

微丝错构介导的小金蝠蛾细胞免疫耐受反应*

倪若尧^{1,2**} 李苗苗^{1,2} 吴佩佩^{1,2} 高欣欣^{1,2}

张 寰¹ 秦启联¹ 张继红¹ 孟 茜^{1***}

(1. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101;

2. 中国科学院大学, 生命科学学院, 北京 100049)

摘 要 【目的】 小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis* 细胞免疫反应耐受冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 的侵染, 是非常独特的宿主昆虫与病原真菌免疫互作的研究模型。本研究旨在明确冬虫夏草菌侵染对小金蝠蛾血细胞形态以及伪足形成相关基因表达的影响, 初步解析宿主细胞免疫反应耐受该真菌侵染的机制。

【方法】 利用扫描电子显微镜技术和激光共聚焦荧光显微技术, 分别观察并比较健康小金蝠蛾和感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾血细胞的形态差异。通过实时定量 PCR 技术检测冬虫夏草菌感染前后, 宿主血细胞微丝组装相关基因的表达变化。**【结果】** 冬虫夏草菌侵染后, 小金蝠蛾血细胞丝状伪足和片状伪足的形成受到抑制; 促微丝组装基因 *DRF* 显著下调表达 ($P<0.01$), 抑制微丝组装基因 *thymosin* 显著上调表达 ($P<0.01$)。**【结论】** 冬虫夏草菌侵染后, 小金蝠蛾血细胞微丝的组装受到阻碍, 导致血细胞伪足的形成受到抑制, 进而使得宿主细胞免疫反应耐受该真菌的侵染。

关键词 冬虫夏草菌; 小金蝠蛾; 细胞免疫反应; 微丝; 丝状伪足

Cellular immunity tolerance of *Thitarodes xiaojinensis* induced by an abnormal microfilament assembly

NI Ruo-Yao^{1,2**} LI Miao-Miao^{1,2} WU Pei-Pei^{1,2} GAO Xin-Xin^{1,2}

ZHANG Huan¹ QIN Qi-Lian¹ ZHANG Ji-Hong¹ MENG Qian^{1***}

(1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing 100101, China; 2. College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract 【Objectives】 The cellular immune response of *Thitarodes xiaojinensis* does not prevent infection by *Ophiocordyceps sinensis* and therefore provides a distinct and valuable model for studying the immune interaction between host insects and entomopathogenic fungi. The aim of this study is to investigate the effects of *O. sinensis* infection on the morphology of *T. xiaojinensis* hemocytes and the transcription levels of genes related to pseudopodia formation. **【Methods】** A scanning electron microscope and laser scanning confocal microscope were used to observe and compare differences in hemocyte morphology between healthy and *O. sinensis*-infected *T. xiaojinensis*. Real-time quantitative PCR was used to detect transcriptional changes in genes involved in microfilament synthesis in hemocytes before, and after, infection with *O. sinensis*. **【Results】** The formation of filopodia and lamellipodia in *T. xiaojinensis* hemocytes was inhibited after infection by *O. sinensis*. Expression of the *DRF* gene (promoting microfilament assembly) was also significantly down-regulated ($P<0.01$) and thymosin (a microfilament assembly inhibitor) was significantly up-regulated ($P<0.01$). **【Conclusion】** The microfilament assembly of *T. xiaojinensis* hemocytes was inhibited by infection with *O. sinensis*, preventing formation of hemocytes' filopodia, thereby allowing the fungus to circumvent the host cellular immunity.

Key words *Ophiocordyceps sinensis*; *Thitarodes xiaojinensis*; cellular immunity; microfilament; filopodia

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (32000345)

**第一作者 First author, E-mail: niruoyao@ioz.ac.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: mengqian@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2021-07-17; 接受日期 Accepted: 2021-08-23

昆虫免疫系统主要通过物理屏障、细胞免疫反应 (Cellular immune responses) 和体液免疫反应 (Humoral immune responses) 来抵御外源物的侵染。细胞免疫反应由血细胞介导, 主要包括吞噬 (Phagocytosis)、结节 (Nodulation) 以及包囊 (Encapsulation) 反应 (Lavine and Strand, 2002)。体液免疫反应主要包括 Toll 免疫信号通路 (Valanne *et al.*, 2011)、免疫缺陷 (Immune deficiency) 免疫信号通路以及黑化反应 (Melanization) (Nakhleh *et al.*, 2017)。昆虫主要通过包囊反应、激活 Toll 通路和黑化反应来抵御昆虫病原真菌的侵染。

鳞翅目昆虫血细胞具有多种类型, 其中粒细胞 (Granulocytes) 和浆细胞 (Plasmatocytes) 是细胞免疫反应的主力, 两者占有所有血细胞的 50% 以上 (Strand and Pech, 1995; Arteaga Blanco *et al.*, 2017)。粒细胞和浆细胞在血淋巴中循环时, 均呈圆形。当两者与外源异物表面接触后, 粒细胞能够对称地往外延展, 仍呈圆形或卵圆形; 浆细胞则是不对称地向外延展, 呈梭形或不规则形状 (Strand, 2008)。粒细胞与浆细胞表面往往具有大量丝状伪足 (Filopodia), 它们能够以丝状伪足作为触手, 接触并黏附外源物促使细胞运动进而实施一系列细胞免疫反应 (Kress *et al.*, 2007)。微丝 (Microfilament) 作为丝状伪足 (Filopodia) 和片状伪足 (Lamellipodia) 的主要细胞骨架, 在细胞运动中扮演了重要角色 (Small *et al.*, 2002; Pollard and Borisy, 2003; Mattila and Lappalainen, 2008)。在细胞中, 微丝的合成与组装过程主要由 Diaphanous-related formin (DRF)、thymosin 以及 profilin 等细胞因子调控。DRF 是微丝合成的促进因子, 参与微丝的组装过程; profilin 可以结合单体肌动蛋白, 其主要功能是保证单体肌动蛋白 (G-actin) 能够正确结合到微丝的正极端; thymosin 也可以和单体肌动蛋白结合阻碍后者聚合进而抑制微丝的组装 (Pollard *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2003; Aspenström, 2010)。

名贵中药材冬虫夏草具有降低血糖、降血脂、抗肿瘤、抗氧化、调节免疫力等药理作用

(Dong and Yao, 2008; Wu *et al.*, 2018)。冬虫夏草的形成过程是由冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* (肉座菌目 Hypocreales、线虫草科 Ophiocordycipitaceae、线虫草属 *Ophiocordyceps*) 侵染鳞翅目 Lepidoptera 蝙蝠蛾科 Hepialidae 昆虫, 特别是钩蝠蛾属 *Thitarodes* 和蝠蛾属 *Hepialus* 的地下幼虫, 最终形成的虫菌复合体 (Sung *et al.*, 2007)。小金蝠蛾 *Thitarodes xiaojinensis* 隶属于钩蝠蛾属, 分布于四川省阿坝藏族羌族自治州小金县, 是冬虫夏草菌的主要宿主之一 (张德利和涂永勤, 2015)。冬虫夏草菌侵染蝠蛾, 是非常独特的真菌-宿主互作的研究模型。常见昆虫病原真菌 (如白僵菌、绿僵菌、蛹虫草菌等) 侵入宿主体内后, 能够激活虫体内多种免疫反应。前期观察发现, 冬虫夏草菌侵染小金蝠蛾后, 虽然冬虫夏草菌在宿主幼虫体内不断增殖, 但是幼虫能够正常生长发育, 体表没有明显的病症表现, 这提示蝠蛾免疫耐受冬虫夏草菌的侵染 (Meng *et al.*, 2015, 2021)。近年来, 以小金蝠蛾作为实验模型研究冬虫夏草菌与寄主蝠蛾免疫互作机制的研究逐渐增多。Meng 等 (2015) 鉴定了小金蝠蛾免疫相关基因, 并从转录水平上解析了 Toll 通路的诱导表达模式, 发现在冬虫夏草菌侵染后期该通路的一些元件 (*MyD88*、*Pelle*、*Cactus*) 下调表达。倪若尧等 (2018) 利用酿酒酵母以及凝胶珠 (DEAE-Sephadex A-25) 作为外源免疫刺激, 从细胞水平上明确了小金蝠蛾细胞免疫的作用方式和功能。Li 等 (2020) 利用电子显微镜观察发现, 冬虫夏草菌侵染小金蝠蛾后, 可以以梭形酵母样芽生孢子的形态在小金蝠蛾血淋巴中增殖; 并且, 感染冬虫夏草菌后, 小金蝠蛾血细胞包囊反应和酚氧化酶活性受到抑制。然而, 围绕冬虫夏草菌侵染所致的宿主免疫反应受抑制的机制研究还有待丰富。

本研究以冬虫夏草菌侵染小金蝠蛾为研究模型, 一方面利用扫描电子显微观察和激光共聚焦显微观察技术发现冬虫夏草菌的侵染对小金蝠蛾血细胞表面丝状伪足形成的影响; 另一方面利用实时定量 PCR 技术检测了微丝组装相关基因在冬虫夏草菌侵染前后的表达情况。本研究初

步探究了小金蝠蛾细胞免疫反应耐受冬虫夏草菌侵染的机制,以期促进对冬虫夏草菌和宿主蝠蛾免疫互作的深入理解,为人工栽培冬虫夏草提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与菌株

小金蝠蛾 *T. xiaojinensis* 幼虫采自四川省小金县,并已在实验室饲养多代,饲养温度为 14 °C,相对湿度为 60% (Li *et al.*, 2020)。冬虫夏草菌 *O. sinensis* 自四川省小金县采集的新鲜冬虫夏草中分离,通过 rDNA ITS 鉴定后,接种于马铃薯葡萄糖液体培养基中,培养温度为 18 °C。使用神奇滤布 (Miracloth, Millipore) 分离获得冬虫夏草菌芽生孢子,用于后续侵染实验 (Meng *et al.*, 2021)。对 6-7 龄健康小金蝠蛾幼虫注射 5 μ L PBS 缓冲液或 5 μ L 冬虫夏草菌芽孢悬液 (1.0×10^6 blasospores/mL),处理 7 d 后收集幼虫。本研究以注射 PBS 缓冲液的幼虫作为对照组,以感染冬虫夏草菌的幼虫作为处理组。

1.2 小金蝠蛾血细胞扫描电镜制样

分别从对照组和处理组小金蝠蛾幼虫 (各 3 头) 背血管处取血淋巴 30 μ L,与 1 mL PBS 缓冲液 (含 10% 苯基硫脲饱和溶液) 混合,在 4 °C 下,1 000 r/min 离心 10 min。除去上清,使用缓冲液清洗细胞 3 次。使用 2.5% 戊二醛溶液,于 4 °C 下固定细胞 12 h,离心收集血细胞。再次使用缓冲液清洗细胞 3 次,在最后一次除去上清时,留有 100 μ L 溶液,轻轻吹打以悬浮细胞。将细胞悬液滴加在导电玻璃上,沉降 1 min。使用双蒸水清洗细胞 3 次,每次 1 min。使用 30%、50%、70%、85%、95% 乙醇对细胞进行梯度脱水,每个梯度脱水 20 min。最后使用 100% 乙醇脱水 15 min,重复 3 次。使用超临界 CO₂ 干燥器,对滤纸包裹好的导电玻璃进行干燥。使用喷金仪对黏附于载物台上的导电玻璃 (样品面朝上) 进行喷金处理。使用扫描电子显微镜 (Hitachi SU8000) 观察制备好的样品。

1.3 小金蝠蛾血细胞细胞骨架的染色

分别从对照组和处理组小金蝠蛾幼虫 (各 3 头) 背血管处取血淋巴 30 μ L,与 Ringer's 生理盐水 (含 10% 苯基硫脲饱和溶液) 混匀后滴加至腔室载玻片中,孵育 1 h,除去上清。在室温下,使用 200 μ L/孔 2.5% 戊二醛溶液固定细胞 2 h。除去固定液,加入 200 μ L/孔 0.1% Triton X-100 溶液孵育 20 min,以对细胞进行通透处理。除去通透液,使用 PBS 缓冲液重复清洗细胞 3 次,每次 5 min。使用微丝荧光染色液 Actin-Tracker Green (碧云天,稀释 400 倍),并于摇床上避光 20 r/min 孵育 20 min。弃去染色液,使用 PBS 缓冲液清洗 10 min,重复 5 次。弃去 PBS 缓冲液,加入 100 μ L 核酸染色液 DAPI,并于摇床上避光 20 r/min 孵育 20 min。弃核酸染色液,使用 PBS 缓冲液重复清洗样品 3 次。最后,向每个腔室逐一滴加防荧光淬灭液,盖上盖玻片,用透明指甲油封片。使用激光共聚焦荧光显微镜 (Zeiss LSM710) 观察制备好的样品。

1.4 小金蝠蛾血细胞 cDNA 制备

逐从小金蝠蛾幼虫背血管处取血淋巴,每个实验组包含 3 个重复,每个重复含有 5 头幼虫的血淋巴样。将 50 μ L 血淋巴混合样品与 1 mL Trizol 混合,使用匀浆器破碎细胞后,室温放置 5 min。向各个样品中加入 200 μ L 氯仿,剧烈震荡 20 s 随后室温放置 3 min。样品在 4 °C 下,12 000 r/min 离心 15 min。将上清与 500 μ L 异丙醇混合,常温静置 10 min。样品在 4 °C 下,12 000 r/min 离心 10 min,除去上清。利用 75% 乙醇清洗 RNA 沉淀,随后使用 Nuclease-free H₂O 溶解 RNA。当提取的总 RNA 吸光值 260/280 在 1.90-2.00 之间且浓度 ≥ 100 ng/ μ L 时,认为获得合格 RNA 样品。按照 RNA 反转录试剂盒 5X All-In-One RT MasterMix (ABM 公司) 说明书对 RNA 进行反转录。

1.5 小金蝠蛾细胞骨架微丝组装相关基因的 quantitative RT-PCR (qPCR) 检测

实验中所涉及的引物如表 1 所示。反应体

系：2×UltraSYBR Mixture (Low ROX) 12.5 μL；正、反向引物（10 μmol·L⁻¹）各 0.5 μL；cDNA 模板 1 μL；ddH₂O 10.5 μL。反应程序：95 ℃预变性 10 min；95 ℃变性 15 s，60 ℃退火并延伸 1 min（该过程进行 35 个循环）。溶解曲线检测程序：95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s，60 ℃ 15 s。每个反应进行 3 次技术重复。qPCR 反应在 qPCR 仪（Stratagene MX3000P）上进行，输出的数据使用 Excel 进行分析计算，使用核糖体蛋白 S3（*rps3*）作为内参对各处理组内的基因进行均一化处理。利用 GraphPad Prism 8.3.0 进行差异显著性分析（双尾 *t*-检验）。

表 1 微丝组装相关基因的引物序列信息
Table 1 Primer of genes involved in microfilament assembly

引物名称 Primer name	引物序列（5'到 3'） Primer sequence (5' to 3')
profilin-F	GCATTAGTTGAGGTGTAGTAAG
profilin-R	TATCTTCGCAATCTCGTCTT
thymosin-F	GCAGAGTTGGTAGGAAGGA
thymosin-R	GAGCAAGTAGCGGTGATG
DRF-F	CTCGCTTGCTACTGTTCA
DRF-R	AATCCACGCCATCATATCC
rps3-F	GAGAATTGGCTGAAGATGGT
rps3-R	GAGGTCAACTCCCTGATACG

-F 为正向引物；-R 为反向引物。-F indicates the forward primer; -R indicates the reverse primer.

2 结果与分析

2.1 冬虫夏草菌侵染后小金蝠蛾血细胞的形态变化

扫描电子显微镜观察小金蝠蛾血细胞表面超微结构表明，健康小金蝠蛾血细胞（粒细胞）表面具有延展向外的丝状伪足，而感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾血细胞表面丝状伪足的数量显著降低（图 1）。并且，健康小金蝠蛾血细胞表面微丝交织成紧密相连的网络结构；但感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾血细胞表面的微丝呈现短粗或条形结构散布于细胞表面（图 1）。

激光共聚焦电子显微观察结果显示，健康小金蝠蛾血细胞（粒细胞和浆细胞）中细胞骨架微丝的绿色荧光信号均匀细密明亮，微丝束较为清晰，细胞表面通过微丝形成大量丝状伪足（图 2，蓝色箭头）以及片状伪足（图 2，黄色箭头）；彼此临近的血细胞通过丝状伪足、片状伪足间的接触建立连接，并且一些连接处呈现出更为显著的绿色荧光信号（图 2，红圈）。小金蝠蛾感染冬虫夏草菌 7 d 后，虽然在血细胞上也检测到绿色荧光信号但分布不均匀，有分散的高亮的团粒（图 2，黄圈），未见清晰的微丝束，细胞表面很难观察到以微丝作为骨架的丝状伪足。上述结果表明，感染冬虫夏草菌后，小金蝠蛾血细胞表面丝状伪足的形成受到抑制。

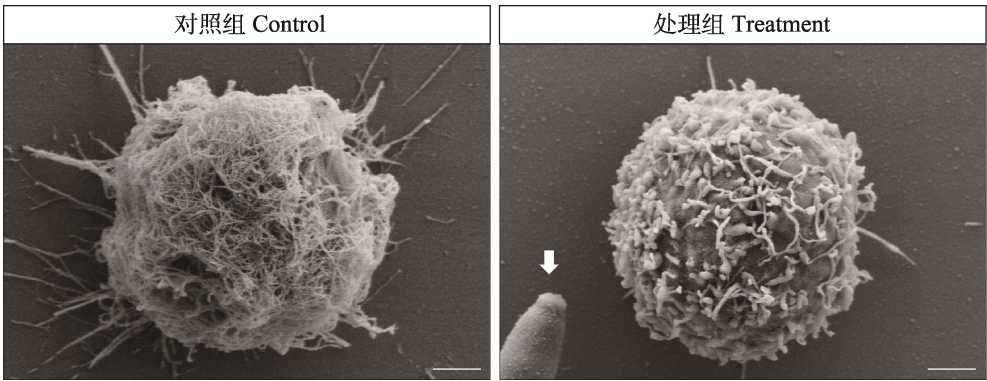


图 1 健康小金蝠蛾（对照组）与感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾（处理组）血细胞的超微结构
Fig. 1 Ultrastructure of hemocytes in healthy (control) and *Ophiocordyceps sinensis*-infected *Thitarodes xiaojinensis* (treatment)

白色箭头指示冬虫夏草菌。标尺=2 μm。White arrow indicates *Ophiocordyceps sinensis*. Scale bar = 2 μm.

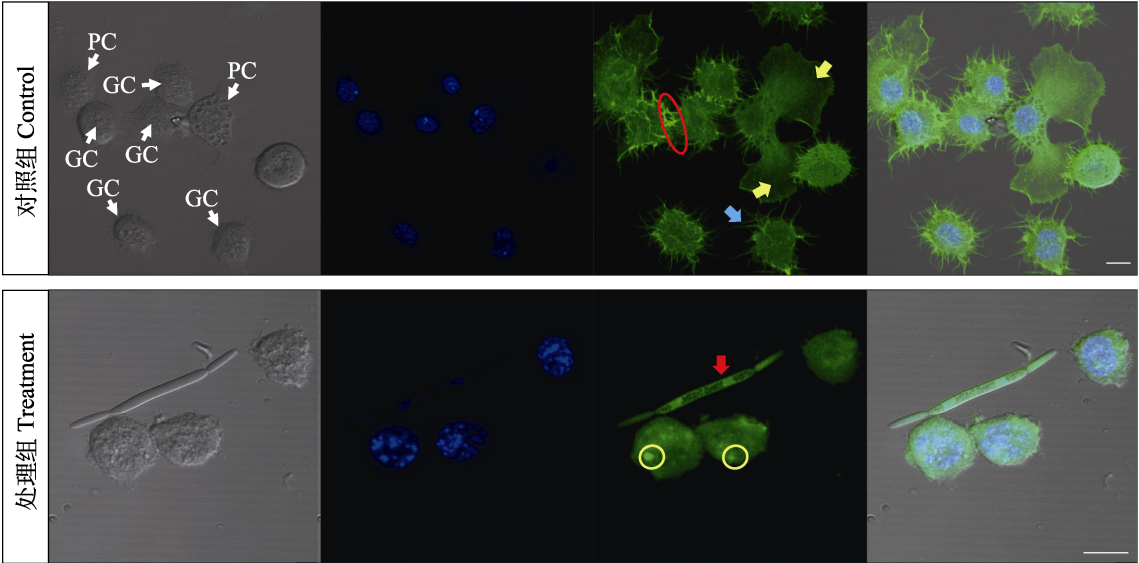


图 2 健康小金蝠蛾（对照组）与感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾（处理组）血细胞的微丝荧光染色

Fig. 2 Microfilament fluorescence staining of hemocytes in healthy (control) and *Ophiocordyceps sinensis*-infected *Thitarodes xiaojinensis* (treatment)

PC: 浆细胞 Plasmatocyte; GC: 粒细胞 Granulocyte; 黄色箭头指示片状伪足; 蓝色箭头指示丝状伪足; 红色箭头指示冬虫夏草菌; 红圈指示血细胞之间相互粘连; 黄圈指示血细胞中高亮的团粒。标尺=10 μm。
Yellow arrows indicate lamellipodia; Blue arrow indicates filopodia; Red arrow indicates *Ophiocordyceps sinensis*. The red circle indicates the adhesion between two adjacent hemocytes. The yellow circles indicate high-intensity clusters in hemocytes. Scale bar = 10 μm.

2.2 冬虫夏草菌侵染后小金蝠蛾微丝组装相关基因表达量的变化

为了进一步探究宿主蝠蛾血细胞伪足形成的抑制机制, 利用 qPCR 技术比较细胞骨架微丝组装相关基因 (*DRF*、*thymosin* 和 *profilin*) 在健康小金蝠蛾血细胞与感染冬虫夏草菌 7 d 的小金蝠蛾血细胞之间的表达变化 (图 3)。与健康小金蝠蛾相比, 在感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾血细胞中, 微丝组装促进基因 *DRF* 的表达显著下调 1.81 倍 ($P<0.01$); 抑制微丝组装基因 *thymosin* 显著上调 2.22 倍 ($P<0.01$); 确保单体肌动蛋白在微丝正极端组装基因 *profilin* 显著上调 2.16 倍 ($P<0.01$)。

3 讨论

病原真菌侵入昆虫体内后, 即面临宿主免疫系统的攻击。昆虫免疫系统主要通过吞噬、包裹等细胞免疫反应和分泌抗菌肽、黑色素等体液免疫反应, 以抵御病原真菌的侵染。在长期的协同

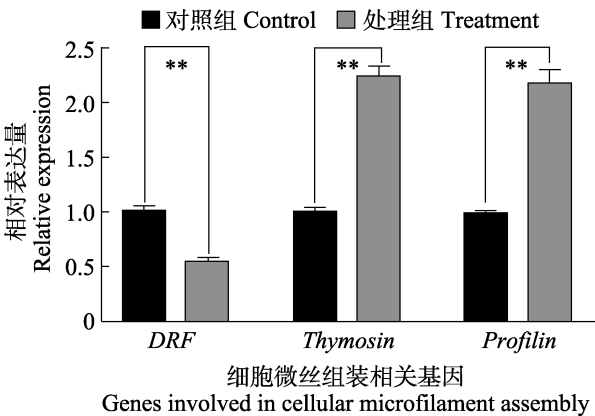


图 3 健康小金蝠蛾（对照组）与感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾（处理组）血细胞微丝组装相关基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of genes involved in microfilament assembly in healthy (control) and *Ophiocordyceps sinensis*-infected *Thitarodes xiaojinensis* (treatment) hemocytes

**表示具有显著差异 ($P<0.01$).
** indicates a significant difference ($P<0.01$).

进化过程中, 病原真菌进化出多种免疫逃逸策略以应对宿主的免疫防御攻击。例如, 莱氏野村菌 *Nomuraea rileyi* 能够降低棉铃虫 *Helicoverpa*

armigera 血细胞吞噬和扩散能力 (Zhong *et al.*, 2017)。又如, 绿僵菌能够分泌绿僵菌素 (Destruxins) 抑制宿主的细胞以及体液免疫反应 (Wang *et al.*, 2012)。

在鳞翅目昆虫中, 细胞免疫反应如吞噬、包裹和结节反应主要依赖粒细胞和浆细胞来完成。当病原菌侵入昆虫体内后, 循环于血淋巴中的粒细胞和浆细胞通过延展伪足, 接触、黏附至病原菌上, 随后细胞免疫反应激活以抵御病原菌的侵染 (Kress *et al.*, 2007; Strand, 2008)。由此可见, 血细胞伪足的形成对细胞免疫反应发生尤为重要。本研究利用扫描电子显微镜和激光共聚焦显微镜观察发现, 健康小金蝠蛾粒细胞和浆细胞表面能够形成大量的丝状伪足, 而感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾血细胞表面的丝状伪足明显减少 (图 1, 图 2)。由于处理组蝠蛾血细胞伪足形成受阻, 导致细胞边缘无法延展多呈圆形或卵圆形, 因此目前难以从形态学上对感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾血细胞进行分类。

丝状伪足是运动细胞在微环境中的探测器, 它是由平行排列的微丝组成的杆状突起。研究表明, 丝状伪足的形成依赖于细胞骨架微丝的合成以及正确组装 (Peng *et al.*, 2003; Aspenström, 2010)。扫描电子显微镜观察结果显示, 与健康小金蝠蛾血细胞相比, 感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾血细胞表面的微丝表现为短粗或条形结构 (图 1)。利用微丝荧光染色液对血细胞骨架进行染色观察发现, 感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾血细胞中的绿色荧光信号在个别部位存在高光的团粒或条形结构 (图 2), 这与扫描电镜所展示的血细胞表面的结构 (图 1, 处理组) 具有一致性。微丝荧光染色液是一种鬼笔环肽类染料, 只能与微丝结合, 不能与构成微丝的单体肌动蛋白结合。对照组和处理组小金蝠蛾血细胞表面均可以观察到微丝的荧光信号, 说明不论小金蝠蛾是否被冬虫夏草菌侵染, 其血细胞表面仍然具有微丝结构。然而, 健康小金蝠蛾的血细胞表面的微丝能够呈纤维状排布, 并向外延伸进而形成伪足 (图 2, 对照组)。于此不同, 感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾血细胞表面的微丝组装异常, 仅分散在血细

胞表面, 有些会在局部聚集, 纤维状微丝束形成受阻, 进而影响伪足形成 (图 2, 处理组)。这些结果提示, 微丝无法正确组装可能是宿主蝠蛾血细胞伪足减少的重要原因之一。

为进一步探究小金蝠蛾血细胞微丝组装能力受影响的机制, 本研究分别检测了 *DRF*、*thymosin* 以及 *profilin* 3 种细胞因子的基因表达量。*DRF* 可以结合在细胞内平行排列的微丝正极末端, 并招募单体肌动蛋白聚合, 微丝延长形成微丝束, 进而促进丝状伪足延展 (Ridley, 2006)。另外, 有体外实验表明, 将 *DRF3* 抗体与小鼠胚胎成纤维细胞孵育后, 细胞表面的微丝无法延展排列成束状, 伪足减少 (Peng *et al.*, 2003)。冬虫夏草菌侵染后, 小金蝠蛾血细胞中 *DRF* 表达量显著降低, 这可能导致单体肌动蛋白无法正确排布于微丝正极末端, 引起微丝异常组装, 进而阻碍伪足形成。*thymosin* 可以与单体肌动蛋白结合, 封闭单体肌动蛋白的聚合位点, 阻止后者的自发成核或组装到已有的微丝正极末端。在细胞中, *thymosin* 的浓度常与单体肌动蛋白的浓度呈正相关, *thymosin* 能够使细胞内单体肌动蛋白的浓度远远高于体外自发组装的临界浓度 (Paavilainen *et al.*, 2004)。在感染冬虫夏草菌的小金蝠蛾血细胞中, *thymosin* 表达量的上调 (图 3), 这可能引起单体肌动蛋白过度积累, 但无法聚合形成微丝。*Profilin* 可确保单体肌动蛋白正确结合于微丝的正极端而不在负极端, 然而, *thymosin* 能够与 *profilin* 竞争, 干扰后者与单体肌动蛋白结合 (Pollard *et al.*, 2000; Paavilainen *et al.*, 2004)。虽然冬虫夏草菌侵染后宿主幼虫血细胞中 *profilin* 上调表达 (图 3), 但是由于 *DRF* 表达受到抑制且 *thymosin* 表达上调, 导致单体肌动蛋白无法正确的聚合在微丝正极末端, 引起微丝组装异常, 进而导致丝状伪足形成受阻。

综上所述, 冬虫夏草菌的侵染能够影响小金蝠蛾血细胞表面的形态学结构。促微丝组装因子 *DRF* 显著下调表达, 抑制微丝组装基因 *thymosin* 显著上调表达, 影响小金蝠蛾血细胞微丝的正确组装和组织能力, 进而抑制血细胞丝状伪足的形

成,降低其细胞免疫能力,引起宿主细胞免疫反应耐受冬虫夏草菌的侵染。

参考文献 (References)

- Arteaga Blanco LA, Crispim JS, Fernandes KM, De Oliveira LL, Pereira MF, Bazzolli DMS, Martins GF, 2017. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell and Tissue Research*, 370(1): 153–168.
- Aspenström P, 2010. Formin-binding proteins: Modulators of formin-dependent actin polymerization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803(2): 174–182.
- Dong CH, Yao YJ, 2008. In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *LWT-Food Science and Technology*, 41(4): 669–677.
- Kress H, Stelzer EHK, Holzer D, Buss F, Griffiths G, Rohrbach A, 2007. Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28): 11633–11638.
- Lavine M, Strand M, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Immunology*, 32(10): 1295–1309.
- Li M, Meng Q, Zhang H, Ni R, Zhou G, Zhao Y, Wu P, Shu R, Qin Q, Zhang J, 2020. Vegetative development and host immune interaction of *Ophiocordyceps sinensis* within the hemocoel of the ghost moth larva, *Thitarodes xiaojinensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 170:107331.
- Li L, Zhang L, Li SG, 2020. Research frontiers of hemocytes functions, morphology and cellular immune response in insects. *Journal of Environmental Entomology*, 42(5): 1112–1120. [李蕾, 张雷, 李世广, 2020. 昆虫血细胞功能、形态及细胞免疫反应研究前沿. 环境昆虫学报, 42(5): 1112–1120.]
- Mattila PK, Lappalainen P, 2008. Filopodia: Molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(6): 446–454.
- Meng Q, Wu PP, Li MM, Shu RH, Zhou GL, Zhang JH, Zhang H, Jiang HB, Qin QL, Zou Z, 2021. Distinct responses of *Thitarodes xiaojinensis* β -1,3-glucan recognition protein-1 and immulectin-8 to *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* infection. *Journal of Immunology*, 207(1): 200–209.
- Meng Q, Yu HY, Zhang H, Zhu W, Wang ML, Zhang JH, Zhou GL, Li X, Qin QL, Hu SN, Zou Z, 2015. Transcriptomic insight into the immune defenses in the ghost moth, *Hepialus xiaojinensis*, during an *Ophiocordyceps sinensis* fungal infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 64: 1–15.
- Nakhleh J, El Moussawi L, Osta MA, 2017. The melanization response in insect immunity. *Advances in Insect Physiology*, 52: 83–109.
- Ni R, Meng Q, Zhang H, Zhang J, Qin Q, 2018. Types, morphology and cellular immune functions of hemocytes in larvae of *Thitarodes xiaojinensis* (Lepidoptera: Hepialidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(4): 432–438. [倪若尧, 孟茜, 张寰, 张继红, 秦启联, 2018. 小金蝠蛾幼虫血细胞的种类、形态及细胞免疫功能. 昆虫学报, 61(4): 432–438.]
- Paavilainen VO, Bertling E, Falck S, Lappalainen P, 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends in Cell Biology*, 14(7): 386–394.
- Peng J, Wallar BJ, Flanders A, Swiatek PJ, Alberts AS, 2003. Disruption of the Diaphanous-related formin *Drf1* gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Current Biology*, 13(7): 534–545.
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD, 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics*, 9: 545–576.
- Pollard TD, Borisy GG, 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4): 453–465.
- Ridley AJ, 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology*, 16(10): 522–529.
- Small JV, Stradal T, Vignal E, Rottner K, 2002. The lamellipodium: Where motility begins. *Trends in Cell Biology*, 12(3): 112–120.
- Strand MR, Pech LL, 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology*, 40: 31–56.
- Strand MR, 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15(1): 1–14.
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-Ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW, 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 57: 5–59.
- Valanne S, Wang JH, Rämet M, 2011. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *The Journal of Immunology*, 186(2): 649–656.
- Wang B, Kang Q, Lu Y, Bai L, Wang C, 2012. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4): 1287–1292.
- Wu R, Yao PG, Wang HL, Gao Y, Yu HL, Wang L, Cui XH, Xu X, Gao JP, 2018. Effect of fermented *Cordyceps sinensis* on doxorubicin induced cardiotoxicity in rats. *Molecular Medicine Reports*, 18(3): 3229–3241.
- Zhang DL, Tu YQ, 2015. The determination of *Thitarodes xiaojinensis* ecotype. *Environmental Entomology*, 37(5): 1055–1059. [张德利, 涂永勤, 2015. 小金蝠蛾的生态型研究. 环境昆虫学报, 37(5): 1055–1059.]
- Zhong K, Liu ZC, Wang JL, Liu XS, 2017. The entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* impairs cellular immunity of its host *Helicoverpa armigera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 96(1): e21402.