蛋白(KRT)是中间丝家族中最大的亚家族, 根据等电点可分为 I 型(酸性)和 II 型(碱性)角蛋白, 通常 I 型和 II 型角蛋白以异源二聚体形式存在[4] [5]。KRT8 属于 II 型角蛋白, 在哺乳动物中常与 KRT18 形成异源二聚体[6]; 在斑马鱼体内, 二者同样共表达并在丝状结构组装过程中形成异源角蛋白二聚体[7]。作为细胞骨架的重要组成部分, KRT8 对维持细胞完整性、保护细胞形态及调控细胞大小的具有重要作用, 此外, KRT8 还参与细胞迁移、黏附、凋亡及增殖等多种生理过程[8] [9]。然而, KRT8 在宿主中应对细菌感染及在相关炎症调控中的作用仍鲜有研究。

在前期研究中, 我们通过交联肽聚糖的琼脂糖凝胶柱从斑马鱼早期胚胎中分离得到一种蛋白, 并鉴定该蛋白为 KRT8 蛋白[10]。本研究以斑马鱼为模型, 探讨 KRT8 是否具有模式识别活性及炎症调节功能。同时, 探究从 KRT8 中筛选到的抗菌肽 mP₉₀₋₁₀₃ 的抑菌活性、生物安全性, 为揭示 KRT8 在宿主抗菌免疫中的综合作用、开发新型抗耐药菌制剂提供实验依据。

2. 实验部分

2.1. 材料

2.1.1. 试剂及仪器

4%多聚甲醛, 丙酮, 二甲基亚砜(DMSO), 牛血清白蛋白(BSA), Triton X-100, 山羊血清, 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI), Trizol, RNA 提取试剂盒, 大肠杆菌 BL21 (DE3), 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG), 卡那霉素(Kana)购自索莱宝科技有限公司。抗 KRT8 小鼠单克隆抗体, Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG, DAB 显色试剂盒购自上海生工科技有限公司。Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒, SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒购自艾科瑞生物工程有限公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG, 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉亲和素购自碧云天生物技术公司。肽聚糖(PGN), 生物素化己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(生物素)购自西格玛奥德里奇公司。脂多糖(LPS), LPS (大肠杆菌 O55:B5)购自阿拉丁生化科技股份有限公司。

共聚焦显微镜, 德国徕卡公司。酶标仪, 赛默飞世尔科技公司。regulus 8100 扫描电子显微镜, 日本日立株式会社。

2.1.2. 实验动物

野生斑马鱼购自当地养鱼场, 实验操作严格遵循规定, 经山东省实验动物管理伦理委员会批准。斑马鱼在 27°C \pm 1°C 下饲养、定时投喂。性成熟斑马鱼按雌雄比例 2:1 配对产卵, 受精卵在 27°C \pm 1°C 下培养至使用[11]。

2.1.3. 实验细菌

革兰氏阳性菌: 金黄色葡萄球菌 ATCC 35654、藤黄微球菌 ATCC 49732、枯草芽孢杆菌 ATCC 6633。

革兰氏阴性菌: 大肠杆菌 ATCC 25922、嗜水气单胞菌 ATCC 35654、鳃弧菌 ATCC 43308。

2.2. 免疫荧光技术

为探究 KRT8 在斑马鱼中的定位, 进行了免疫荧光实验[12]。选取 1.25、2.25、4、6、12 及 24 hpf 斑马鱼胚胎, 经 4%多聚甲醛固定、脱壳、冷丙酮处理、0.5% PBST (1 mL PBS 加入 500 μ L Triton X-100)洗涤后, 在含 1% DMSO 和 1% BSA 的 5%山羊血清中封闭。封闭结束后, 将样本依次与一抗(抗 KRT8 小鼠单克隆抗体)及二抗(Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG)孵育[12]。以 6 hpf 胚胎为对照, 兔免疫前血清替代一抗。取 6 hpf 和 24 hpf 胚胎用 4%多聚甲醛固定, 脱水、包埋后制成 14 μ m 冷冻切片。通过 DAPI 染色标记细胞核, PBST 洗涤后 4°C 保存, 使用共聚焦显微镜观察成像[13]。

2.3. 生物信息学

从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中获取不同物种的 *krt8* 染色体定位及氨基酸序列。通过 SMART (<https://smart.embl.de/>)预测斑马鱼 KRT8 蛋白结构域, 使用 ProtParam (<https://www.expasy.org/search/ProtParam>)分析其理化性质, 采用 AlphaFold 预测其三维结构。通过 MEGA 11 使用最大似然法构建不同物种 KRT8 的系统发育树。对不同物种的 *krt8* 基因进行共线性分析[14]。

KRT8 蛋白的登录号详见表 1。

Table 1. Names and accession numbers of KRT8 proteins
表 1. KRT8 蛋白名称及登录号

Name	Accession number
<i>Homo sapiens</i> KRT8	AAH73760.1
<i>Pan troglodytes</i> KRT8	XP_016778841.1
<i>Macaca mulatta</i> KRT8	NP_001247474.1
<i>Mus musculus</i> KRT8	NP_112447.2
<i>Rattus norvegicus</i> KRT8	NP_955402.1
<i>Ovis aries</i> KRT8	XP_012029598.3
<i>Bos taurus</i> KRT8	NP_001028782.1
<i>Aythya fuligula</i> KRT8	XP_032060644.1
<i>Gallus gallus</i> KRT8 isoform X1	XP_015128103.2
<i>Gallus gallus</i> KRT8 isoform X2	XP_040510849.1
<i>Gallus gallus</i> KRT8 isoform X3	XP_040549737.1
<i>Gallus gallus</i> KRT8 isoform X4	XP_040549739.1
<i>Mauremys reevesii</i> KRT8	XP_039370224.1
<i>Dermochelys coriacea</i> KRT8	XP_043362591.1
<i>Thamnophis elegans</i> KRT8	XP_032065796.1
<i>Notechis scutatus</i> KRT8	XP_026529665.1
Name	Accession number
<i>Xenopus laevis</i> KRT8	AAH44116.1
<i>Xenopus tropicalis</i> KRT8	NP_001002797.1
<i>Astyanax mexicanus</i> KRT8	XP_007256403.2
<i>Colossoma macropomum</i> KRT8	XP_036446505.1
<i>Puntigrus tetrazona</i> KRT8	XP_043080891.1
<i>Danio rerio</i> KRT8	NP_956374.1

2.4. 定量实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

为分析斑马鱼组织及不同发育阶段中 *krt8* 的表达情况, 收集斑马鱼不同组织及不同发育时期胚胎。提取总 RNA 并反转录生成 cDNA, 以 *gapdh* (表 2) 为内参基因, 通过 RT-qPCR 检测目的基因的相对表达量。每组均设三个技术重复与生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法[15]计算。

2.5. 重组蛋白的表达与纯化

利用 *BamH* I 和 *Xho* I 酶切构建重组质粒 *pET-28a/krt8*, 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中。使用 IPTG 诱导重组蛋白表达[16], 通过镍柱亲和层析法[17]进行纯化。蛋白透析复性后经 12% SDS-PAGE 电泳, 并用考马斯亮蓝 R-250 染色分析。

Table 2. Primer sequences**表 2.** 引物序列

	Primer	Sequences (5'-3')
<i>krt8</i>	Forward primer	GATGAAATCAACAAGCGCACAGA
	Reverse primer	CTCACGGATCTCCTCCTCAAA
β -actin	Forward primer	GCCCATCCATCGTTCACAGG
	Reverse primer	ACCTCCCTTTGCCAGTTTCC
<i>gapdh</i>	Forward primer	TCAGAACATCATCCCAGCCTC
	Reverse primer	GGCAGGTTTCTCAAGACGGA
<i>tnf-α</i>	Forward primer	CTGGATCTTCAAAGTCGGGTGTATGG
	Reverse primer	TTGTTGATTGCCCTGGGTCTTATGG
<i>il-1β</i>	Forward primer	ATCCAAACGGATACGACCAG
	Reverse primer	TCGGTGTCTTTCCTGTCCAT
<i>il-6</i>	Forward primer	GTCTGCTACACTGGCTACACTCTTC
	Reverse primer	CGTCCACATCCTGAACTTCGTCTC

2.6. 蛋白质免疫印迹(Western Blotting)

12% SDS-PAGE 分离蛋白后, 通过半干法将其转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上[16]。使用 5% BSA 封闭, 用 0.5% PBST 洗涤并加入一抗(抗 KRT8 小鼠单克隆抗体), 4℃ 孵育过夜。次日 PBST 洗涤后, 加入二抗(HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG), 室温孵育 1 h。再次洗涤后, 使用 DAB 显色并进行成像[18]。

2.7. 重组蛋白与细菌的结合实验

将革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌培养至对数生长期, 收集菌体并重悬于溶解缓冲液(100 mM Tris、500 mM 氯化钠, pH 8.0)中。细菌悬液与 rKRT8 常温孵育, 溶解缓冲液洗涤, 对照组仅以溶解缓冲液替代 rKRT8, 最终样品通过 Western blotting 进行检测。

2.8. 酶联免疫吸附试验(ELISA)

采用 ELISA 测定 rKRT8 与 LPS 与 PGN 的结合能力[10] [19]。将 rKRT8 与 BSA 使用生物素标记。LPS 与 PGN 包被于 96 孔板, 0.2% BSA 封闭, PBST 洗涤后加入生物素化 rKRT8 或 BSA 孵育, 再次洗涤后, 加入 HRP 标记的链霉亲和素孵育, 使用邻苯二胺显色。

2.9. 斑马鱼相关实验

2.9.1. 斑马鱼炎症模型的建立

利用 LPS 构建斑马鱼炎症模型, 研究 *krt8* 在炎症反应中的作用。通过泄殖腔注射的方法向斑马鱼注射 10 μ L 1 mg/mL 的 LPS(大肠杆菌 O55:B5), 在注射后 0、3、6、12 和 24 h 采集肠道、肝脏和眼部组织, 冰上进行匀浆处理。提取总 RNA, 反转录获得 cDNA 后, 通过 RT-qPCR 定量检测炎症因子(*tnf- α* 、*il-1 β* 和 *il-6*)及 *krt8* 的相对表达水平。

2.9.2. 肠道损伤的组织学分析

LPS 注射后 12 h, 采集斑马鱼肠道组织, 用 4%多聚甲醛固定 24 h。冲洗后, 参照 Duan 等[20]的方

法, 采用梯度乙醇对组织进行脱水处理, 随后进行石蜡包埋并切片。切片固定于载玻片上, 经干燥、脱蜡处理后, 通过苏木精-伊红(H&E)进行染色, 染色后的切片在共聚焦显微镜下观察并拍照。

2.9.3. 体内细菌感染实验

将鳗弧菌培养至对数生长期, PBS 洗涤重悬后, 调整浓度为 10^6 CFU/mL。实验组斑马鱼腹腔注射 20 μ L rKRT8 (300 μ g/mL), 对照组注射 20 μ L PBS, 随后每尾斑马鱼注射 10 μ L 鳗弧菌。细菌注射后解剖斑马鱼, 收集肝脏和肠道组织。之后进行总 RNA 提取、反转录及 RT-qPCR 操作。

2.10. 抗菌肽相关实验

2.10.1. 抗菌肽筛选与定点突变

通过 CAMP_{R3} (<http://www.camp3.bicnirrh.res.in/prediction.php>)对斑马鱼 KRT8 进行抗菌肽筛选(10~20 个氨基酸残基), 采用 SVM、RF 和 ANN 算法预测其抗菌活性[21]。筛选出的候选肽通过 CAMP_{R3} 理性设计工具进行定点突变及序列优化。通过 ProtParam (<https://www.expasy.org/search/ProtParam>)分析候选肽的理化性质, 使用 Tamarind Bio (<https://app.tamarind.bio/tools/alphafold>)对候选肽的亲水性、三级结构进行分析。

目标肽序列由上海生工通过化学方法合成, -20°C 存储。

2.10.2. 抑菌能力验证

通过液体抑菌实验测定候选肽的抗菌活性[12]。革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌调整浓度至 10^5 CFU/mL。将不同浓度的候选肽溶液、LB 培养基与细菌悬液混合后加入 96 孔板中, 每组设 3 个重复孔。无菌去离子水和 Kana 分别作为阴性和阳性对照。96 孔板于 37°C 下培养, 每小时使用酶标仪测定 620 nm 处的吸光度[22]。

2.10.3. 最小抑菌浓度(MIC)测定

将菌液浓度稀释至 10^5 CFU/mL 后, 与多肽溶液等体积混合, 取 200 μ L 加入 96 孔板。无菌去离子水和 Kana 溶液分别作为阴性和阳性对照, 37°C 孵育 24 h。最低抑菌浓度(MIC)定义为未观察到细菌生长的最低浓度[23]。

2.10.4. 扫描电子显微镜(SEM)实验

根据先前文献[24][25], 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌稀释至 10^5 CFU/mL, 多肽溶液($4 \times \text{MIC}$)与细菌悬液等体积混合, 37°C 振荡培养 12 h。样品经离心, PBS 洗涤后, 4°C 戊二醛固定 3 h。再次离心洗涤, 取 10 μ L 溶液滴加至硅片上, 干燥后通过 SEM 进行观察。

2.10.5. 溶血实验

灭菌的 5 mm 滤纸片, 浸泡到不同浓度的多肽溶液中。将浸泡后的滤纸片放到 7% (体积比)羊血琼脂平板上, 于 37°C 培养 48 h。无菌水和 1% Triton X-100 分别作为阴性对照和阳性对照[26]。

2.11. 数据分析

所有实验均设置生物学重复和技术重复。统计分析采用 GraphPad Prism 9.0 软件完成。差异采用单因素方差分析进行评估, 当 $p < 0.05$ 时认为具有统计学意义。

3. 结果与讨论

3.1. KRT8 在斑马鱼胚胎中的定位

为明确 KRT8 在斑马鱼胚胎中的定位, 开展了免疫荧光定位实验。结果显示, 斑马鱼 KRT8 蛋白于

胚胎发育早期的卵裂期便开始表达,并持续存在于卵裂期、长圆形期、外包期直至幼鱼孵化(图 1(A))。切片免疫荧光表明 KRT8 定位于细胞质内(图 1(B));在 24 hpf 的胚胎中特异性分布于包被层(EVL)(图 1(B)),这一结果与之前的研究一致[27]。

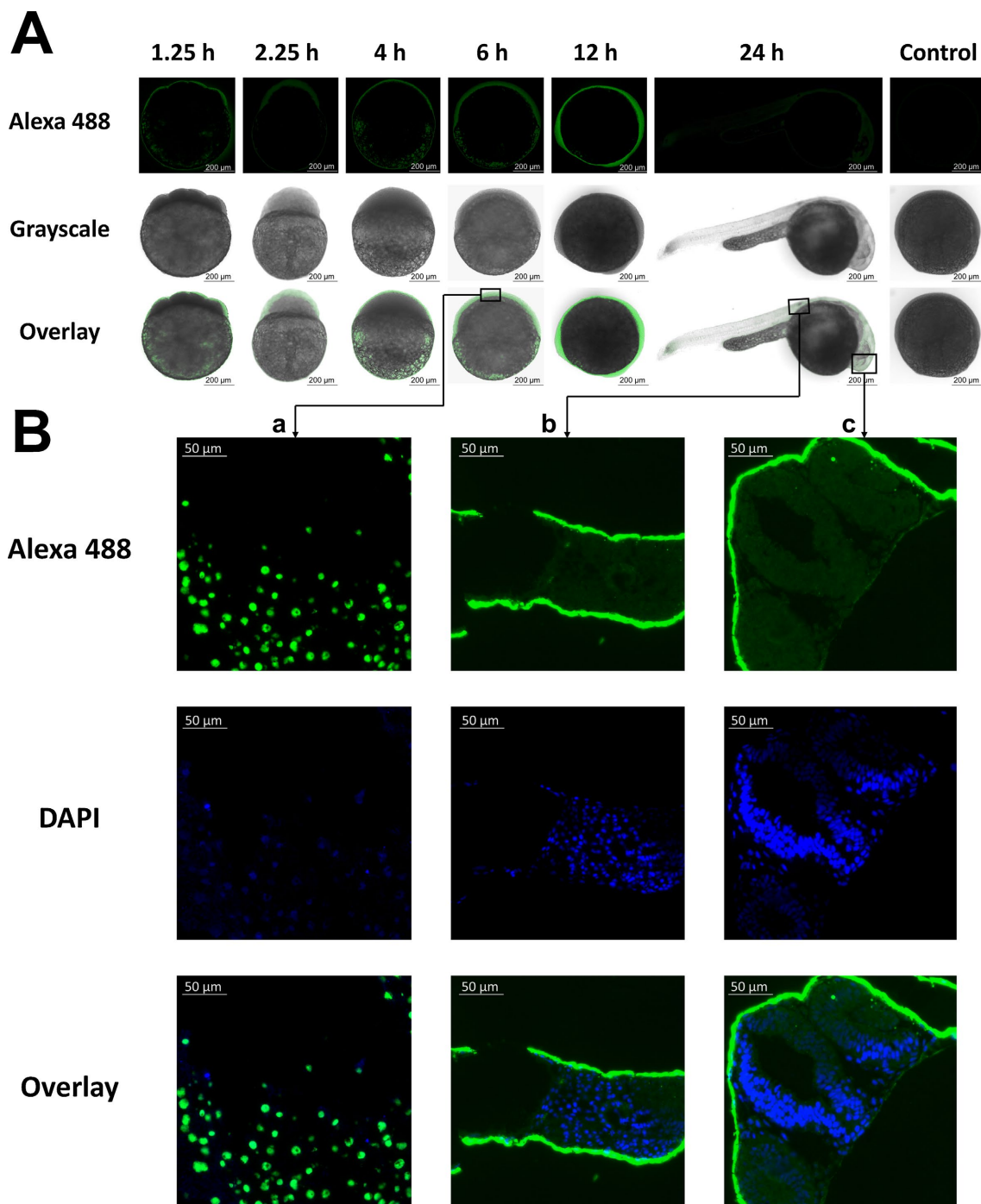


Figure 1. Immunofluorescence detection of KRT8 during zebrafish embryonic development. (A) KRT8 in zebrafish embryo development stages; (B) Immunofluorescence section

图 1. 斑马鱼胚胎发育过程中 KRT8 的免疫荧光检测。(A) 斑马鱼胚胎不同发育阶段 KRT8 表达特征; (B) 免疫荧光切片

3.2. 生物信息学分析

斑马鱼 *krt8* 的 cDNA 全长 2220 bp, 开放阅读框(ORF)为 1563 bp, 编码了 520 个氨基酸。斑马鱼 KRT8 含有 9 个 α -螺旋, 为带有负电荷的亲水性不稳定蛋白。利用 SMART 进行结构域预测, 发现该蛋白主要由中间丝结构域、II 型角蛋白头部以及一个低频率结构域组成(图 2(A))。通过 AlphaFold 进行三级结构分析, 发现斑马鱼和人类的 KRT8 结构具有较高相似性(图 2(B))。进化树结果显示, 斑马鱼 KRT8 的序列与虎皮鱼(*Puntigrus tetrazona*)的亲缘关系最近(图 2(C))。共线性分析表明, 斑马鱼 *krt8* 基因定位于 23 号染色体, 且其相对于 *krt18*、*EIF4B* 和 *TMS2* 基因的排列方向, 与人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、牛(*Bos taurus*)和爪蟾(*Xenopus laevis*)一致, 这进一步证实了 *krt8* 基因的保守性(图 2(D))。综上, KRT8 在物种间高度保守, 这一保守性可能与其维持细胞稳态、抵御外界损伤的功能密切相关。

3.3. *krt8* 在斑马鱼不同组织及不同发育阶段的表达情况

采用 RT-qPCR 检测 *krt8* 在斑马鱼不同组织及不同发育阶段胚胎中的相对表达水平(图 3(A))。*krt8* 在斑马鱼脾脏、尾部、肠道、心脏、肝脏、脑组织、肌肉、眼部、肾脏、皮肤及精巢中均有表达, 其中睾丸、眼睛、皮肤和尾部表达水平最高, 与 KRT8 在再生尾鳍表皮中高表达的结论相符[28], 也进一步印证了 KRT8 主要位于上皮细胞的分布特点[29]。此外, *krt8* 在胚胎发育过程中表达量存在显著差异, 在受精后 12 hpf 表达量最高。

3.4. KRT8 的表达及与细菌、PGN 和 LPS 结合能力的检测

借助重组蛋白表达与蛋白纯化技术, 成功获得 rKRT8(图 3(B)-(a)、图 3(B)-(b))。采用 Western blotting 检测了 rKRT8 与细菌的结合能力。结果显示, rKRT8 可与革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌结合(图 3(B)-(c)、图 3(B)-(d))。ELISA 结果证实, rKRT8 以剂量依赖性方式结合 PGN 与 LPS(图 3(C)), 该结果与 rANGPT4 的结果相似[30], 因此推测 KRT8 可能是斑马鱼中的模式识别受体。

3.5. 斑马鱼实验

3.5.1. 斑马鱼的炎症反应

向斑马鱼体内注射 LPS 后, 收集肠道、肝脏及眼组织, 采用 RT-qPCR 检测炎症因子(*tnf- α* 、*il-1 β* 和 *il-6*)表达, 结果如图 4(A)所示。结果显示, 在肠道中, *tnf- α* 、*il-1 β* 和 *il-6* 的表达量在 3 h 时达到最大值, 之后逐渐下降(图 4(A)-(a)); 在肝脏中, *tnf- α* 在 6 h 达到最大值, *il-1 β* 在 3 h 达到最大值, 而 *il-6* 表达持续上调并在 24 h 达到最大值(图 4(A)-(b)); 在眼睛中, *il-6* 在 6 h 达到最大值, 而 *tnf- α* 和 *il-1 β* 未见明显变化(图 4(A)-(c))。说明斑马鱼在刺激后 3-6 h 发生炎症反应。

LPS 注射 12 h 后, 收集斑马鱼肠道组织制备石蜡切片并进行 H&E 染色。结果显示, 肠道上皮细胞出现坏死, 杯状细胞数量增多的现象, 这说明机体发生了明显的炎症损伤(图 4(A)-(g)、图 4(A)-(h))。结合 RT-qPCR 结果推测, LPS 刺激后 12 h 炎症因子水平虽已回落, 但由于组织损伤恢复缓慢, 导致肠道病理损伤仍旧存在。

进一步检测 LPS 刺激下斑马鱼体内 *krt8* 的表达变化, 发现 *krt8* 在肠道(3 h)、肝脏(6~12 h)和眼睛(6 h)中的表达均显著上调(图 4(A)-(c)-(e)), 其变化趋势与促炎细胞因子趋势高度一致, 这表明 KRT8 可能参与斑马鱼炎症应答过程, 并在炎症反应进程中发挥重要作用。

3.5.2. 细菌感染实验

RT-qPCR 结果显示(图 4(B)): 细菌感染后 6 h, PBS 组肝脏和肠道中 *tnf- α* 、*il-1 β* 和 *il-6* 的表达量显著升高, 说明此时发生炎症反应; 而在 rKRT8 处理组中, 仅 *il-1 β* 的表达量在 6 h 升高, *tnf- α* 、*il-1 β* 的

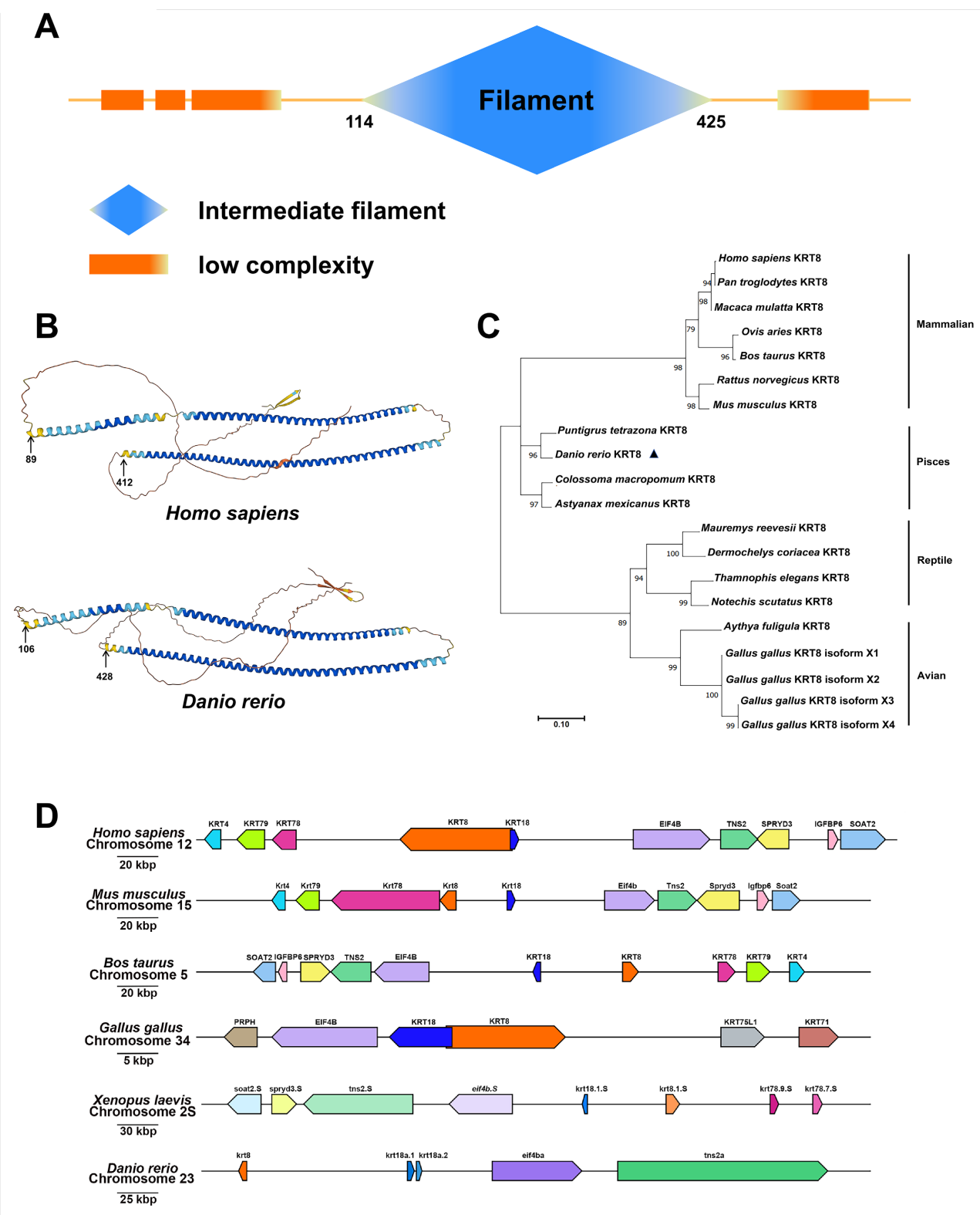


Figure 2. Bioinformatics characterization of zebrafish KRT8. (A) Domain architecture; (B) 3D structures of KRT8 in zebrafish and human; (C) Phylogenetic tree; (D) Syntenic chromosomal localization

图 2. 斑马鱼 KRT8 的生物信息学特征分析。(A) KRT8 结构域; (B) 斑马鱼和人 KRT8 的三维结构; (C) 系统发育树; (D) 共线性分析

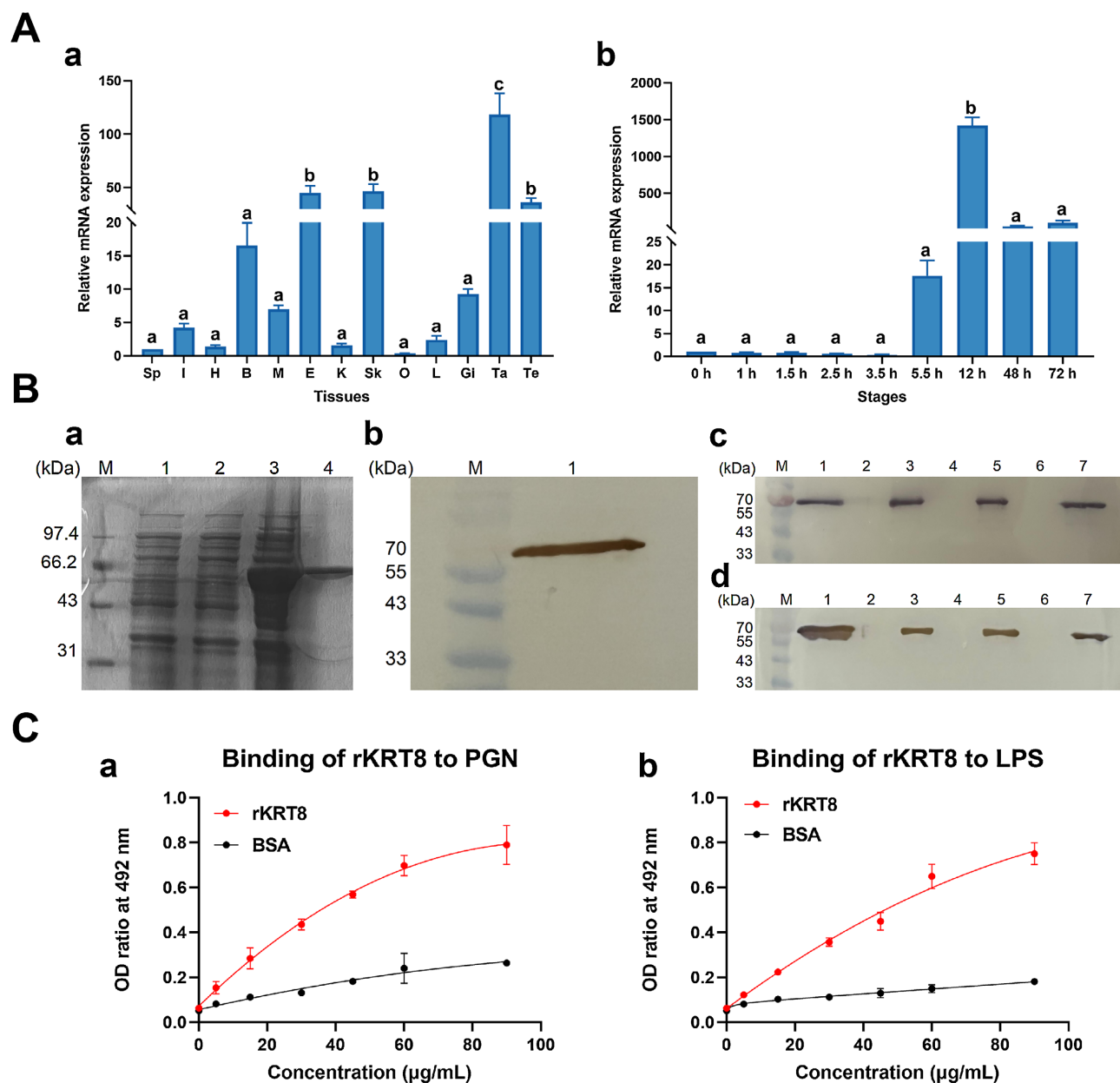


Figure 3. Expression of *krt8* in zebrafish and the bacterial, PGN/LPS binding activity of rKRT8. (A). Expression of *krt8* in zebrafish tissues and embryonic developmental stages. (a) Different tissues. (b) Embryos at different stages; (B) Binding of rKRT8 to bacteria. (a) Purified rKRT8. (b) Lane M: protein marker; Lane 1: empty vector control; Lane 2: uninduced *pET28a/krt8*; Lane 3: induced *pET28a/krt8*; Lane 4: purified rKRT8. (c) Western blot detection of rKRT8. (d) Binding of rKRT8 to Gram-positive bacteria (*M. luteus*, *S. aureus* and *B. subtilis*); Lanes 3, 5, 7: rKRT8 and bacteria co-incubation group; Lanes 2, 4, 6: PBS control group. (e) Binding of rKRT8 to Gram-negative bacteria (*E. coli*, *V. anguillarum* and *A. hydrophila*); Lanes 3, 5, 7: rKRT8 and bacteria co-incubation group; Lanes 2, 4, 6: PBS control group; (C) Binding of rKRT8 to PGN and LPS. (a) Interaction with PGN. (b) Interaction with LPS

图 3. 斑马鱼中 *krt8* 的表达及 rKRT8 的细菌 PGN 与 LPS 结合活性。(A) *krt8* 在斑马鱼组织及胚胎发育阶段的表达。(a) 不同组织。(b) 不同时期胚胎; (B) rKRT8 与细菌的结合。(a) 纯化 rKRT8。(b) 泳道 M 为蛋白标记, 泳道 1 为空载体对照, 泳道 2 为未诱导的 *pET28a/krt8*, 泳道 3 为诱导后的 *pET28a/krt8*, 泳道 4 为纯化的 rKRT8。(c) rKRT8 的 Western blot 检测。(c) rKRT8 与革兰氏阳性菌(藤黄微杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌)的结合, 泳道 3、5、7 为 rKRT8 与细菌共孵育组, 泳道 2、4、6 为 PBS 对照组。(d) rKRT8 与革兰氏阴性菌(大肠杆菌、鳃弧菌和嗜水气单胞菌)的结合, 泳道 3、5、7 为 rKrt8 与细菌共孵育组, 泳道 2、4、6 为 PBS 对照组; (C) rKRT8 与 PGN 及 LPS 的结合。(a) 与 PGN 的相互作用。(b) 与 LPS 的相互作用

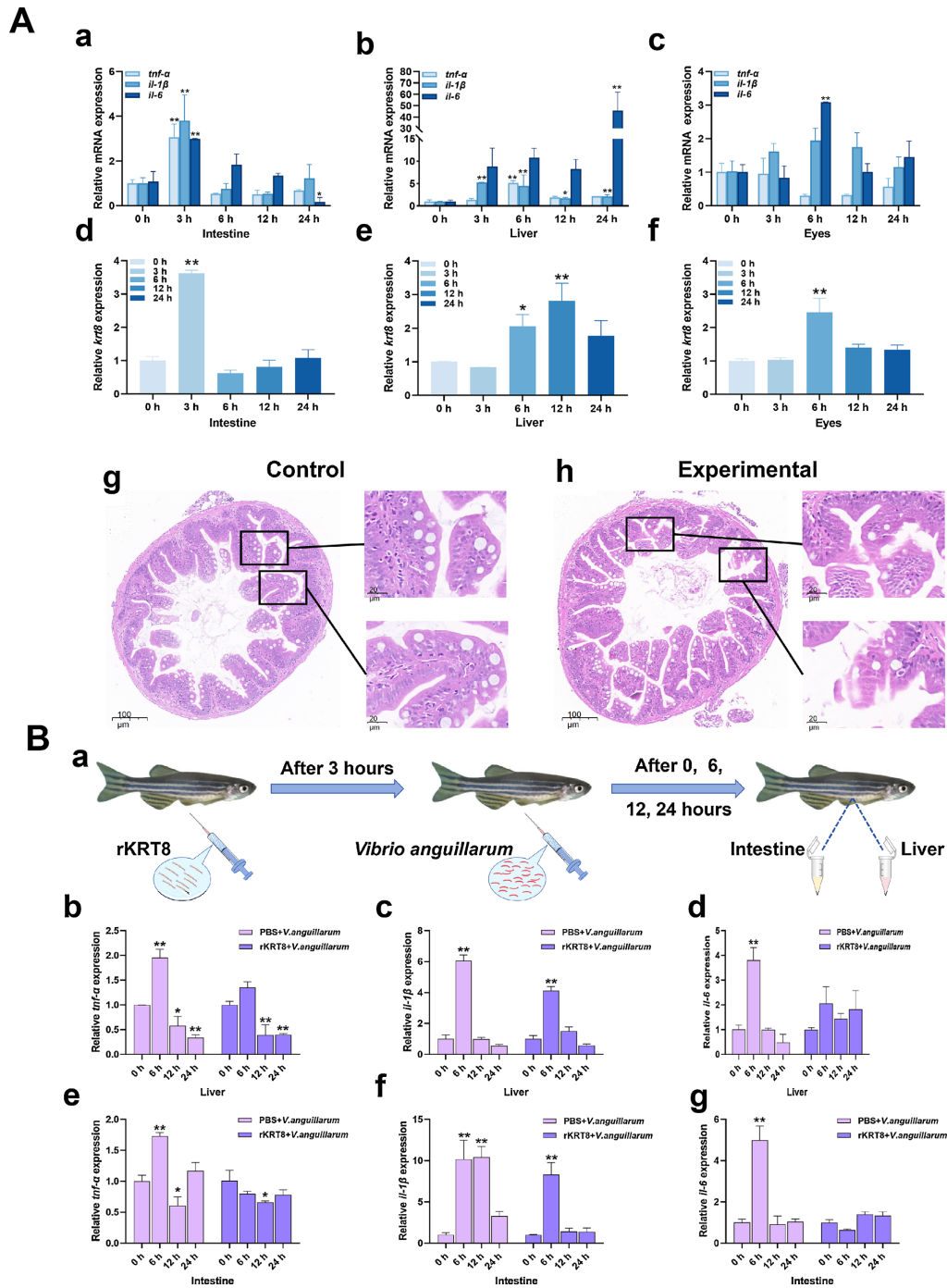


Figure 4. Inflammatory response and bacterial infection in zebrafish. (A) Inflammatory response of zebrafish. (a)-(c) Relative expression levels of inflammatory factors *tnf-α*, *il-1β* and *il-6* in the intestine, liver and eye at 0, 3, 6, 12 and 24 h after LPS injection. (d)-(f) Relative expression levels of *krt8* in the intestine, liver and eye at 0, 3, 6, 12 and 24 h after LPS injection. (g) Intestinal section of untreated zebrafish. h, Intestinal section at 12 h after LPS stimulation; the box marks the area of epithelial necrosis. (B) Bacterial infection in zebrafish. (a) Schematic diagram of bacterial stimulation. (b)-(d), Relative expression levels of *tnf-α*, *il-1β* and *il-6* in the liver. (e)-(g), Relative expression levels of *tnf-α*, *il-1β* and *il-6* in the intestine

图 4. 斑马鱼的炎症反应与细菌感染。(A) 斑马鱼的炎症反应。(a)-(c) LPS 注射后 0、3、6、12 及 24 h 肠道、肝脏和眼睛中炎症因子 *tnf-α*、*il-1β* 和 *il-6* 的相对表达水平。(d)-(f) LPS 注射后 0、3、6、12 及 24 h 肠道、肝脏和眼睛中 *krt8* 的相对表达水平。(g) 未处理斑马鱼的肠道切片。(h) LPS 刺激后 12 小时的肠道切片，方框标示上皮坏死区域；(B) 斑马鱼的细菌感染。(a) 细菌刺激示意图。(b)-(d) 肝脏 *tnf-α*、*il-1β* 和 *il-6* 的相对表达水平。(e)-(g) 肠道中 *tnf-α*、*il-1β* 和 *il-6* 的相对表达水平

表达量无显著变化,说明炎症反应受到抑制。这些结果表明,外源 rKRT8 可延缓机体免疫应答,通过抑制促炎因子的异常上调,减轻炎症反应。后续将构建 KRT8 非结合突变体并增设 BSA 阴性蛋白对照,进一步验证其作用特异性及分子机制,明确其是直接中和病原体还是通过调控宿主免疫通路发挥抗炎效应。

3.6. 抗菌肽实验

3.6.1. 抗菌肽的预测与生物信息学分析

从 KRT8 中鉴定出三种抗菌肽(mP₄₉₁₋₅₀₃、mP₉₀₋₁₀₃ 和 mP₈₃₋₉₆),理化性质见表 3。这三种肽均具有两亲性、带有正电荷,以及典型的 α -螺旋结构,符合抗菌肽的经典结构特征[31]。

Table 3. Prediction of physical and chemical properties

表 3. 理化性质预测

Names of candidate peptide	Amino Acid Sequence	Number of amino acids/piece	Relative Molecular Weight (kDa)	Isoelectric Point (PI)	Net Electric Charge
mP ₄₉₁₋₅₀₃	VLIATKKKIKKI	13	1496	10.6	+5
mP ₉₀₋₁₀₃	VSFFKLILKKRKGK	14	1692.17	11.39	+6
mP ₈₃₋₉₆	VVIKIKAVKANKWL	14	1610.06	10.48	+4

3.6.2. 液体抑菌实验

我们通过抑菌实验来验证这 3 种肽的抗菌活性,结果如图 5 所示,这三种多肽均有广谱的抑菌能力。其中, mP₄₉₁₋₅₀₃ 和 mP₈₃₋₉₆ 抑菌能力较弱, mP₉₀₋₁₀₃ 抑菌能力较强。因此,我们选择 mP₉₀₋₁₀₃ 进行后续实验。

3.6.3. 最小抑菌浓度(MIC)实验

最小抑菌浓度(MIC)实验结果显示, mP₉₀₋₁₀₃ 对鳃弧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄杆菌的 MIC 值为 47.28 μ M。

3.6.4. 扫描电子显微镜(SEM)

为探究 mP₉₀₋₁₀₃ 是否对细菌具有直接杀伤作用,进行了 SEM 实验。发现与对照组(图 6(A)-(a)、图 6(A)-(b))相比, mP₉₀₋₁₀₃ 处理后的细菌出现了严重的膜损伤,包括表面粗糙、膜破裂、胞质渗漏及细胞粘连,这表明该多肽可以通过破坏膜完整性直接杀伤细菌,这个结果与之前的研究一致[32] [33]。

3.6.5. 溶血实验结果

通过观察试纸片周围是否存在透明区域(β -溶血)、绿色区域(α -溶血)或无反应区域(γ -溶血)来判定溶血反应[34]。如图 6(B)所示, mP₉₀₋₁₀₃ 未在滤纸片周围形成透明区域(β -溶血),表明该多肽无溶血活性。

综合上述结果可知,本研究围绕斑马鱼 KRT8 开展了两方面关联但相互独立的研究工作。一方面系统探究了该蛋白在天然免疫与炎症调控中的生物学功能;另一方面将 KRT8 全长氨基酸序列视作抗菌肽挖掘的潜在资源库,通过 CAMP_{R3} 筛选并突变得到了 3 条候选肽段,经初步抑菌筛选后,仅优选活性较优的 mP₉₀₋₁₀₃ 开展后续相关验证,但需要注意的是:筛选以及突变得到的抗菌肽并非 KRT8 在机体内天然生理表达与功能调控的产物。

4. 结论

本研究围绕斑马鱼 KRT8 开展天然免疫与炎症功能研究,首次证实 KRT8 除维持细胞骨架结构外,还可以作为新型模式识别受体,参与细菌识别与炎症调控。同时,从 KRT8 中筛选获得了 3 条多肽片段,并验证了它们的抑菌能力,发现 mP₉₀₋₁₀₃ 具有较强的抑菌能力,可以通过破坏细菌细胞膜直接杀伤细菌,

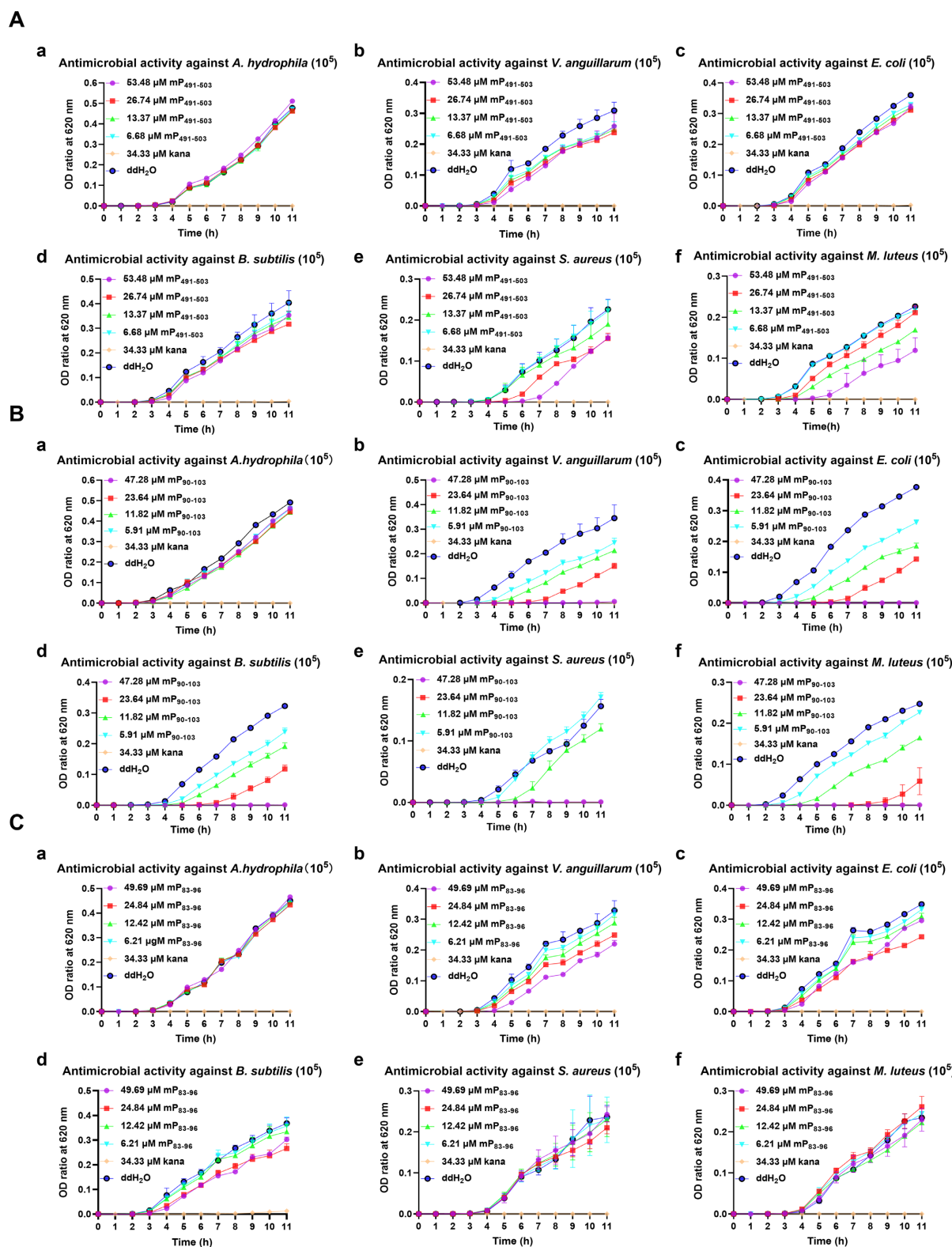


Figure 5. Bacteriostatic experiments of microplate. (A)–(C) Antibacterial activity of mP₄₉₁₋₅₀₃, mP₉₀₋₁₀₃ and mP₈₃₋₉₆ against three Gram-negative bacteria (*A. hydrophila*, *V. anguillarum*, and *E. coli*) and three Gram-positive bacteria (*B. subtilis*, *S. aureus*, and *M. luteus*)

图 5. 微孔板的抑菌实验。(A)–(C) 图显示 mP₄₉₁₋₅₀₃、mP₉₀₋₁₀₃ 和 mP₈₃₋₉₆ 对三种革兰氏阴性菌(嗜水气单胞菌、鳃弧菌和大肠杆菌)及三种革兰氏阳性菌(枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和藤黄微球菌)的抗菌活性

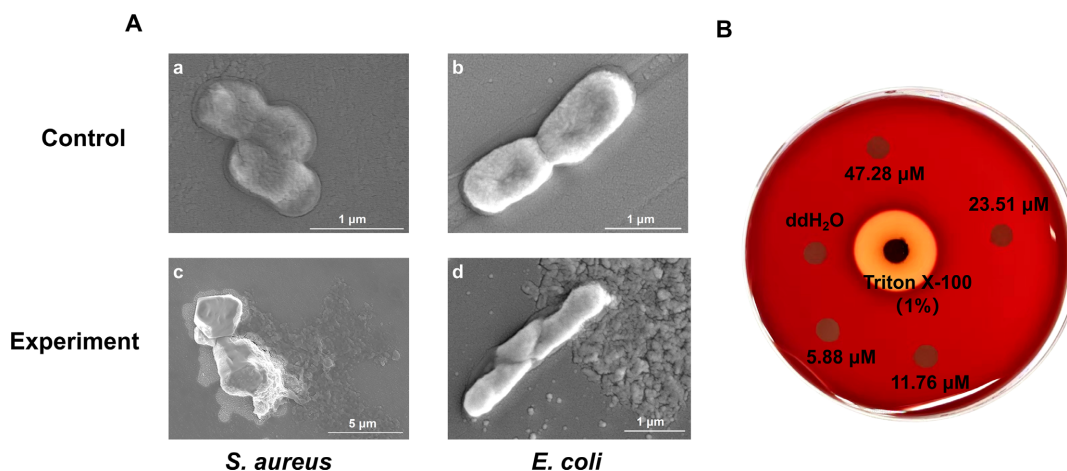


Figure 6. SEM images and hemolytic activity. (A) SEM images of *S. aureus* and *E. coli*; (B) Hemolysis assay of mP₉₀₋₁₀₃ at concentrations ranging from $1/2 \times \text{MIC}$ to $4 \times \text{MIC}$

图 6. 扫描电子显微镜图像及溶血活性。(A) 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 SEM 图像。(B) mP₉₀₋₁₀₃ 在 $1/2 \times \text{MIC}$ 至 $4 \times \text{MIC}$ 浓度范围内的溶血实验

且无溶血毒性。综上，斑马鱼 KRT8 兼具结构维持与免疫调控双重功能，抗菌肽 mP₉₀₋₁₀₃ 有望成为新型抗菌候选物质

作者贡献

刘龙霄、何静和王霞共同提出了研究方法。刘龙霄与王霞负责数据整理。刘龙霄、何静和范传浩完成了数据验证工作。刘龙霄与何静进行了正式数据分析。王霞负责项目经费筹措。范传浩全程监督项目实施。刘龙霄提供了所需资源。刘龙霄撰写了论文初稿。王霞对文稿进行了审阅与修订。

基金项目

国家自然科学基金项目(31801970)。

参考文献

- [1] Zhu, Y., Huang, W.E. and Yang, Q. (2022) Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Infection and Drug Resistance*, **15**, 735-746.
- [2] Di Somma, A., Moretta, A., Canè, C., Cirillo, A. and Duilio, A. (2020) Antimicrobial and Antibiofilm Peptides. *Biomolecules*, **10**, Article 652. <https://doi.org/10.3390/biom10040652>
- [3] Wu, R., Patocka, J., Nepovimova, E., Oleksak, P., Valis, M., Wu, W., et al. (2021) Marine Invertebrate Peptides: Antimicrobial Peptides. *Frontiers in Microbiology*, **12**, Article 785085. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.785085>
- [4] Bragulla, H.H. and Homberger, D.G. (2009) Structure and Functions of Keratin Proteins in Simple, Stratified, Keratinized and Cornified Epithelia. *Journal of Anatomy*, **214**, 516-559.
- [5] Pegoraro, A.F., Janmey, P. and Weitz, D.A. (2017) Mechanical Properties of the Cytoskeleton and Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **9**, a022038. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022038>
- [6] Xiong, F., Guo, T., Wang, X., Wu, G., Liu, W., Wang, Q., et al. (2022) Keratin 8 Is an Inflammation-Induced and Prognosis-Related Marker for Pancreatic Adenocarcinoma. *Disease Markers*, **2022**, 1-25. <https://doi.org/10.1155/2022/8159537>
- [7] Schaffeld, M., Knappe, M., Markl, J. and Hunzinger, C. (2003) cDNA Sequences of the Authentic Keratins 8 and 18 in Zebrafish. *Differentiation*, **71**, 73-82. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2003.700607.x>
- [8] Toivola, D.M., Boor, P., Alam, C. and Strnad, P. (2015) Keratins in Health and Disease. *Current Opinion in Cell Biology*, **32**, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.12.008>
- [9] Stenvall, C.A., Tayyab, M., Grönroos, T.J., Ilomäki, M.A., Viiri, K., Ridge, K.M., et al. (2021) Targeted Deletion of

- Keratin 8 in Intestinal Epithelial Cells Disrupts Tissue Integrity and Predisposes to Tumorigenesis in the Colon. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **79**, Article No. 10. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04081-5>
- [10] Wang, X., Ren, Y., Li, J., Ji, Z., Chen, F. and Wang, X. (2021) Identification of the 14-3-3 β/α -A Protein as a Novel Maternal Peptidoglycan-Binding Protein That Protects Embryos of Zebrafish against Bacterial Infections. *Developmental & Comparative Immunology*, **114**, Article 103867. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103867>
- [11] Bai, W., Zhang, Z., Tian, W., He, X., Ma, Y., Zhao, Y., et al. (2010) Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles to Zebrafish Embryo: A Physicochemical Study of Toxicity Mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, **12**, 1645-1654. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9740-9>
- [12] Ni, S., Zhou, Y., Song, L., Chen, Y., Wang, X., Du, X., et al. (2021) ELAVL1a Is an Immunocompetent Protein That Protects Zebrafish Embryos from Bacterial Infection. *Communications Biology*, **4**, Article No. 251. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01777-z>
- [13] Hammond-Weinberger, D.R. and ZeRuth, G.T. (2020) Whole Mount Immunohistochemistry in Zebrafish Embryos and Larvae. *Journal of Visualized Experiments*, **155**, 1-9. <https://doi.org/10.3791/60575-v>
- [14] Gong, C., He, J., Guo, D., Zhang, L., Shi, Z. and Wang, X. (2023) Identification of Zebrafish GIGYF2 Presents in Egg/Embryo as an Antibacterial Protein. *Fish & Shellfish Immunology*, **140**, Article 108957. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108957>
- [15] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, **25**, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [16] Wang, X., Du, X., Li, H. and Zhang, S. (2016) Identification of the Zinc Finger Protein ZRANB2 as a Novel Maternal Lipopolysaccharide-Binding Protein That Protects Embryos of Zebrafish against Gram-Negative Bacterial Infections. *Journal of Biological Chemistry*, **291**, 4019-4034. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.679167>
- [17] Guo, D., Wang, H., He, J., Zhang, L., Liu, L. and Wang, X. (2024) Two Novel Antimicrobial Peptides P33-57 and Mp168-187 from Zebrafish Showing Potent Antibacterial Activities. *Fish & Shellfish Immunology*, **154**, Article 109950. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109950>
- [18] Wang, P., Zhang, X., Zheng, X., Gao, J., Shang, M., Xu, J., et al. (2022) Folic Acid Protects against Hyperuricemia in C57BL/6J Mice via Ameliorating Gut-kidney Axis Dysfunction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **70**, 15787-15803. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06297>
- [19] Chen, X., Shen, X., Liu, S., Li, W., Wang, H., Li, J., et al. (2025) A C-Type Lectin Hecle1 with Dual Function of Immunology and Mineralization from the Freshwater Oyster (*Hyriopsis cumingii* Lea). *Frontiers in Immunology*, **15**, Article 1530732. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1530732>
- [20] Duan, Y., Liu, Q., Wang, Y., Zhang, J. and Xiong, D. (2018) Impairment of the Intestine Barrier Function in *Litopenaeus Vannamei* Exposed to Ammonia and Nitrite Stress. *Fish & Shellfish Immunology*, **78**, 279-288. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.050>
- [21] Waghu, F.H., Barai, R.S., Gurung, P. and Idicula-Thomas, S. (2015) CAMPR3: A Database on Sequences, Structures and Signatures of Antimicrobial Peptides: Table 1. *Nucleic Acids Research*, **44**, D1094-D1097. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1051>
- [22] Wang, X., Ren, Y., Gong, C., Chen, Y., Ge, X., Kong, J., et al. (2021) 40S Ribosomal Protein S18 Is a Novel Maternal Peptidoglycan-Binding Protein That Protects Embryos of Zebrafish from Bacterial Infections. *Developmental & Comparative Immunology*, **125**, Article 104212. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104212>
- [23] Luo, X.Y., Hu, C.M., Yin, Q., et al. (2024) Dual-Mechanism Peptide SR25 Has Broad Antimicrobial Activity and Potential Application for Healing Bacteria-Infected Diabetic Wounds. *Advanced Science*, **11**, Article 2401793. <https://doi.org/10.1002/adv.202401793>
- [24] Bai, Y., Zhang, W., Zheng, W., Meng, X., Duan, Y., Zhang, C., et al. (2024) A 14-Amino Acid Cationic Peptide Bole spleenin334-347 from the Marine Fish Mudskipper *Boleophthalmus boddarti* Exhibiting Potent Antimicrobial Activity and Therapeutic Potential. *Biochemical Pharmacology*, **226**, Article 116344. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116344>
- [25] Zhu, D., Chen, F., Chen, Y., Peng, H. and Wang, K. (2021) The Long-Term Effect of a Nine Amino-Acid Antimicrobial Peptide As-Hepe3(48-56) against *Pseudomonas Aeruginosa* with No Detectable Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **11**, Article 752637. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.752637>
- [26] Li, Y., Yu, S., Weng, P., et al. (2023) Purification and Antimicrobial Mechanism of a Novel Bacteriocin Produced by *Lactiplantibacillus plantarum* FB-2. *LWT*, **185**, Article 115123.
- [27] Gong, Z., Ju, B., Wang, X., He, J., Wan, H., Sudha, P.M., et al. (2001) Green Fluorescent Protein Expression in Germ-Line Transmitted Transgenic Zebrafish under a Stratified Epithelial Promoter from Keratin8. *Developmental Dynamics*, **223**, 204-215. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10051>
- [28] Martorana, M.L., Tawk, M., Lapointe, T., Barre, N., Imboden, M., Joulie, C., et al. (2001) Zebrafish Keratin 8 Is

- Expressed at High Levels in the Epidermis of Regenerating Caudal Fin. *The International Journal of Developmental Biology*, **45**, 449-452. <https://doi.org/10.1387/ijdb.11330866>
- [29] Moll, R., Divo, M. and Langbein, L. (2008) The Human Keratins: Biology and Pathology. *Histochemistry and Cell Biology*, **129**, 705-733. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6>
- [30] Zhou, Y., Chen, L., Hao, S., Cao, X. and Ni, S. (2024) Zebrafish ANGPT4, Member of Fibrinogen-Related Proteins, Is an LTA-, LPS- and PGN-Binding Protein with a Bacteriolytic Activity. *Fish & Shellfish Immunology*, **147**, Article 109451. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109451>
- [31] 张昊, 牛海涛, 李改瑞, 等. 抗菌肽分子结构对其活性的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(12): 892-897.
- [32] Han, R. and Wang, S. (2022) Mechanisms of Antimicrobial Peptides as Characterized by Solid-State NMR. *Magnetic Resonance Letters*, **2**, 119-129. <https://doi.org/10.1016/j.mrl.2021.09.004>
- [33] Priyadarshini, D., Ivica, J., Separovic, F. and de Planque, M.R.R. (2022) Characterisation of Cell Membrane Interaction Mechanisms of Antimicrobial Peptides by Electrical Bilayer Recording. *Biophysical Chemistry*, **281**, Article 106721. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106721>
- [34] Margalho, L.P., Feliciano, M.D., Silva, C.E., Abreu, J.S., Piran, M.V.F. and Sant'Ana, A.S. (2020) Brazilian Artisanal Cheeses Are Rich and Diverse Sources of Nonstarter Lactic Acid Bacteria Regarding Technological, Biopreservative, and Safety Properties—Insights through Multivariate Analysis. *Journal of Dairy Science*, **103**, 7908-7926. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18194>