

doi: 10.7541/2022.2021.0179

厚壳贻贝*McCaspase 3-4*基因的克隆及其在幼虫变态中的作用

刘志显^{1,2} 李嘉政^{1,2} 梁邻利^{1,2} 冯丹丹^{1,2} 梁箫^{1,2} 杨金龙^{1,2,3} 竹攸汀^{1,2}

(1. 上海海洋大学国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 南方海洋科学与工程广东省实验室, 广州 511458)

摘要: 为进一步了解细胞凋亡及其效应基因*caspase-3*在海洋贝类厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)变态中的作用, 研究通过RACE技术克隆并鉴定了一个厚壳贻贝*caspase-3*基因的cDNA全长, 并对该基因在幼虫变态中的作用进行了研究。碱基序列和氨基酸序列特征分析显示, 该基因编码的蛋白质具有典型的*caspase* P20和P10结构域, 但核心半胱氨酸活性位点QACXG五肽保守序列发生了突变。系统进化分析结果显示该基因与无脊椎动物*Caspase-3*聚在一起, 并与地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)*caspase 3/7-4*相似度最高, 因此将其命名为*McCaspase 3-4*。随后, 通过实时荧光定量PCR技术对该基因在成贝不同组织及幼虫变态不同时间点的表达水平进行了分析。结果显示, *McCaspase 3-4*在成贝外套膜和唇瓣中的表达量显著高于其他组织。肾上腺素诱导眼点幼虫变态12h后, *McCaspase 3-4*的表达水平出现显著上升, 并在刺激24h后达到最高, 表明该基因可能在幼虫变态早期发挥作用。利用RNA干扰技术敲降眼点幼虫*McCaspase 3-4*基因表达后的结果显示, 肾上腺素对眼点幼虫变态的诱导作用显著下降, 表明该基因在调控厚壳贻贝变态过程中具有重要作用。研究结果有助于理解细胞凋亡在厚壳贻贝幼虫变态中的作用及贝类变态的分子机制。

关键词: 细胞凋亡; *Caspase-3*; 组织表达; 幼虫变态; 厚壳贻贝

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2022)08-1168-09



细胞凋亡(Apoptosis)是个体细胞在基因严格控制下的程序性死亡方式(Programmed cell death, PCD), 在疾病发生、机体免疫、器官退化与生成及变态发育过程中发挥着重要作用^[1, 2]。细胞的凋亡过程包括了一系列细胞形态的变化, 如细胞体积收缩、染色质凝集和凋亡小体(Apoptosome)的出现等^[3]。细胞凋亡主要通过内源性途径和外源性途径两种方式触发。前者包括线粒体功能受损引起的线粒体膜通透性变化, 从而导致其释放不同的促凋亡蛋白, 促凋亡蛋白的释放会进一步引起细胞色素*c* (Cyt *c*)释放, Cyt *c*与凋亡蛋白酶激活因子(Apaf-1)结合后可以激活*caspase-9*, 进而水解活化*caspase-3*并引起细胞凋亡^[4]。外源性途径则是由死

亡受体Fas结合配体FasL后, 招募并结合接头蛋白FADD形成死亡信号复合体, 该复合体可以招募活化*caspase-8*, 并进一步激活*caspase-3*或诱发内源性凋亡^[4, 5]。上述两种诱发细胞凋亡的信号通路最终都通过活化不同的*Caspase*分子来完成。

半胱天冬氨酸蛋白酶(*Caspase*)家族是细胞凋亡的核心分子。在哺乳动物中, *caspase*家族至少存在2类13个成员, 其中一类主要参与炎症反应, 而另一类则参与细胞凋亡^[6, 7]。参与细胞凋亡的*caspase*可分为起始*caspase* (Initiator *caspase*)和效应*caspase* (Effector *caspase*)。在哺乳动物中, 前者包括*caspase-2*、*8*、*9*和*10*, 它们的N端具有较长蛋白互作前结构域(Prodomain), 其中通常包含死亡效应

收稿日期: 2021-08-09; 修订日期: 2022-04-20

基金项目: 国家自然科学基金(32002410); 上海市科技创新行动计划——青年科技英才扬帆计划(19YF1419500); 上海市优秀学术带头人计划(20XD1421800); 南方海洋科学与工程广东省实验室人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402); 国家重点研发计划(2020YFD0900804)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (32002410); the Shanghai Sailing Program (19YF1419500); the Program of Shanghai Academic Research Leader (20XD1421800); the Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (GML2019ZD0402); the National Key Research and Development Program of China (2020YFD0900804)]

作者简介: 刘志显(1997—), 男, 硕士研究生; 主要研究方向为海洋贝类变态的分子机制。E-mail: m190100014@st.shou.edu.cn

通信作者: 竹攸汀(1987—), 男, 博士; 主要研究方向为海洋贝类生物学。E-mail: ytzhu@shou.edu.cn

结构域DED或caspase招募结构域CARD, 具有被结合死亡信号复合体并激活下游效应caspase的功能^[3]。后者包括caspase-3、6和7, 仅有一个较短的前结构域, 能被起始caspase水解激活, 然后通过切割不同细胞底物的方式引发凋亡^[3, 8]。因此, 以caspase-3为代表的效应caspase在凋亡过程中起到了最终执行者的作用。

细胞凋亡最初源于对线虫发育的研究^[9], 后来陆续在两栖动物、尾索动物和昆虫的变态过程中发现了细胞凋亡^[10-14]。作为生物体自主有序的细胞死亡方式, 细胞凋亡在机体发育、组织退化和形成过程中发挥了不可或缺的作用^[15]。动物发育的一种普遍方式是产生过多的组织和细胞, 然后在发育后期通过细胞凋亡进行剔除, 以实现适当的器官功能^[9]。针对动物变态的研究显示, caspase-3介导下的细胞凋亡是调控变态的关键因素。例如在非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)^[10, 11]、家蚕(*Bombyx mori*)^[12]、玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)^[13, 14]和黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[16]中, 均发现了细胞凋亡参与调控组织退化及器官形成的证据。上述在模式生物中的研究表明, 细胞凋亡可能是生物变态过程中自主清除多余组织或器官的重要方式。此外, 虽然目前已有部分证据显示细胞凋亡及caspase基因可能参与福建牡蛎(*Crassostrea angulata*)^[17]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[18]和文蛤(*Meretrix meretrix*)^[19]等海洋贝类的变态过程, 但关于凋亡及caspase基因与海洋贝类变态之间的关系仍然知之甚少。

厚壳贻贝(*M. coruscus*)分布于我国黄渤海和东南沿海等地, 由于具有营养丰富、肉味鲜美和生长快速等特点, 逐渐成为我国海洋贝类养殖产业的重要物种, 产业发展前景巨大^[20, 21]。厚壳贻贝的生活史包括营浮游生活的担轮幼虫、D型幼虫、壳顶幼虫和眼点幼虫及营半附着底栖生活的稚体和成贝两个阶段。在眼点幼虫时, 厚壳贻贝会寻找适宜生存的场所进行附着并变态发育成稚贝。因此, 眼点幼虫的变态是厚壳贻贝生命过程中的关键环节, 决定了其能否成功发育为稚贝。贻贝在变态过程中会发生一系列形态和生理上的变化, 如纤毛环退化、鳃和足形态的变化等^[22], 而细胞凋亡是否参与上述组织的退化及新形态的塑造却仍不十分明确, 因此有必要通过更多研究来进一步了解caspase-3及其介导下的细胞凋亡在贻贝变态过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

厚壳贻贝成贝采自浙江省嵊泗县枸杞岛附近

海域, 当天运回实验室后, 利用过滤的自然海水(1.2 μm 孔径乙酸纤维滤膜过滤)在10 L的聚碳酸酯水族箱中暂养1周, 养殖水温为21 $^{\circ}\text{C}$, 盐度为30‰, 期间每日投喂青岛大扁藻(*Platymonas helgolandica*)和湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhanjiangensis*)。实验正式进行前3天停止喂食。在暂养结束后, 解剖5只成贝取得外套膜、唇瓣、肠、鳃、性腺、消化腺、足、血细胞和闭壳肌等组织样品, 用于分析不同组织的基因表达情况。

厚壳贻贝眼点幼虫参考Yang等^[23]的方法, 通过实验室人工授精的方式获得。眼点幼虫在黑暗环境下以5个/mL的密度培养, 水温18 $^{\circ}\text{C}$, 培养期间按 5×10^4 cells/mL密度投喂湛江等鞭金藻, 幼虫用于变态阶段基因表达、变态诱导和RNA干扰实验。

1.2 总RNA提取和cDNA第一链合成

用RNAiso Plus试剂(TaKaRa, 日本), 参照说明书提取厚壳贻贝不同组织和幼虫变态时期样品的总RNA, 利用Nanodrop 2000超微量分光光度计(Thermo Scientific, 美国)对提取的RNA进行浓度和质量检测, 通过琼脂糖凝胶电泳对RNA质量进行检测。用SMARTer™ RACE 5'/3' Kit试剂盒(Clontech, 日本), 参照说明书合成一链cDNA用于后续cDNA全长克隆。用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa, 日本), 参照说明书反转录cDNA并用于后续基因表达分析。

1.3 Caspase-3基因cDNA全长克隆

基于本实验室厚壳贻贝转录组文库中的caspase-3基因ETS片段设计3'和5' RACE扩增引物(表1), 用SMARTer™ RACE 5'/3' Kit试剂盒进行RACE扩增。扩增的目的片段通过DNA回收试剂盒(生工, 上海)回收后连接至pMD19-T载体(TaKaRa, 日本)并导入感受态细胞DH5 α (生工, 上海)中, 将经阳性克隆筛选后的目的菌株送至上海生工测序并拼接, 经BLAST比对分析后确定为Caspase-3基因。

1.4 基因序列分析

利用BLAST对克隆获得的caspase-3 cDNA全长进行同源性分析; 利用ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析目的基因开放阅读框(ORF)及编码氨基酸序列; 利用ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)预测目的蛋白质的理化性质; 利用PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>)预测目的蛋白质结构域; 通过Clustal Omega(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)对目的蛋白质的氨基酸序列进行多重比对分析后, 利用DNAMAN对多重比对结果进行彩色标记, 利用PhyML(<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>)进行系统进化分析(最大似

表 1 厚壳贻贝 *Caspase-3* 基因 cDNA 全长克隆和 mRNA 表达分析所用的引物序列

Tab. 1 Primers sequences used for cDNA cloning and *Mytilus coruscus caspase-3* gene mRNA expression analysis

引物名称 Prime name	序列 Sequence (5'—3')	用途 Usage
McCaspase 3-4-5'RACE	CATCCTTACTGGCATCATTTCA	5'RACE
McCaspase 3-4-3'RACE	GTTGACACATGGTAATGAGGA CAG	3'RACE
caspase 3-2-like-qPCR-F	GGAACACTGCAAGAAAGTG	qRT-PCR
caspase 3-2-like-qPCR-R	AGGATGAGGCATCCACATC	qRT-PCR
caspase 3-3-like-qPCR-F	CAAGGTGGTATGTTTGTATGGC	qRT-PCR
caspase 3-3-like-qPCR-R	GCTGAGGTACGTTTCTGCAGT	qRT-PCR
McCaspase 3-4-qPCR-F	TCCTTGAAGTTTATTCCACG	qRT-PCR
McCaspase 3-4-qPCR-R	TGTCCAGGCTCAAATGTC	qRT-PCR
EF-1 α -RT-F	CACCACGAGTCTCTCCCTGA	qRT-PCR
EF-1 α -RT-R	GCTGTCACCACAGACCATTC	qRT-PCR

然法, bootstrap 重复计算 100 次)^[24]。

1.5 qRT-PCR 分析

将厚壳贻贝 *EF-1 α* 作为内参基因, 分别设计 *EF-1 α* 及克隆获得的 *caspase-3* 基因的实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 引物(表 1)。利用 FastStart Essential DNA Green Master 试剂盒(Roche, 瑞士), 按照说明书进行操作, 对厚壳贻贝不同组织和眼点幼虫不同变态时间的 mRNA 表达情况进行分析。进行组织表达分析的样品分别取自独立的 5 个成贝 ($n=5$), 进行变态过程基因表达分析的为 4 个独立实验组, 每个独立实验组包含 200 只眼点幼虫 ($n=800$), 上述每个样品均进行 3 次技术重复。将 *caspase-3* 基因在不同样品中的相对丰度输入 JMP 10.0 软件, 通过单因素方差分析判断其差异性, $P<0.05$ 表示显著性差异。

1.6 RNA 干扰实验

RNA 干扰使用的 siRNA (Short interfering RNA) 序列由吉玛公司 (GenePharma, 上海) 按照获得的 *Caspase-3* 基因 cDNA 全长设计并合成 (*Caspase 3-4* siRNA 序列: 5'-GGCAGAACGUAACACAAAUUTT-3')。参考本实验室已发表的方法^[22, 25], 通过电穿孔方式对厚壳贻贝眼点幼虫进行 siRNA 转染: 眼点幼虫首先在高压灭菌过滤海水 (AFSW) 中进行漂洗, 然后将 200 只幼虫分别转移到只含有 1 mL AFSW (空白对照组)、含有 1 mL AFSW 以及非目的基因 siRNA (NC siRNA: 5'-UUCUCCGAACGUGUCAC GUTT-3', 阴性对照组) 以及含有 1 mL AFSW 和 1.2 μ g *Caspase 3-4* siRNA (实验组) 的 1.5 mL 除酶 Tube 管中孵育 5 min 后, 吸取幼虫及 siRNA 混合物至直径 0.4 cm 的电穿孔仪配套电极杯 (Bio-Rad, 美国) 中, 利用

GenePulser Xcell (Bio-Rad) 电穿孔仪进行电击。将电穿孔后的幼虫样品在室温下保持 10 min, 然后转移至 AFSW 中 48 h 后收集幼虫, 提取总 RNA, 通过 qRT-PCR 检测目的基因 (*caspase-3*) 的敲降情况, 所有 RNA 干扰实验均独立重复进行 4 次 ($n=800$)。

1.7 幼虫变态诱导实验

参考 Liang 等^[25], 利用肾上腺素 (Epinephrine, EPI) 诱导幼虫进行变态。在玻璃培养皿中加入 20 mL 含有 EPI (10^{-4} mol/L) 的 AFSW, 然后将 20 只眼点幼虫置于其中连续暴露 96 h, 分别记录暴露 0、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 后幼虫的变态情况, 未加入 EPI 进行变态诱导的实验组作为空白对照, 每个实验组设置独立的 9 个培养皿作为平行实验 ($n=180$)。RNA 干扰后检测幼虫变态率的实验中, 分别设置无 EPI 诱导作为空白对照组 (仅为 AFSW 加幼虫, 包含电击和非电击), 加入 EPI 进行变态诱导的作为阳性对照组 (包括电击和非电击), 非目的基因 RNA 干扰后通过 EPI 诱导变态的作为阴性对照组, *caspase-3* RNA 干扰后 EPI 诱导变态的作为实验组。RNA 干扰方法同上, 干扰完成后, 从不同实验组中各吸取 20 只幼虫分别放置于 9 个独立的培养皿中 (含 20 mL AFSW) 培养 24 h 后 ($n=180$), 利用 EPI 进行变态诱导, 48 h 后统计幼虫变态率, 同时统计幼虫 14 d 内的存活率。

2 结果

2.1 厚壳贻贝 *caspase-3* cDNA 全长的克隆及序列分析

通过 RACE 克隆技术获得了一个厚壳贻贝 *caspase-3* 基因的 cDNA 全长, 序列提交于 GenBank (登录号: MZ400485)。根据已完成测序的全基因组数据, 厚壳贻贝中共有 3 个 *caspase-3*-like 基因^[26]。Blast 比较结果显示, 3 个基因分别与地中海贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 的 *Caspase 3/7-2*、*Caspase 3/7-3* 和 *Caspase 3/7-4* 高度相似, 其中, 本研究克隆的基因与地中海贻贝 *Caspase 3/7-4* 相似率达到 83.99% (Query Cover: 98%, Per Ident: 83.99%), 因此将其命名为 *McCaspase 3-4*。*McCaspase 3-4* 基因的 cDNA 全长为 1269 bp, 含一个长度为 855 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 284 个氨基酸, 另包含 86 bp 的 5' 端非编码区 (UTR) 和 328 bp 的 3' 端非编码区。根据氨基酸序列预测其蛋白分子量为 32.599 kD, 等电点为 5.11。

2.2 不同物种 *caspase-3* 蛋白的进化分析

将厚壳贻贝 *McCaspase 3-4* 蛋白序列与智人 (*Homo sapiens*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、黑腹

果蝇(*Drosophila melanogaster*)、叶吻银鲛(*Callorhynchus milii*)、玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)和地中海贻贝(*M. galloprovincialis*)caspase-3 的蛋白序列进行比较, 结果显示 *McCaspase 3-4* 与其他物种 caspase-3 一样缺乏长的前结构域(Prodomain), 但具有 P20 和 P10 这两个典型 caspase 蛋白结构域, 具有典型的 caspase-3 蛋白序列特征。 *McCaspase 3-4* 在 P20 结构域末端具有识别并降解底物的半胱氨酸活性位点(KPKIFIFQCSRR), 但是其后半部分的核心五肽活性位点 QACXG(X 为 R、Q 或 D)突变为 QC-SRR。系统进化分析结果显示, *McCaspase 3-4* 首先与无脊椎动物 caspase-3 和地中海贻贝(*M. galloprovincialis*)的 caspase 3/7 蛋白聚在一起, 然后再与 caspase 3/7-4 聚为一枝, 表明其在进化上更接近 caspase 3/7-4(图 1)。

2.3 *McCaspase 3-4* 基因在厚壳贻贝不同组织中的表达谱分析

利用 qRT-PCR 技术分析了 *McCaspase 3-4* 基因在厚壳贻贝成贝不同组织中的表达情况。结果显示, 该基因在不同组织中均有表达, 但表达水平存在差异。其中, 在外套膜和唇瓣中的表达水平显著高于其他组织($P < 0.05$), 在外套膜中表达量最高, 唇瓣中次之, 两者之间无显著差异($P < 0.05$)。肠、

鳃、性腺、消化腺、足、血细胞和闭壳肌中 *McCaspase 3-4* 基因的表达水平没有显著差异($P < 0.05$)。表达量较高的外套膜和唇瓣中该基因的表达水平分别为表达量最低的闭壳肌中的 9.34 和 7.37 倍(图 2)。

2.4 *McCaspase 3-4* 基因在幼虫变态过程中的 mRNA 表达情况

EPI 诱导眼点幼虫变态后, 幼虫在诱导早期(0—12h)未出现变态。在诱导 24—48h 后, 幼虫变态率显著增加, 并在 72—96h 后趋于平缓(图 3A)。在此情况下, *McCaspase 3-4* 基因在 EPI 诱导 6h 后表达量开始出现显著上升($P < 0.05$), 在诱导 12—24h 后出现较大幅度的上升, 并在 24h 时达到峰值, 此时表达量为初始表达量的 3.0 倍。在 EPI 诱导 48h 后, *McCaspase 3-4* 的表达量开始出现显著下降($P < 0.05$), 并在诱导 96h 后降至最低。下降过程中, EPI 诱导 48h 和 72h 后的 *McCaspase 3-4* 表达水平无显著差异($P > 0.05$; 图 3B)。

2.5 *McCaspase 3-4* 基因 RNA 干扰效果验证

由于厚壳贻贝中除了 *McCaspase 3-4* 外还存在两个 caspase-3 基因(与地中海贻贝 *Caspase 3/7-2*、*Caspase 3/7-3* 近似, 暂时将其命名为 *caspase 3-2-like* 和 *caspase 3-3-like*), 为明确 RNA 干扰结果仅特异性地对 *McCaspase 3-4* 有效, 因此通过 qRT-PCR 技

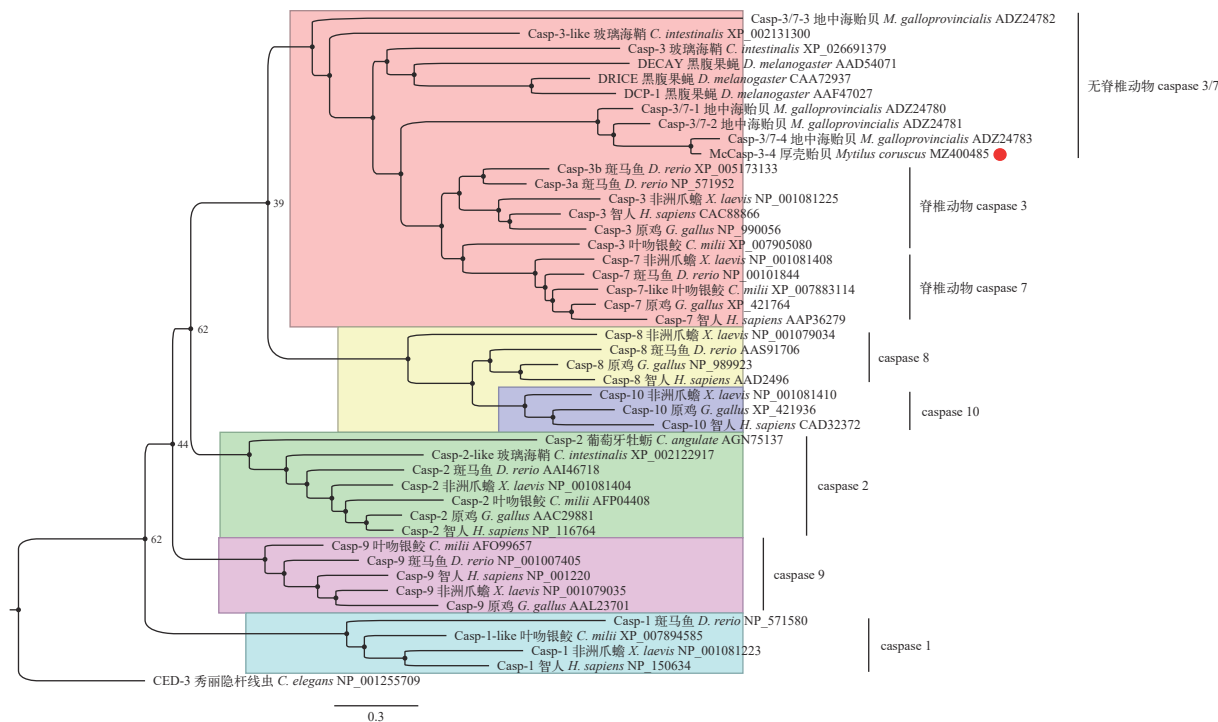


图 1 不同物种Caspase-3蛋白的系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of caspase-3 protein from different species

圆点标示的为 *McCaspase 3-4*; 系统进化树利用 PhyML 工具, 采用极大似然法构建; 标尺显示遗传距离, 分支处的数字为步长值 *McCaspase 3-4* marked with a dot. The phylogenetic tree is constructed using the maximum-likelihood method with PhyML tools. The bar indicates the distance, and the numbers at branches indicate the bootstrap values

术分别对转染*McCaspase 3-4* siRNA后眼点幼虫中*caspase 3-2-like*、*caspase 3-3-like*和*McCaspase 3-4*的mRNA表达水平进行了分析。结果显示,成功转染*McCaspase 3-4* siRNA后,眼点幼虫中的*caspase 3-2-like*和*caspase 3-3-like*的mRNA表达水平相比对照组未出现显著下降,而*McCaspase 3-4*的mRNA表达水平相较未转染siRNA的空白对照组下降了约87%,相比空白对照组和转染非目的基因siRNA的阴性对照组(NC siRNA转染)均呈现显著下降($P<0.05$;图4A—C)。与此同时,siRNA转染14d后幼虫的存活率与空白对照组相比无显著差异($P<0.05$;图4D)。上述实验结果表明,通过电穿孔法转染*McCaspase 3-4* siRNA可以特异性地敲降*McCaspase 3-4*基因的表达,对其他两个*caspase-3*基因的表达未产生影响,且对幼虫生存状况无影响,因此可用于后续进行的基因功能研究。

2.6 *McCaspase 3-4*基因干扰后对幼虫变态率的影响

实验结果显示,对照组中,EPI诱导48h后,眼点幼虫的变态率为42.2%(肾上腺素诱导,图5)。未添加siRNA的电穿孔后再加EPI(空白组电击+肾上腺素诱导)及转染非目的基因siRNA后再加EPI(NC siRNA转染+肾上腺素诱导)进行变态诱导48h后,眼点幼虫的变态率分别为29.8%和25.7%,与仅有EPI诱导的结果相比小幅度下降(图5)。转染*McCaspase 3-4* siRNA再利用EPI进行变态诱导(*Caspase 3-4* siRNA转染+肾上腺素诱导),诱导48h后眼点幼虫的变态率则为5.0%,相比未加siRNA电穿孔后再加EPI和NC siRNA转染后加EPI的对照组相比存

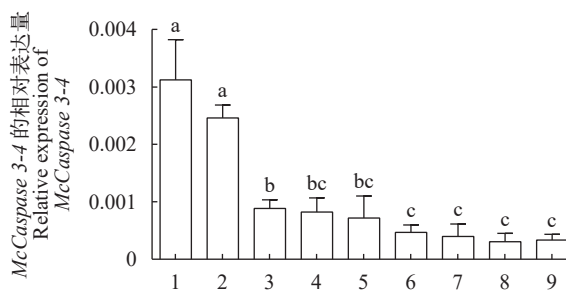


图2 厚壳贻贝成贝不同组织中*McCaspase 3-4*基因的表达水平分析

Fig. 2 Relative expression of *McCaspase 3-4* mRNA in different tissues of adult *M. coruscus*

1. 外套膜; 2. 唇瓣; 3. 肠道; 4. 鳃; 5. 性腺; 6. 消化腺; 7. 足; 8. 血细胞; 9. 闭壳肌。不同字母表示各组间存在显著差异(平均值±标准误差, $n=5$, $P<0.05$)

1. Mantle; 2. Labial palp; 3. Gut; 4. Gill; 5. Gonad; 6. Digestive gland; 7. Foot; 8. Hemocytes; 9. Adductor muscle. Bars with different letters indicate significant differences (means±SE, $n=5$, $P<0.05$)

在较大幅度的显著下降($P<0.05$;图5)。上述结果表明,敲降*McCaspase 3-4*基因的表达会显著降低眼点幼虫的变态率。

3 讨论

3.1 *McCaspase 3-4*基因的鉴定及命名

Caspase-3是执行细胞凋亡功能的核心分子之一^[5],其结构包括较短的N-端前结构域(Prodomain)、大亚基P20(分子量大小约17—20 kD)和小亚基P10(分子量大小约10—12 kD)结构域^[19]。在P20上含有蛋白活性位点QACXG五肽保守序列(X为R、Q或D)^[6]。本研究通过基因克隆得到了一个厚壳贻贝*caspase*基因的cDNA全长序列,通过氨基酸序列对比,发现其缺乏长的前结构域,具有的P20和P10结构域,因此是一个典型的*caspase-3*分子。

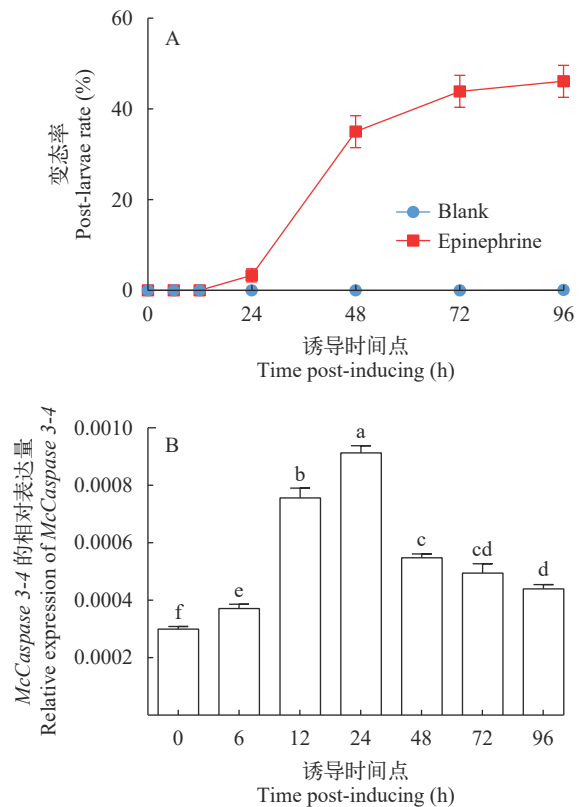


图3 肾上腺素诱导厚壳贻贝眼点幼虫不同时间后的变态率及*McCaspase 3-4* mRNA表达情况分析

Fig. 3 The metamorphosis rate and *McCaspase 3-4* mRNA expression of pediveliger after epinephrine inducing

A. 肾上腺素诱导不同时间后眼点幼虫的变态率(平均值±标准误差, $n=180$); B. 肾上腺素诱导不同时间后眼点幼虫中*McCaspase 3-4*基因的mRNA表达情况(平均值±标准误差, $n=800$)。不同字母表示各组间存在显著差异($P<0.05$)

A. The metamorphosis rate of pediveliger induced by epinephrine (means±SE, $n=180$); B. The *McCaspase 3-4* mRNA expression in pediveliger after epinephrine inducing (means±SE, $n=800$). Bars with different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

根据已有报道, 地中海贻贝(*M. galloprovincialis*)中存在*Caspase-3/7-1*、*Caspase-3/7-2*、*Caspase-3/7-3*和*Caspase-3/7-4*四个*caspase-3*基因, 厚壳贻贝中的3个*caspase-3*基因分别与*Caspase 3/7-2*、*Caspase 3/7-3*和*Caspase 3/7-4*高度相似^[26, 27]。本研究克隆的*caspase-3*基因所编码的氨基酸序列与地中海贻贝*caspase 3/7-4*分子相似度最高, 结合系统进化树中本基因与地中海贻贝*caspase 3/7-4*最终聚为一枝的结果, 表明本基因可能是地中海贻贝*caspase 3/7-4*的直系同源基因(Orthologous gene)。为保持不同*caspase-3*基因在不同贻贝物种中命名的统一性, 因此将本基因命名为*McCaspase 3-4*。

3.2 水解功能核心五肽位点突变不影响*McCaspase 3-4*的变态调控功能

与很多蛋白类似, 日常状态下的*caspase*以无活性的酶原形式贮存于细胞内, 当接收到死亡信号时, 启动*caspase*酶原通过自发的催化水解作用激活自己, 并进一步激活位于其下游的效应*caspase*^[5]。*Caspase*的水解激活需要经过两次裂解, 首先是分

离P20大亚基和P10小亚基, 然后是去除N端前结构域(Prodomain)^[28]。水解激活后的效应*caspase*会通过P20亚基末端以半胱氨酸(Cysteine)为核心的五肽活性位点QACXG识别细胞底物中的天冬氨酸并降解底物, 从而实现凋亡。本研究通过对比不同物种*caspase-3*的蛋白序列, 发现*McCaspase 3-4*蛋白的P20功能域后端虽然具有半胱氨酸活性位点KPKI-FIFQCSRR, 但该位点后部核心五肽位点QACXG中的3个氨基酸却出现了突变, 突变为QCSRR。在地中海贻贝的4个*Caspase-3/7*中, *Caspase-3/7-1*和2具有完整的QACXG五肽位点, *Caspase-3/7-3*的五肽位点为QACRT, 仅最后一个氨基酸位点发生了突变, 而*Caspase-3/7-4*的五肽位点为QCSRK, 与本研究*McCaspase 3-4*的QCSRR类似, 均为第二、三和五号位氨基酸发生突变^[27]。利用紫外线(UV)和LPS、CPGs、LTA、Poly I:C等病原相关模式分子对地中海贻贝血细胞进行刺激后的结果显示, *Caspase-3/7-3*和*Caspase-3/7-4*在紫外线刺激后的较短时间内基因表达达到峰值, 显著高于*Caspase-*

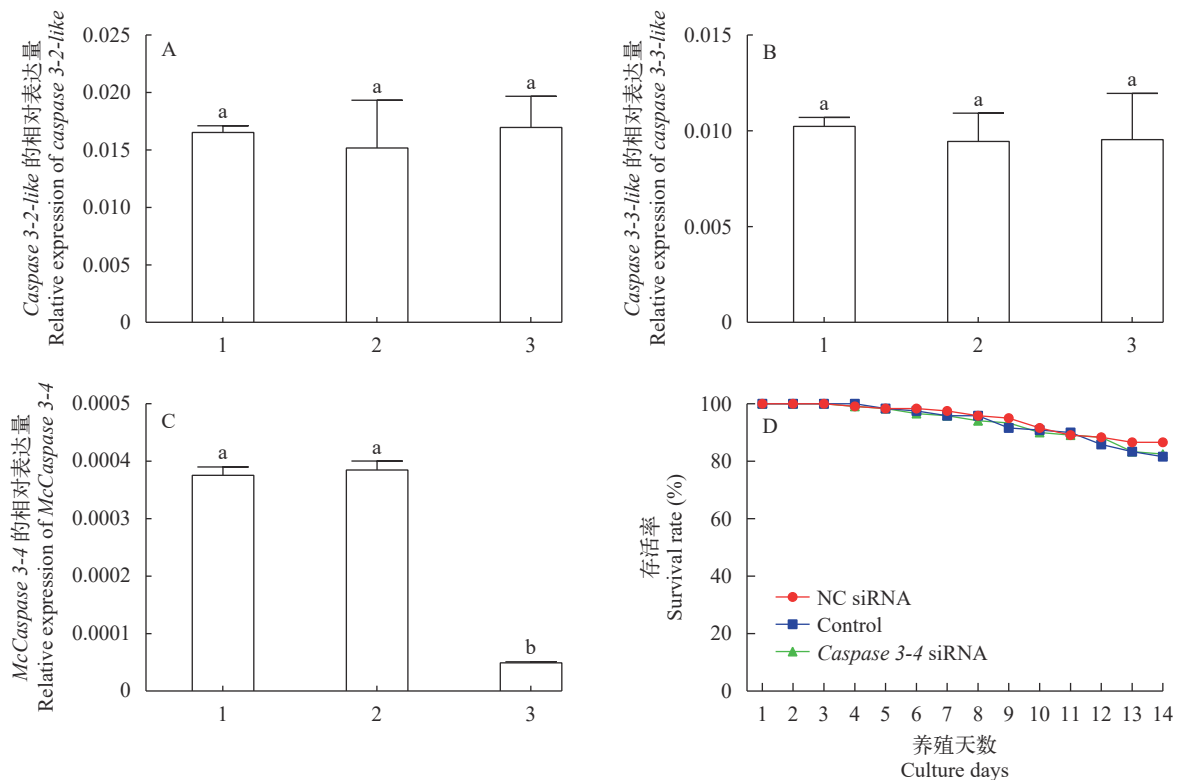


图4 RNA干扰*McCaspase 3-4*后眼点幼虫中的不同*caspase-3*基因的表达情况和存活率分析

Fig. 4 mRNA expression of different *caspase-3* genes in the pediveliger and the larval survival rates after *McCaspase 3-4* RNAi

A-C. siRNA转染48h后, 眼点幼虫中*caspase 3-2-like*、*caspase 3-3-like*和*McCaspase 3-4*的mRNA表达情况 (平均值±标准误差, $n=800$)。横坐标: 1. 空白对照组; 2. NC siRNA转染; 3. *McCaspase 3-4* siRNA转染; D. siRNA转染后不同日龄幼虫存活率($n=180$)。不同字母表示各组间存在显著差异($P<0.05$)

A-C. mRNA expression of *caspase 3-2-like*, *caspase 3-3-like* and *McCaspase 3-4* in the pediveliger at 48h after siRNA transfection (means±SE, $n=800$). 1. Untreated; 2. Non-target gene siRNA transfection; 3. *McCaspase 3-4* siRNA transfection; D. The larval survival rates on different days after siRNA transfection ($n=180$). Bars with different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

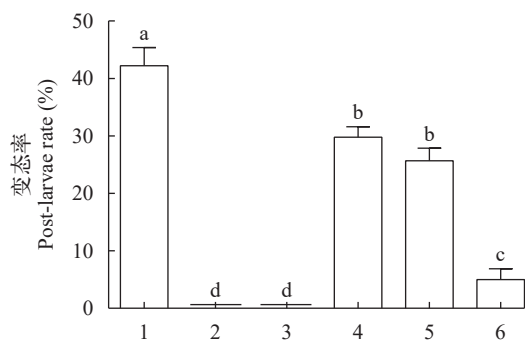


图5 RNA干扰*McCaspase 3-4* 48h后不同时间眼点幼虫的变态率

Fig. 5 Larval metamorphosis at 48h after *McCaspase 3-4* RNAi

1. 肾上腺素诱导; 2. 空白对照; 3. 空白组电击; 4. 空白组电击后加入肾上腺素进行诱导; 5. NC siRNA转染后加入肾上腺素进行诱导; 6. *Caspase 3-4* siRNA转染后加入肾上腺素进行诱导。不同字母表示各组间存在显著差异(平均值±标准误差, $n=180$, $P<0.05$)

1. Epinephrine inducing; 2. Untreated; 3. Electroporation without siRNA; 4. Epinephrine inducing after electroporation without siRNA; 5. Epinephrine inducing after non-target gene siRNA transfection; 6. Epinephrine inducing after *McCaspase 3-4* siRNA transfection. Bars with different letters indicate significant differences (means±SE, $n=180$, $P<0.05$)

3/7-1和*Caspase-3/7-2*, 表明这两个基因在紫外线诱导细胞凋亡中可能具有较为重要的作用^[27]。而在不同细菌病原相关模式分子刺激后, *Caspase-3/7-3*和*Caspase-3/7-4*的表达量却没有如*Caspase-3/7-1*和*Caspase-3/7-2*一般出现显著上调, 提示仅*Caspase-3/7-1*和*Caspase-3/7-2*在免疫应答引发的细胞凋亡过程中发挥了主要作用^[27]。上述结论表明, 虽然*Caspase-3/7-3*和*Caspase-3/7-4*的五肽核心活性位点发生了突变, 但其仍然具有凋亡活性, 不同*caspase 3*可能在不同条件引发的细胞凋亡过程中发挥作用。因此, 这可能也是*McCaspase 3-4*的五肽位点出现突变后仍然具有幼虫变态调控功能的原因。然而, 是什么原因导致该位点发生突变, 为什么突变后仍可以执行细胞凋亡和变态调控的功能, 以及发生突变裂解底物是否发生了变化, 仍值得进一步深入探讨。

3.3 *caspase-3*在贝类免疫及纤毛更替过程中具有潜在功能

基于不同物种中的研究显示, *caspases*基因在动物的不同组织中均有表达^[18, 27, 29, 30]。在本研究中, *McCaspase 3-4*在厚壳贻贝的各个组织器官中均有表达, 表明该基因在厚壳贻贝体内同样有广泛分布。海洋贝类中的研究显示, 在福建牡蛎(*C. angulata*)和太平洋牡蛎(*C. gigas*)成贝中, *caspase-3*基因在鳃和唇瓣上的表达量最高, 外套膜次之^[17, 18]。由

于鳃和唇瓣都是贝类在生存过程中直接接触外界环境的组织器官, 更容易受到病原体的侵入和损伤, 表明*caspase-3*在贝类中可能同样参与免疫反应^[18]。此外, 地中海贻贝(*M. galloprovincialis*)和杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)中的研究表明, *caspase*参与宿主的免疫防御^[27, 31]。本研究中, *McCaspase 3-4*在外套膜和唇瓣中的表达较高, 且显著高于闭壳肌、肠和消化腺等其他组织器官。外套膜和唇瓣是厚壳贻贝直接接触外界环境的组织, *McCaspase 3-4*在这两种组织中的高表达, 提示该基因可能在机体免疫过程中发挥作用, 但是由于唇瓣作为贝类辅助摄食器官, 其上面的纤毛需要不断更新, 在此过程中可能也需要*caspase*参与, 因此*McCaspase 3-4*是否真正参与机体免疫过程, 仍需更多深入研究。

3.4 *caspase-3*介导下的细胞凋亡在贝类变态过程中的作用

附着变态是双壳贝类幼虫发育中的重要阶段, 肾上腺素(EPI)是能够诱导厚壳贻贝眼点幼虫变态的神经递质之一^[32]。本研究通过EPI诱导了厚壳贻贝眼点幼虫变态, 结果表明, 诱导24h后眼点幼虫开始出现变态, 诱导48h后变态进入高峰期。与幼虫变态时间相比, *McCaspase 3-4*在EPI诱导12h后开始出现显著高表达, 在诱导24h后表达量达到最高。该结果与*caspase-3*基因在福建牡蛎(*C. angulata*)和太平洋牡蛎(*C. gigas*)幼虫变态过程中的表达情况类似^[17, 18]。在福建牡蛎中, *caspase-3*基因在附着开始后6h达到显著高表达, 而在太平洋牡蛎中, *caspase-3*基因CgCASP-3同样在幼虫附着后6h开始显著高表达, 并在附着12—24h后表达量达到最高^[17, 18]。将该结果与EPI诱导后幼虫的变态时间相比, 一方面表明*McCaspase 3-4*可能参与了眼点幼虫的变态, 另一方面也表明在幼虫变态过程中, 细胞凋亡的发生应该早于变态表型的出现。

迄今为止, 已有证据表明*caspase-3*及其介导下的细胞凋亡参与调控动物的变态发育。例如, 细胞凋亡在非洲爪蟾(*X. laevis*)的尾部退化、肠道和皮肤重塑等变态过程中均起到重要作用^[10, 11]; 细胞凋亡参与调控玻璃海鞘(*C. intestinalis*)幼虫变态过程中的尾部退化^[13, 14]; 细胞凋亡在昆虫幼虫变态时唾液腺、丝腺、中肠和脂肪体的退化, 以及触角侧枝的形成中起关键作用^[12, 28]。然而, 针对细胞凋亡参与海洋贝类变态过程的研究却仍然较为薄弱, 在福建牡蛎(*C. angulata*)、太平洋牡蛎(*C. gigas*)和文蛤(*M. meretrix*)中的研究结果显示, *caspase-3*基因在眼点幼虫变态时的表达量显著高于其他幼虫期, 原位杂交结果显示变态时*caspase-3*主要分布于足和面

盘上, 暗示*caspase-3*参与变态时足和面盘的变化^[17-19]。本研究通过siRNA转染成功敲降了*McCaspase 3-4*基因的表达, 结果显示, 干扰*McCaspase 3-4*后的眼点幼虫变态率显著减少, 较为充分地证明了*McCaspase 3-4*参与调控眼点幼虫的变态。

本研究获取了厚壳贻贝*McCaspase 3-4*基因的cDNA全长, 通过分析各组织和眼点幼虫变态过程中*caspase-3*的基因表达情况, 推测该基因可能参与厚壳贻贝眼点幼虫的变态。siRNA转染干扰*McCaspase 3-4*基因表达的结果进一步表明, *McCaspase 3-4*基因在幼虫变态发育中发挥着重要的调控作用。

参考文献:

- [1] Opferman J T, Korsmeyer S J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system [J]. *Nature Immunology*, 2003, **4**(5): 410-415.
- [2] Jacobson M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development [J]. *Cell*, 1997, **88**(3): 347-354.
- [3] Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases [J]. *Oncogene*, 2003, **22**(53): 8543-8567.
- [4] Boatright K M, Salvesen G S. Mechanisms of caspase activation [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003, **15**(6): 725-731.
- [5] Kumar S. Caspase function in programmed cell death [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2007, **14**(1): 32-43.
- [6] Nicholson D. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death [J]. *Cell Death & Differentiation*, 1999, **6**(11): 1028-1042.
- [7] Earnshaw W C, Martins L M, Kaufmann S H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1999(68): 383-424.
- [8] Fuentes-Prior P, Salvesen G S. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition [J]. *The Biochemical Journal*, 2004, **384**(Pt 2): 201-232.
- [9] Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development [J]. *Nature*, 2000, **407**(6805): 796-801.
- [10] Nakajima K, Fujimoto K, Yaoita Y. Programmed cell death during amphibian metamorphosis [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2005, **16**(2): 271-280.
- [11] Du Pasquier D, Rincheval V, Sinzelle L, et al. Developmental cell death during *Xenopus* metamorphosis involves BID cleavage and caspase 2 and 8 activation [J]. *Developmental Dynamics*, 2006, **235**(8): 2083-2094.
- [12] Bao X Y, Chen P, Liu T H, et al. Advances in apoptosis-related genes in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, **60**(4): 487-498. [包希艳, 陈鹏, 刘太行, 等. 家蚕凋亡相关基因研究进展 [J]. 昆虫学报, 2017, **60**(4): 487-498.]
- [13] Comes S, Locascio A, Silvestre F, et al. Regulatory roles of nitric oxide during larval development and metamorphosis in *Ciona intestinalis* [J]. *Developmental Biology*, 2007, **306**(2): 772-784.
- [14] Krasovec G, Robine K, Quéinnec E, et al. Ci-hox12 tail gradient precedes and participates in the control of the apoptotic-dependent tail regression during *Ciona* larva metamorphosis [J]. *Developmental Biology*, 2019, **448**(2): 237-246.
- [15] Suzanne M, Steller H. Shaping organisms with apoptosis [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2013, **20**(5): 669-675.
- [16] Kumar S, Doumanis J. The fly caspases [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2000, **7**(11): 1039-1044.
- [17] Yang B, Li L, Pu F, et al. Molecular cloning of two molluscan caspases and gene functional analysis during *Crassostrea angulata* (Fujian oyster) larval metamorphosis [J]. *Molecular Biology Reports*, 2015, **42**(5): 963-975.
- [18] Qu T, Huang B, Zhang L, et al. Identification and functional characterization of two executioner caspases in *Crassostrea gigas* [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(2): e89040.
- [19] Wang X M, Liu B Z, Xiang J H. Apoptosis and role of caspase in development of *Meretrix meretrix* larvae [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, **40**(2): 181-186. [王晓梅, 刘保忠, 相建海. 文蛤(*Meretrix meretrix*)幼虫发育过程中细胞凋亡和Caspase功能分析 [J]. 海洋与湖沼, 2009, **40**(2): 181-186.]
- [20] Yang J L, Li S H, Liu Z W, et al. Primary study on neuronal development of the embryo and early larvae of the mussel *Mytilus coruscus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, **37**(4): 512-519. [杨金龙, 李树恒, 刘志伟, 等. 厚壳贻贝胚胎和早期幼虫神经系统发育的初步研究 [J]. 水产学报, 2013, **37**(4): 512-519.]
- [21] Yang J L, Li S H, Li Y F, et al. Effects of neuroactive compounds, ions and organic solvents on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* [J]. *Aquaculture*, 2013, **396/397/398/399**: 106-112.
- [22] Li Y F, Cheng Y L, Chen K, et al. Thyroid hormone receptor: a new player in epinephrine-induced larval metamorphosis of the hard-shelled mussel [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, **287**: 113347.
- [23] Yang J L, Li Y F, Bao W Y, et al. Larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 in response to neurotransmitter blockers and tetraethylammonium [J]. *Biofouling*, 2011, **27**(2): 193-199.
- [24] Lefort V, Longueville J, Gascuel O. SMS: smart model selection in PhyML [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, **34**(9): 2422-2424.
- [25] Liang X, Chen K, Li Y F, et al. An $\alpha 2$ -adrenergic receptor is involved in larval metamorphosis in the mussel, *Mytilus coruscus* [J]. *Biofouling*, 2019, **35**(9): 986-996.
- [26] Yang J L, Feng D D, Liu J, et al. Chromosome-level genome assembly of the hard-shelled mussel *Mytilus coruscus*, a widely distributed species from the temperate areas

- of East Asia [J]. *GigaScience*, 2021, **10**(4): giab024.
- [27] Romero A, Estévez-Calvar N, Dios S, *et al.* New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis* [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(2): e17003.
- [28] Cooper D M, Granville D J, Lowenberger C. The insect caspases [J]. *Apoptosis*, 2009, **14**(3): 247-256.
- [29] Reis M I R, Nascimento D S, do Vale A, *et al.* Molecular cloning and characterisation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) caspase-3 gene [J]. *Molecular Immunology*, 2007, **44**(5): 774-783.
- [30] Mu Y, Xiao X, Zhang J, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of caspase 9 in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, **34**(3): 300-307.
- [31] Huang W B, Ren H L, Gopalakrishnan S, *et al.* First molecular cloning of a molluscan caspase from variously colored abalone (*Haliotis diversicolor*) and gene expression analysis with bacterial challenge [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, **28**(4): 587-595.
- [32] Wang C, Bao W Y, Gu Z Q, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to natural biofilms [J]. *Biofouling*, 2012, **28**(3): 249-256.

MOLECULAR CLONING OF MCCASPASE 3-4 AND ITS FUNCTIONS IN MYTILUS CORUSCUS LARVAL METAMORPHOSIS

LIU Zhi-Xian^{1,2}, LI Jia-Zheng^{1,2}, LIANG Lin-Li^{1,2}, FENG Dan-Dan^{1,2}, LIANG Xiao^{1,2},
YANG Jin-Long^{1,2,3} and ZHU You-Ting^{1,2}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory, Guangzhou 511458, China)

Abstract: As an essential way to remove redundant tissues or cells, apoptosis plays a crucial role in regulating the metamorphosis of vertebrates and insects. However, little is known about the function of apoptosis and its executioner genes caspase-3 in the metamorphosis of marine mollusks. In the present work, a full-length caspase-3 cDNA had 1269 bp full length and 855 bp sequences of Open Reading Frame (ORF), which coded a polypeptide of 1486 amino acids, was cloned from the *Mytilus coruscus*. It encodes a predicted protein containing conserved caspase p20 and p10 domains and has the caspase family cysteine active site (KPKIFIFQCSRR) in the p20 domains. However, compared with conserved caspase 3 in other species, three amino acids sites of the pentapeptide active motif (QACXG, where X is R, Q, or D) at the end of the cysteine active site is mutated. Multi-sequence alignment and phylogenetic analysis showed that this gene had the highest similarity with the *Caspase 3/7-4* gene in *Mytilus galloprovincialis* and was named *McCaspase 3-4*. The mRNA expression level of *McCaspase 3-4* in different tissues of the adult and larval metamorphosis were analyzed by real-time quantitative PCR. Results showed that *McCaspase 3-4* mRNA expression in the mantle and labial palp was significantly higher than that in other tissues and was 9.34 and 7.37 times higher than that in the adductor muscle, which had the lowest expression level, suggesting this gene might be involved in host immune defense or tissue renewal and repair of labial palp. The *McCaspase 3-4* mRNA expression also increased at 12 to 24h after the epinephrine inducing and peaked at 24h after inducing when the expression level was 3.0 times higher than that at 0h, indicating the *McCaspase 3-4* might play a role in the early stage of larval metamorphosis (larval metamorphosis usually begin at 48 to 72h after epinephrine inducing). Furthermore, after the pediveligers were transfected with the specific *McCaspase 3-4* siRNA by electroporation, the metamorphosis rate of pediveligers at 48h induced by epinephrine was decreased to 5%, which were significantly lower than the epinephrine inducing after non-target gene siRNA transfected group (25.7%). These results indicated that although the pentapeptide active motif of *McCaspase 3-4* is mutated, this molecular still has the function of metamorphosis regulation and plays a role in the early stage of larval metamorphosis. However, we do not know whether the active site mutation will affect its metamorphosis regulation effect. These results will contribute to understanding the role of apoptosis in mussel larval metamorphosis and the molecular mechanism of marine mollusks' metamorphosis.

Key words: Apoptosis; Caspase-3; Tissue expression; Larval metamorphosis; *Mytilus coruscus*