

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210827002

http://www.yykxjz.cn/

公洁, 祝孟茹, 占铭, 席昌俊, 神国卿, 水燕, 徐增洪, 沈怀舜. 克氏原螯虾细胞色素 c 基因通过调节凋亡途径抑制 WSSV 感染. 渔业科学进展, 2023, 44(1): 137-146

GONG J, ZHU M R, ZHAN M, XI C J, SHEN G Q, SHUI Y, XU Z H, SHEN H S. Cytochrome c gene in *Procambarus clarkii* inhibits WSSV infection by regulating the apoptosis pathway. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(1): 137-146

# 克氏原螯虾细胞色素 c 基因 通过调节凋亡途径抑制 WSSV 感染\*

公洁<sup>1,2</sup> 祝孟茹<sup>1,2</sup> 占铭<sup>1,2</sup> 席昌俊<sup>1,2</sup>  
神国卿<sup>1,2</sup> 水燕<sup>2</sup> 徐增洪<sup>2</sup> 沈怀舜<sup>1,2①</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 江苏 南京 210000;

2. 中国水产科学研究院淡水研究中心淡水渔业与种质资源利用重点实验室 江苏 无锡 214000)

**摘要** 细胞凋亡是由一系列相关基因严格调控的细胞程序性死亡,在抵御病原入侵、维持机体内环境稳态等方面有着重要意义。其中细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质中是凋亡开始的关键一步。本研究利用 RACE 技术首次克隆获得了克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)细胞色素 c 基因(*PcCytc*),全长为 897 bp,包括 163 bp 的 5'-UTR、419 bp 的 3'-UTR 和 315 bp 的开放阅读框,编码 104 个氨基酸。定量 PCR 检测结果显示,*PcCytc* 基因在克氏原螯虾的各组织中均有表达,其中在鳃、肠道和肌肉中表达高,在胃中表达最低。WSSV 感染实验显示,在病毒感染后 *PcCytc* 在肝胰腺、肠道和肌肉组织中的表达水平均出现上调,并在 24 h 达最高值,约是此时 PBS 组表达量的 2.65、2.07 和 2.20 倍,均存在极显著性差异( $P<0.01$ )。*PcCytc* 基因干扰后,克氏原螯虾体内 WSSV 病毒拷贝数显著增加( $P<0.05$ ),表明 *PcCytc* 能够抑制 WSSV 在克氏原螯虾体内的复制,延迟感染;同时,凋亡相关基因 *bcl-2*、*bax* 和 *caspase-3* 的表达均发生显著上调或下调( $P<0.05$ )。本研究表明, *PcCytc* 可通过调节凋亡途径抑制 WSSV 感染,为克氏原螯虾对 WSSV 感染的免疫反应提供了新的见解。

**关键词** 克氏原螯虾; 细胞色素 c; 凋亡; WSSV 感染; RNA 干扰

中图分类号 S966.12 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)01-0137-10

细胞色素 c (cytochrome c, Cytc)是一种可溶性氧化还原活性血红素蛋白。作为线粒体呼吸链(mitochondrial respiratory chain, MRC)中传递电子的载体,影响 ATP 的产生。Cytc 缺失或功能失调会引起线粒体呼吸链功能异常,ATP 缺乏,导致细胞死亡。正常状态下 Cytc 位于线粒体内膜,参与电子传递,当细胞受凋亡信号刺激后便从线粒体释放至细胞质(Welchen *et al*,

2016)。Cytc 在被释放到细胞质之后,与凋亡酶激活因子 1 (Apaf-1)形成凋亡小体,促进 caspases-9 前体的自身活化,并触发 caspase 级联反应导致细胞凋亡(Chereau *et al*, 2005)。Cytc 还可以通过干扰电子传递,阻断能量合成,促进自由基产生等方式参与细胞凋亡过程(Huettemann *et al*, 2011、2012)。

细胞凋亡是由一系列相关基因严格调控的细胞

\* 江苏省自然科学基金面上项目(BK20181138)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2019JBFZ09)共同资助。

公洁, E-mail: 446606074@qq.com

① 通信作者: 沈怀舜, 教授, E-mail: shenhuaishun@ffrc.cn

收稿日期: 2021-08-27, 收修改稿日期: 2021-09-27

程序性死亡,在抵御病原入侵、维持机体内环境稳态等方面有着重要意义(Elmore, 2007)。在对哺乳动物细胞凋亡的研究中,普遍认为 Cytc 从线粒体释放到细胞质中是凋亡开始的关键一步(Adrain *et al*, 2000)。对鳞翅目昆虫 Cytc 与细胞凋亡的研究结果与哺乳动物类似,都认为 Cytc 在调节细胞凋亡中起着关键作用(Liu *et al*, 2012)。随着对 Cytc 在细胞凋亡和免疫方面的不断深入研究,越来越多证据表明 Cytc 能够参与病毒感染诱导的细胞凋亡。白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)刺激可诱导凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肝胰腺和血细胞中 Cytc 基因的表达(Hu *et al*, 2016)。赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)神经坏死病毒(RGNNV)诱导的石斑鱼肝细胞凋亡与 Cytc 释放相关(Chen *et al*, 2007)。在无脊椎动物中,He 等(2015)研究发现,家蚕(*Bombyx mori*)微孢子虫感染宿主 BMC 细胞后通过下调 *Apaf-1* 和 Cytc 的表达抑制细胞凋亡,为自身生存创造最佳环境。家蚕 Cytc 基因能通过介导线粒体通路诱导细胞凋亡参与家蚕核型多角体病毒(BmNPV)应答(Wang *et al*, 2019)。克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)是我国主要的水产经济物种,病害的发生尤其是 WSSV 引起的暴发性疾病制约着克氏原螯虾养殖业健康发展(郝晨光, 2020; 徐日俊等, 2020)。然而,尽管 Cytc 在细胞凋亡和能量代谢中发挥重要作用,但对 Cytc 介导的细胞凋亡在克

氏原螯虾 WSSV 病毒感染中的作用目前还未见报道。

鉴于细胞凋亡在机体免疫方面的重要作用,本研究克隆克氏原螯虾凋亡细胞色素 c 基因(*PcCytc*)全长,分析 *PcCytc* 在克氏原螯虾各组织中的表达情况,并通过 RNA 干扰技术探究 *PcCytc* 在 WSSV 感染过程中参与细胞凋亡的机制。以期更深入地了解凋亡相关因素在克氏原螯虾免疫反应中的潜在作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究所用克氏原螯虾取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心扬中实验基地。选取体重为 20 g 左右的克氏原螯虾,在实验室水族箱暂养 1 周,养殖温度为 24~27℃。1 周后,随机选取健康完整的雌雄对虾各 3 尾,分别取其肝胰腺、鳃、肠、胃、淋巴、心脏、肌肉、眼柄神经组织,并将 3 尾虾的同种组织样品混合于 1 管,立即置于-80℃保存。

### 1.2 引物设计

根据实验室转录组数据得到的部分 Cytc 基因保守序列,通过 Primer-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)设计 *PcCytc* 的上下游引物(表 1),并委托苏州金唯智公司合成。

表 1 实验中所用引物序列  
Tab.1 Sequences of primers used in this study

引名称物 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>PcCytc</i> -GSP5-1	AGGTTGGGTCCAGTCT	5' RACE
<i>PcCytc</i> -GSP5-2	TGCTTGCCGTCTGCTTCA	
<i>PcCytc</i> -GSP3-1	ACACTGATGCCAACAAGGCCAAGG	3' RACE
<i>PcCytc</i> -GSP3-2	CCCAAGAAGTTTATTCCAGGCACA	
Q- <i>PcCytc</i> -F	TCGCTTGCTCTACTTGGTGG	定量 Quantitative
Q- <i>PcCytc</i> -R	AGCACAAGACTGGACCCAAC	
β-actinF	GCATCCACGAGACCACTTACA	定量内
β-actinR	CTCCTGCTTGCTGATCCACATC	Quantitative internal
ds <i>PcCytc</i> -F	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGCACAAGACTGGACCCAAC	RNA 干扰
ds <i>PcCytc</i> -R	GCAATCAAGTCTGCACGCTCGGGATACTACTCAGCATAATCACTAG	RNA interference
dsGFP-F	GCGTAATACGACTCACTATAGGTGGTCCCAATTCTCGTGGAAC	
dsGFP-R	GCGTAATACGACTCACTATAGGCTTGAAGTTGACCTTGATGCC	
Q-WSSV-F	GCTGGCAAATCTTCCACCA	WSSV 定量
Q-WSSV-R	CCACAAAAGACTGGGATGGC	WSSV Quantitative
Q-bcl2-F	TCGACGGGATGGTAAATCGG	定量 Quantitative
Q-bcl2-R	AGGCAAAAAGTCCAAACGG	
Q-bax-F	TCGACGGGATGGTAAATCGG	
Q-bax-R	AGGCAAAAAGTCCAAACGG	
Q-caspase3-F	CGATAGGCTTCCCAACCAAGG	
Q-caspase3-R	GTCCTCCTGTATGCTGTCCG	

### 1.3 提取总 RNA 和基因克隆

用 Trizol 提取总 RNA, 提取的 RNA 浓度和纯度用微型紫外分光光度计(Q5000)测定, RNA 产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳确定完整性。使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (索莱宝)合成用于 RACE (rapid amplification of cDNA ends)的模板 cDNA。

RACE 降落 PCR 技术和半巢式 PCR 技术分别用于扩增 *PcCytc* 的 3'端和 5'端。实验所用引物见表 1。第 1 次扩增反应以 3'-、5'-cDNA 为模板进行, 第 2 次扩增反应以对应的第 1 次扩增反应产物稀释 10 倍为模板。用 SanPrep Column DNA Gel Extraction Kit (生工, 上海)纯化扩增的 DNA 片段。纯化后的 DNA 与 pMD18T 连接, 之后转入冰上融化的 DH5 $\alpha$  感受态细胞过夜培养, 筛选阳性单克隆并进行菌落 PCR 鉴定, 将含有目的基因的菌液测序(生工, 上海)。成功获得 5'和 3'端序列, 然后, 通过 DNASTAR 软件进行拼接, 最终获得 *PcCytc* 的 cDNA 全长序列。

### 1.4 生物信息学分析

根据基因测序结果, 使用 NCBI 中的 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 寻找基因序列的开放阅读框(ORF), 并翻译其编码的氨基酸序列; 氨基酸同源性通过 DNAMAN V.9 软件进行比较; 然后通过 ExPASy (<http://www.expasy.org>)和 Signal P3.0 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)分析蛋白质的理化性质和信号肽的存在。跨膜结构域由 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)预测。此外, 使用在线工具 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>)通过同源建模方法模拟蛋白质的三维结构; 使用 Mafft 和 MEGA 10.0 软件基于 NJ 方法构建系统发育树。

### 1.5 *PcCytc* 的表达分析

为了分析基因在不同组织中的分布和表达模式, 使用 HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (诺唯赞, 南京)将总 RNA 反转录为第一链 cDNA。以上述所制备的 cDNA 为样品, 浓度稀释到(55 $\pm$ 2) ng/ $\mu$ L, 使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行荧光定量 PCR。每个样品均设 3 个重复, 以  $\beta$ -actin 为内参基因。实验所用引物见表 1。反应体系为 20  $\mu$ L: 1  $\mu$ L 模板 cDNA, 0.8  $\mu$ L 上游引物, 0.8  $\mu$ L 下游引物, 10  $\mu$ L ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 7.4  $\mu$ L ddH $_2$ O。反应程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。计算方法采用 2 $^{-\Delta\Delta Ct}$  法。

### 1.6 WSSV 感染实验

实验开始前, 在 200 尾克氏原螯虾中随机选取 20 尾, 经检测均为 WSSV 阴性。之后, 选取 100 尾平均体重为 20 g 的健康克氏原螯虾, 用于攻毒实验。将实验虾随机分为 2 组, 每组 50 尾, 分别于第 2 腹节注射 PBS 和 WSSV。对照组注射 100  $\mu$ L 无菌磷酸盐(PBS, pH7.4), 实验组注射 100  $\mu$ L WSSV (1.0 $\times$ 10 $^8$  拷贝数/mL)。在注射后 0、6、12、24、48 和 96 h, 分别随机选取 3 尾完整、健康的克氏原螯虾, 取其肝胰腺、肠道和肌肉组织, 立即置于-80 $^{\circ}$ C 保存。用 qRT-PCR 检测各组织中 *PcCytc* 在不同时间的表达量, 具体步骤同 1.5 所述。该实验同时设置 3 个平行。

### 1.7 RNA 干扰(RNA interfere, RNAi)实验

以普通 cDNA 为模板, 经 EX-Taq 酶扩增获得含有 T7 启动子的 DNA 模板, 并用 1.2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。按照 T7 RNAi Transcription Kit (诺唯赞, 南京)试剂盒说明书合成 dsRNA, 并用同样的方法合成 dsGFP。按照 5~8  $\mu$ g/g 虾的比例注射 dsRNA。注射实验分为 3 组, 分别为注射 PBS 组、注射 dsGFP 组和注射 dsCytc 组, 每组 3 个平行, 各 50 尾克氏原螯虾。分别于注射后 24、48、72、96 和 120 h 取肌肉, 提取总 RNA, 用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测干扰效率, 并在干扰效率最强时间段内注射 WSSV。以  $\beta$ -actin 为内参测定 *PcCytc* 的相对 mRNA 水平。

为分析 *PcCytc* 对 WSSV 感染过程的调控作用, 将克氏原螯虾分为 4 组: dsCytc+WSSV 组、dsGFP+WSSV 组、WSSV 组和 PBS 组, 每组 3 个平行, 每个平行 50 尾克氏原螯虾。dsCytc+WSSV 组和 dsGFP+WSSV 组在分别注射上述剂量 dsRNA 24 h 后, 注射 100  $\mu$ L WSSV (1.0 $\times$ 10 $^8$  拷贝数/mL), 并同时注射 WSSV 组。分别于注射 WSSV 后的 0、24、48 和 72 h 采集各组 3 只克氏原螯虾的肌肉, 提取 DNA, 并将 24 h 时采集的肌肉提取 RNA。将提取的 DNA 进行荧光定量 PCR 检测, 并根据 WSSV 标准曲线的线性方程( $Y=-3.715x+41.983$ ,  $R^2=0.9966$ )和  $C_t$  值计算出每 1 mg 组织 WSSV 病毒的拷贝数。提取的 RNA 通过 qRT-PCR 检测凋亡相关基因的表达水平。RNA 的提取、cDNA 的制备以及定量实验同 1.3 和 1.5 所述。

### 1.8 统计分析

所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD,  $n=3$ )表示, 并使用 SPSS 25.0 进行显著性分析, 显著水平设为

$P < 0.05$  和  $P < 0.01$ 。使用 GraphPad Prism 8.0.1 和 Origin 2018 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PcCytc* 的序列分析

*PcCytc* 基因全长为 897 bp, 包括 163 bp 的 5'-UTR、419 bp 的 3'-UTR 和 315 bp 开放阅读框, 编码 104 个氨基酸(图 1A)。ExPASy Prot-Param 预测其分子量为 11.49 kD, 理论等电点为 9.49。SMART 程序对蛋白质结构域的预测表明,*PcCytc* 无信号肽, 无跨膜结构;

共有 5 个磷酸化位点, 其中丝氨酸位点 1 个, 苏氨酸位点 1 个, 酪氨酸位点 3 个。*PcCytc* 在 4~103 位置包含 1 个典型的 Cytochrom\_C 结构域。三级结构图展示了 *PcCytc* 的 N 端和 C 端(图 1B)。

利用 NCBI BLASTP 对 *PcCytc* 基因进行同源性比较, 结果显示, *PcCytc* 基因与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、日本对虾(*Penaeus japonicus*)、凡纳滨对虾等物种具有较高的氨基酸序列同源性, 分别为 89.42%、84.62%和 84.47%(图 1C)。系统进化树中, *PcCytc* 基因与三疣梭子蟹聚为一支, 所有甲壳类聚为一大支, 其他物种聚为一大支(图 1D)。

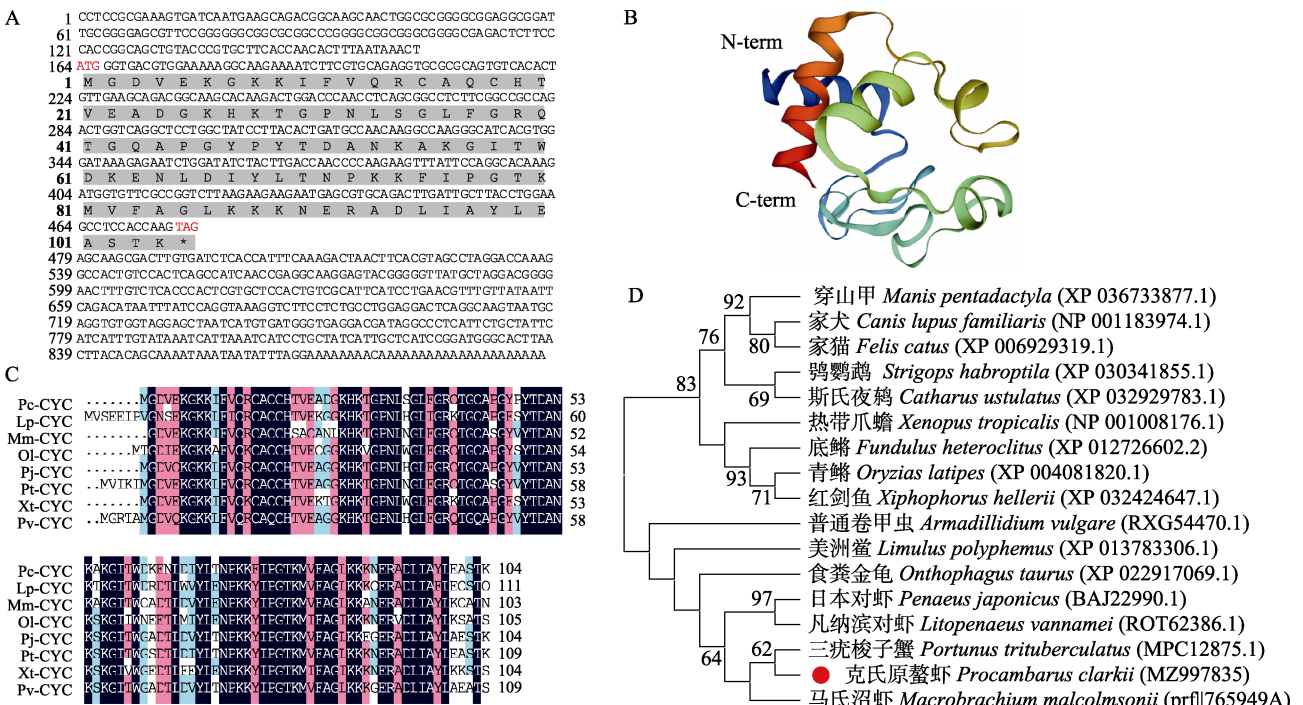


图 1 *PcCytc* 基因生物信息学分析  
Fig.1 Bioinformatics analysis of *PcCytc*

A: *PcCytc* 基因核苷酸及推导氨基酸序列, 红色标出的为起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG), 灰色部分序列为 Cytochrom-C 结构域对应的氨基酸序列; B: *PcCytc* 蛋白三级结构; C: *PcCytc* 与其他物种 *Cytc* 的氨基酸序列多重比对; D: *PcCytc* 系统发育进化树

A: Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of gene *PcCytc*, the red marks the start codon (ATG) and the stop codon (TAG), the gray part of the sequence is the Cytochrom-C domain corresponding to the cDNA sequence; B: The tertiary structure of *PcCytc*; C: Multiple alignment of the amino acid sequences of *PcCytc* and *Cytc* of other species; D: Phylogenetic tree of *PcCytc*

### 2.2 *PcCytc* 在不同组织中的表达

应用 qRT-PCR 技术, 探讨 *PcCytc* 在克氏原螯虾肝胰腺、鳃、心、肠道、胃、眼柄、肌肉和血淋巴等组织中的表达差异。如图 2 所示, *PcCytc* 基因在所有组织中均有表达, 而且主要在鳃和肠中表达, 在胃中

表达最低。鳃中表达量为胃中表达量的 9.46 倍。其次在肠道和肌肉中表达也较高, 分别为胃表达量的 8.65 和 7.88 倍。

### 2.3 *PcCytc* 在 WSSV 刺激下的表达变化

在肠道、肝胰腺和肌肉中(图 3), 相比于 PBS 组,

注射 WSSV 组 *PcCytc* 的表达水平在前 24 h 呈不断上调趋势, 并在 24 h 达最高值, 分别约为此时 PBS 组表达量的 2.65、2.07 和 2.20 倍, 均存在极显著性差

异( $P<0.01$ ), 之后表达水平开始下调, 直到 96 h 恢复至正常水平, 整体表现为诱导表达模式。在 48 h 时, 尽管注射 WSSV 组肝胰腺和肌肉中 *PcCytc* 的表达水平有所下调, 但仍分别为此时 PBS 组表达量的 2.39 和 2.17 倍, 存在显著差异( $P<0.05$ )。

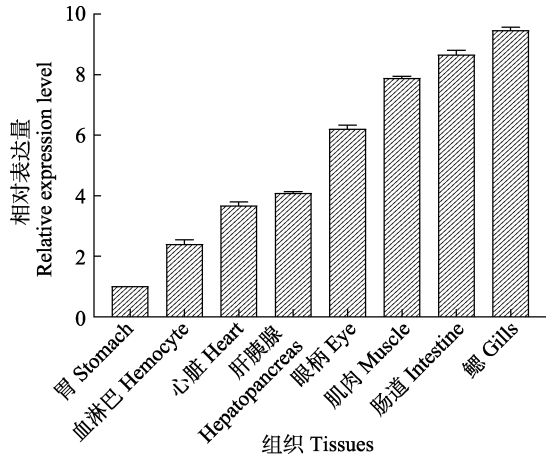


图 2 *PcCytc* 在各组织的相对表达量

Fig.2 Relative expression level of *PcCytc* in different tissues

### 2.4 *PcCytc* 基因 RNAi 后的相关表达分析

考虑到实验中 dsRNA 和 WSSV 需要肌肉注射 (注射部位会影响 RNA 干扰效率), 且肌肉中 *PcCytc* 表达量较高 (史晓丽等, 2018; 范红弟等, 2020), 基因干扰后选择肌肉继续后续的定量研究。在 RNA 干扰后 24、48、72、96 和 120 h 进行 *PcCytc* 基因的 qRT-PCR 检测, 验证干扰效率。以未注射组为对照, 如图 4 所示, 在注射后 24、48、72、96 和 120 h ds*Cytc* 组克氏原螯虾体内 *PcCytc* 的表达量分别为未注射组的 59.9%、30.5%、40.5%、73.0% 和 91.5%。说明 *PcCytc* 的干扰效率明显, 而且在注射后 48 h 和 72 h 内干扰效率最强。

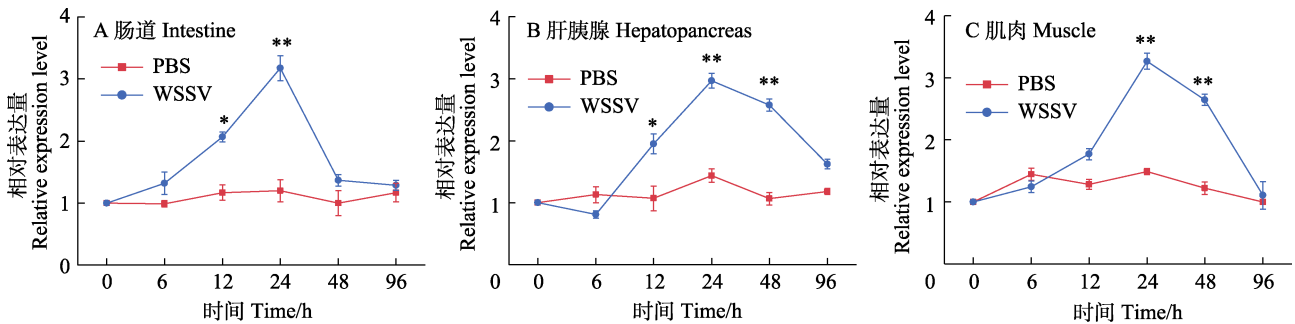


图 3 克氏原螯虾肠道(A)、肝胰腺(B)和肌肉(C)中 *PcCytc* 基因的 WSSV 刺激表达谱

Fig.3 WSSV stimulation expression profile of *PcCytc* gene in the intestine (A), hepatopancreas (B) and muscle (C) of *P. clarkii*

\*表示差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示差异极显著( $P<0.01$ ), 下同。

\* denotes significant difference ( $P<0.05$ ), \*\* denotes highly significant difference ( $P<0.01$ ). The same as below.

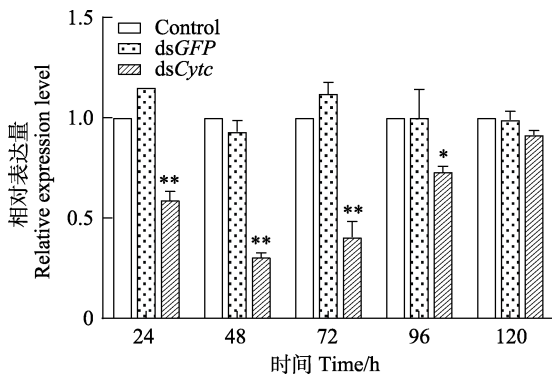


图 4 克氏原螯虾 *PcCytc* 在 ds*Cytc* 干扰后的表达

Fig.4 *PcCytc* mRNA expression profiles after silencing by ds*Cytc*

注射 ds*Cytc* 后, 在 WSSV 感染下, 克氏原螯虾肌肉中 WSSV 的病毒拷贝数见图 5。如图 5 所示, 注射 ds*Cytc* 组的病毒拷贝数始终高于其他 3 组, 在注射 WSSV 的 24 和 48 h ds*Cytc* 组克氏原螯虾 WSSV 的病毒拷贝数与未注射组相比极显著增加( $P<0.01$ ), 在注射 WSSV 的 72 h 表现为显著增加( $P<0.05$ )。其中, 在注射 WSSV 的 24 h, WSSV 组、ds*GFP*+WSSV 组和 ds*Cytc* 组克氏原螯虾 WSSV 的病毒拷贝数分别约为  $10^{3.18}$ 、 $10^{3.21}$  和  $10^{4.82}$  拷贝数/mg; 在注射 WSSV 的 48 h, WSSV 组、ds*GFP*+WSSV 组和 ds*Cytc* 组克氏原螯虾 WSSV 的病毒拷贝数分别约为  $10^{4.97}$ 、 $10^{4.98}$  和  $10^{6.31}$  拷贝数/mg; 在 72 h 分别上升为  $10^{5.59}$ 、 $10^{5.61}$  和  $10^{6.76}$  拷贝数/mg。



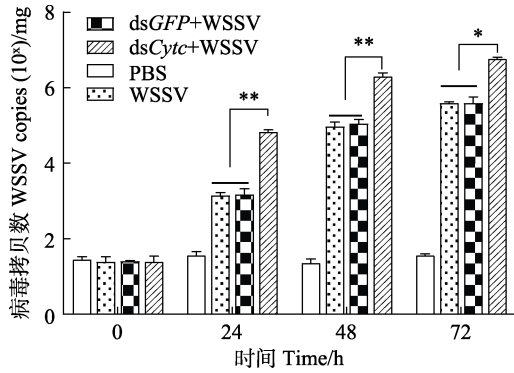


图5 RNAi和WSSV注射后克氏原螯虾体内病毒拷贝数变化

Fig.5 Changes in virus copies in *P. clarkii* after RNAi and WSSV injection

注射 dsCytC 后, 在 WSSV 感染条件下, 克氏原螯虾肌肉中凋亡相关基因的表达量如图 6A 所示。与 PBS 组相比, 其他各组在注射 WSSV 24 h 后克氏原螯虾 *bcl-2*、*bax* 和 *caspase-3* 基因均表现为不同程度的表达上调。其中, 注射 dsCytC 组的 *bcl-2* 和 *caspase-3* 基因表达量与未注射组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 分别表现为表达上调和下调。各组间的克氏原螯虾 *bax*

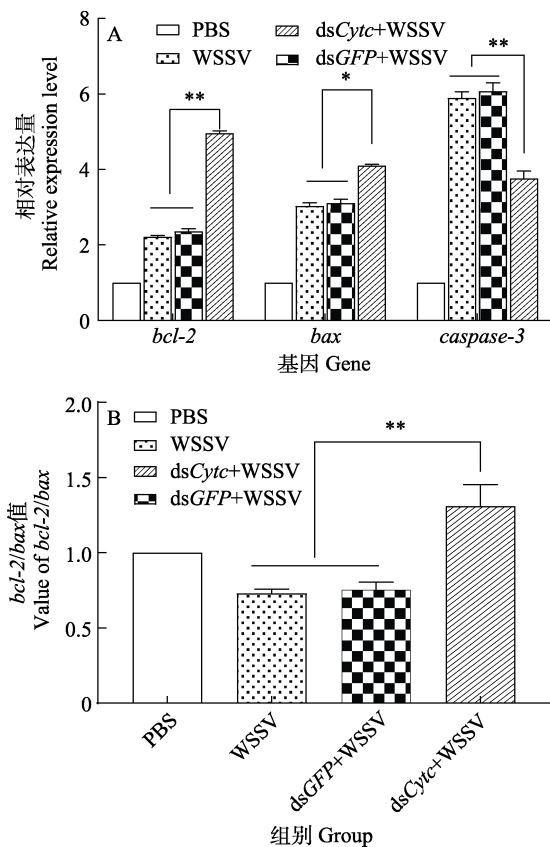


图6 RNAi和WSSV注射后克氏原螯虾凋亡相关基因表达变化

Fig.6 Changes in expression of apoptosis-related genes in *P. clarkii* after RNAi and WSSV injection

基因表达量差异显著 ( $P < 0.05$ )。图 6B 展示了 *bcl-2/bax* 值的变化, 其中注射 dsCytC 组 *bcl-2/bax* 值与 dsGFP 组和 WSSV 组相比显著升高 ( $P < 0.01$ ); 注射 dsGFP 组和 WSSV 组与 PBS 组相比显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

本研究克隆获得克氏原螯虾 *PcCytC* 基因全长序列, *PcCytC* 基因全长为 897 bp, 编码 282 个氨基酸。结构预测表明, *PcCytC* 含有 1 个保守的 Cytochrom\_C 结构域, 证明其与能量产生有关 (Gnaiger *et al*, 2002)。蛋白同源比对分析表明, 该蛋白氨基酸序列与其他物种的 *CytC* 氨基酸序列具有很高的同源性, 说明 *PcCytC* 在进化上趋于保守, 系统发生进化树的结果也证明了该结果。

*PcCytC* 在克氏原螯虾几乎所有主要的组织中均有表达, 推测它能够参与线粒体能量代谢 (赵丹等, 2012)。 *PcCytC* 在肠道和肌肉等高能量消耗组织中表现出相对较高的表达, 这与先前在凡纳滨对虾中的研究一致 (胡文燕, 2016)。在克氏原螯虾的主要免疫和呼吸组织——鳃中观察到最高表达水平, 表明 *PcCytC* 可能参与呼吸和免疫等生物过程。根据以上结果, 推测 *PcCytC* 在不同组织中可能发挥不同的功能。

病毒感染过程与细胞凋亡发生密切相关 (于学武, 2010), 一方面, 细胞通过凋亡过程可以清除病毒, 抵抗病毒感染 (Nainu *et al*, 2015); 另一方面, 病毒在与宿主细胞博弈过程中会进化出一些拮抗或劫持策略, 以利于病毒的复制与传播 (Miao *et al*, 2016)。Hu 等 (2016) 研究表明, *CytC* 能够参与病毒感染过程。在本研究中, 当克氏原螯虾感染 WSSV 后, 肠道、肝胰腺和肌肉中 *PcCytC* 的表达均显著上调 ( $P < 0.05$ ), 并在 24 h 达最高值 ( $P < 0.01$ )。说明 *PcCytC* 参与了 WSSV 病毒感染过程。此外, 考虑到 *PcCytC* 能够做为线粒体呼吸链中的关键要素参与 ATP 产生 (向飞等, 2020), *PcCytC* 的低表达导致能量缺乏。推测, 一旦病毒破坏了宿主细胞的能量代谢, 宿主可能通过上调 *PcCytC* 的表达来弥补损失。

RNAi 实验揭示了克氏原螯虾 *PcCytC* 在 WSSV 感染过程中的作用。在 WSSV 感染后的 24、48 h, *PcCytC* 基因 RNAi 组病毒的拷贝数与未干扰组相比呈极显著增加 ( $P < 0.01$ ), 在 72 h 表现为显著增加 ( $P < 0.05$ )。该结果表明, *PcCytC* 在抑制 WSSV 在克氏原螯虾体内复制、延迟感染过程中承担了重要角色。为进一步确认 *PcCytC* 是否主要通过细胞凋亡途径抑制 WSSV 感染, 检测部分凋亡相关的重要基因的表达变

化。caspase 介导的细胞凋亡是甲壳动物抗病毒免疫的重要机制(王磊等, 2020), 其中 caspase-3 又被称为半胱氨酸蛋白 32 (cysteine protease 32, CPP32), 作为一种效应蛋白调控细胞凋亡, 在凋亡信号传导途径中发挥主导功能, 其表达量直接反映细胞凋亡程度(Lamkanfi *et al*, 2010)。而且 Rijiravanich 等(2008)研究表明, 通过 RNAi 敲除 *caspase-3* 可降低受到低剂量 WSSV 攻击的凡纳滨对虾的死亡率。*bcl-2* 家族蛋白是线粒体凋亡反应的重要守门人, 这些蛋白质包括促凋亡(例如 *bax*、*bid* 和 *bad*)和抗凋亡(例如 *bcl2*、*mcl-1* 和 *bcl-XL*)成员(Levine *et al*, 2008)。它们通过控制线粒体外膜通透性(MOMP) (Chipuk *et al*, 2008), 诱导细胞凋亡因子的释放或阻止细胞色素 *c* 从线粒体中释放而抑制半胱天冬酶活性来调节细胞凋亡(Gottlieb, 2001; Scorrano *et al*, 2003)。其中, *bcl-2* 可以通过阻止细胞色素 *c* 释放到细胞质中从而抑制 caspase 级联反应的激活来阻止细胞凋亡(Chen *et al*, 2019); *bax* 是 *bcl-2* 家族蛋白中第 1 个鉴定的促凋亡成员, 依赖于 *p53* 途径介导程序性细胞死亡过程(Knudson *et al*, 2001; Suzuki *et al*, 2003)。重要的是, *bcl-2/bax* 的比值被认为是细胞凋亡进程的指标, 比值升高表示凋亡被抑制, 降低表示凋亡被促进(王乔雨等, 2021)。在本研究中, 与 PBS 组相比, 仅注射 WSSV 组克氏原螯虾的 *bcl-2*、*bax* 和 *caspase-3* 基因均表现为不同程度的表达上调, 且存在极显著差异( $P < 0.01$ )。说明 WSSV 能导致克氏原螯虾肌肉细胞凋亡的发生, 这和泥蟹(*Scylla paramamosain*) (Lin *et al*, 2020)、凡纳滨对虾(Kakoolaki *et al*, 2016)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (宋光年, 2010)、三疣梭子蟹(王磊等, 2020; 题兴斌等, 2021)中的研究一致。此外, 注射 dsCyt<sub>c</sub> 组 *caspase-3* 的表达量显著下调( $P < 0.01$ ), 说明在干扰 *PcCyt<sub>c</sub>* 后细胞凋亡受到抑制, 注射 dsCyt<sub>c</sub> 组 *bcl-2/bax* 比值显著升高( $P < 0.01$ ), 也证明了该结论。结合上述 *PcCyt<sub>c</sub>* 能够显著抑制 WSSV 在克氏原螯虾体内复制的结论, 推测 *PcCyt<sub>c</sub>* 能够通过调节血细胞的凋亡来抑制 WSSV 在克氏原螯虾体内的复制。

综上所述, 本研究克隆获得了克氏原螯虾 *PcCyt<sub>c</sub>* 基因序列, 并发现在 WSSV 感染后其在克氏原螯虾中的表达上调。*PcCyt<sub>c</sub>* 被干扰后, WSSV 的拷贝数显著升高, 而且凋亡基因表达水平也发生显著变化。本研究表明, *PcCyt<sub>c</sub>* 可能通过调节细胞凋亡对病毒感染产生抑制作用, 该结论为克氏原螯虾响应 WSSV 感染的免疫机制提供了一些新的见解。

## 参 考 文 献

- ADRAIN C, MARTIN S J. The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 26(6): 390–397
- CHEN J, GONG Y, ZHENG H, *et al*. *SpBcl2* promotes WSSV infection by suppressing apoptotic activity of hemocytes in mud crab, *Scylla paramamosain*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2019, 100: 103421
- CHEN S P, WU J L, SU Y C, *et al*. Anti-Bcl-2 family members, zfBcl-x<sub>L</sub> and zfMcl-1a, prevent cytochrome *c* release from cells undergoing betanodavirus-induced secondary necrotic cell death. *Apoptosis*, 2007, 12: 1043–1060
- CHEREAU D, ZOU H, SPADA A P, *et al*. A nucleotide binding site in caspase-9 regulates apoptosome activation. *Biochemistry*, 2005, 44(13): 4971–4976
- CHIPUK J E, GREEN D R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology*, 2008, 18(4): 157–164
- ELMORE S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35(4): 495–516
- FAN H D, LI Y D, YANG Q B, *et al*. Characterization and expression analysis of *MKK7* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different stressors. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(7): 748–758 [范红弟, 李运东, 杨其彬, 等. 斑节对虾 *MKK7* 基因的克隆及在不同胁迫条件下的表达分析. *中国水产科学*, 2020, 27(7): 748–758]
- GNAIGER E, KUZNETSOV A V. Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome *c*. *Biochemical Society Transactions*, 2002, 30(2): 252–258
- GOTTLIEB R A. Mitochondria and apoptosis. *Biological Signals and Receptors*, 2001, 10: 147–161
- HAO C G. Effects of three environmental factors on WSSV proliferation in *Procambarus clarkii*. Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2020 [郝晨光. 三种环境因子对克氏原螯虾体内 WSSV 增殖的影响. 河北农业大学硕士研究生学位论文, 2020]
- HE X, FU Z, LI M, *et al*. *Nosema bombycis* (Microsporidia) suppresses apoptosis in BmN cells (*Bombyx mori*). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2015, 47(9): 696–702
- HU W Y, YAO C L. Molecular and immune response characterizations of a novel AIF and cytochrome *c* in *Litopenaeus vannamei* defending against WSSV infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 56: 84–95
- HU W Y. Cloning and expression characterizations of some apoptotic genes in *Litopenaeus vannamei* immune response. Master's Thesis of Jimei University, 2016 [胡文燕. 凡纳滨对虾部分凋亡相关基因的克隆及免疫反应特征. 集美大学硕士研究生学位论文, 2016]
- HÜETTEMANN M, LEE I, GROSSMAN L I, *et al*. Phosphorylation of mammalian cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase in the regulation of cell destiny. *Respiration*,

- apoptosis, and human disease. In: KADENBACH B. Mitochondrial oxidative phosphorylation: Nuclear-encoded genes, enzyme regulation, and pathophysiology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012, 748: 237–264
- HÜETTEMANN M, PECINA P, RAINBOLT M, *et al.* The multiple functions of cytochrome *c* and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion*, 2011, 11(3): 369–381
- KAKOOLAKI S, AFSHARNASAB M, SEDEH M F, *et al.* The effect of created hemolymph apoptosis on WSSV gamma-vaccinated shrimp, *Litopenaeus vannamei* in WSSV disease control. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 2016, 15(1): 301–310
- KNUDSON C M, JOHNSON G M, LIN Y, *et al.* Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice. *Cancer Research*, 2001, 61(2): 659–665
- LAMKANFI M, KANNEGANTI T D. Caspase-7: A protease involved in apoptosis and inflammation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2010, 42(1): 21–24
- LEVINE B, SINHA S, KROEMER G. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 2008, 4(5): 600–606
- LIN S, HE Y, GONG Y, *et al.* SpBOK inhibits WSSV infection by regulating the apoptotic pathway in mud crab (*Scylla paramamosain*). *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 106: 103603
- LIU K Y, YANG H, PENG J X, *et al.* Cytochrome *c* and insect cell apoptosis. *Insect Science*, 2012, 19: 30–40
- MIAO Y, LIANG A, FU Y. Baculovirus antiapoptotic protein P<sub>35</sub> regulated the host apoptosis to enhance virus multiplication. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2016, 423: 67–73
- NAINU F, TANAKA Y, SHIRATSUCHI A, *et al.* Protection of insects against viral infection by apoptosis-dependent phagocytosis. *Journal of Immunology*, 2015, 195(12): 5696–5706
- RIJIRAVANICH A, BROWDY C L, WITHYACHUMNARNKUL B. Knocking down caspase-3 by RNAi reduces mortality in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* challenged with a low dose of white-spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 24(3): 308–313
- SCORRANO L, KORSMEYER S J. Mechanisms of cytochrome *c* release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 304(3): 437–444
- SHI X L, MENG X H, KONG J, *et al.* cDNA cloning of the *FBA* gene in *Fenneropenaeus chinensis* and its expression and functional analysis after WSSV infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 112–119 [史晓丽, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国明对虾 *FBA* 基因克隆及其在白斑综合征病毒感染中的表达及功能分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 112–119]
- SONG G N. Cloning, expression and function analysis of a caspase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Institute of Oceanology, Master's Thesis of Chinese Academy of Sciences, 2010 [宋光年. 中国明对虾凋亡基因 caspase 的克隆、表达及功能的初步分析. 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2010]
- SUZUKI H, KURITA M, MIZUMOTO K, *et al.* p19<sup>ARF</sup>-induced p53-independent apoptosis largely occurs through BAX. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 312(4): 1273–1277
- TI X B, LÜ J J, SONG L, *et al.* Cloning and expression analysis of 14-3-3 gene in *Portunus trituberculatus* after exposure to low salt and pathogenic stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 134–143 [题兴斌, 吕建建, 宋柳, 等. 三疣梭子蟹 14-3-3 基因的克隆及其在低盐和病原胁迫后的表达分析. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 134–143]
- WANG L, REN X Y, SONG L, *et al.* Cloning and expression analysis of the *Apaf-1* gene in *Portunus trituberculatus* after exposure to low salt and pathogenic stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(4): 85–93 [王磊, 任宪云, 宋柳, 等. 三疣梭子蟹 *Apaf-1* 基因的克隆及其在低盐和病原胁迫后的表达分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 85–93]
- WANG Q Y, SUN H N, ZHOU Q, *et al.* Folic acid and vitamin B<sub>12</sub> inhibit arsenic-induced apoptosis of SH-SY5Y cells via Bcl-2/Bax pathway. *Chinese Journal of Endemiology*, 2021, 40(1): 5–11 [王乔雨, 孙洪娜, 周齐, 等. 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 通过 Bcl-2/Bax 途径抑制砷诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡. *中华地方病学杂志*, 2021, 40(1): 5–11]
- WANG X Y, WU K H, PANG H L, *et al.* Study on the role of *Cytc* in response to BmNPV infection in silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera). *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20: 4325
- WELCHEN E, GONZALEZ D H. Cytochrome *c*, a hub linking energy, redox, stress and signaling pathways in mitochondria and other cell compartments. *Physiologia Plantarum*, 2016, 157(3): 310–321
- XIANG F, XUE D D, LUO J, *et al.* Effects and mechanism of mitochondrial transcription factor A and cytochrome *c* oxidase pathway in the energy production of hypoxic cardiomyocytes of rats regulated by tumor necrosis factor receptor associated protein. *Chinese Journal of Burns*, 2020, 36(8): 651–657 [向飞, 薛冬冬, 罗佳, 等. 线粒体转录因子 A 和细胞色素 *c* 氧化酶途径对肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 调节大鼠缺氧心肌细胞能量生成的作用及机制. *中华烧伤杂志*, 2020, 36(8): 651–657]
- XU R J, GU Z M, LI L J, *et al.* A comparative study on the epidemiology of WSSV infection of crayfish in ponds and rice fields. *Chinese Fisheries*, 2020(6): 63–66 [徐日俊, 顾泽茂, 李莉娟, 等. 池塘与稻田养殖小龙虾感染 WSSV 的流行病学比较研究. *中国水产*, 2020(6): 63–66]



- YU X W. Research progress on the molecular mechanism of virus infection-induced cell apoptosis. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010(6): 79–82 [于学武. 病毒感染诱导细胞凋亡分子机制的研究进展. *现代畜牧兽医*, 2010(6): 79–82]
- ZHAO D, HE L F, LIU H, *et al.* Mitochondria, cytochrome C, caspase and apoptosis. *Journal of Medical Pest Control*, 2012, 28(12): 1337–1340 [赵丹, 贺莉芳, 刘晖, 等. 线粒体、细胞色素 C、Caspase 与细胞凋亡. *医学动物防制*, 2012, 28(12): 1337–1340]

(编辑 马瑾艳)

## ***Cytochrome c* Gene in *Procambarus clarkii* Inhibits WSSV Infection by Regulating the Apoptosis Pathway**

GONG Jie<sup>1,2</sup>, ZHU Mengru<sup>1,2</sup>, ZHAN Ming<sup>1,2</sup>, XI Changjun<sup>1,2</sup>, SHEN Guoqing<sup>1,2</sup>, SHUI Yan<sup>2</sup>, XU Zenghong<sup>2</sup>, SHEN Huaishun<sup>1,2</sup><sup>①</sup>

(1. *Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210000, China*;

2. *Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, Jiangsu 214000, China*)

**Abstract** Apoptosis is programmed cell death and is regulated by a series of related genes. It is of great significance in resistance to pathogen invasion and maintaining homeostasis in the environment. The release of cytochrome c (Cyt<sub>c</sub>) from the mitochondria into the cytoplasm is a key step in the initiation of apoptosis. Increasing evidence from investigation of Cyt<sub>c</sub> in cell apoptosis and immunity shows that it can participate in cell apoptosis induced by virus infection. For example, white spot syndrome virus (WSSV) stimulation can induce Cyt<sub>c</sub> gene expression in *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas and hemocytes, and the apoptosis of *Epinephelus akaara* hepatocytes induced by red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) is related to the release of Cyt<sub>c</sub>. However, the role of Cyt<sub>c</sub>-mediated apoptosis in *Procambarus clarkii* WSSV infection has not yet been reported. Therefore, in this study, the full length of the the cytochrome c gene of *P. clarkii* (*PcCyt<sub>c</sub>*) was cloned, and the role of *PcCyt<sub>c</sub>* in *P. clarkii* was analyzed. Its expression in various tissues of *P. clarkii* proved that WSSV infection can induce the expression of *PcCyt<sub>c</sub>*. The mechanism of *PcCyt<sub>c</sub>* involvement in cell apoptosis during WSSV infection was also explored using RNA interference technology, to gain a deeper understanding of the potential role of apoptosis-related factors in the immune response of *P. clarkii*.

In this study, *PcCyt<sub>c</sub>* was cloned using RACE technology, with a total length of 897 bp, including the 163 bp 5'-UTR, 419 bp 3'-UTR, and 315 bp open reading frame; it encoded 104 amino acids. The structure prediction showed that *PcCyt<sub>c</sub>* contained a conserved Cytochrom\_C domain, proving that it is related to energy production and tends to be conserved in evolution.

The results of the quantitative PCR showed that the *PcCyt<sub>c</sub>* gene was expressed in all tissues of *P. clarkii*. The expression was lowest in the stomach and higher in the gills, intestines, and muscles, which showed, respectively, 9.46, 8.65 and 7.88 times greater *PcCyt<sub>c</sub>* expression than that in the stomach. *PcCyt<sub>c</sub>* showed relatively high expression in tissues with high energy consumption, such as the intestines and muscles, which is consistent with previous studies in *Penaeus vannamei*. The highest expression level was observed in the gills of the main immune and respiratory tissues of *P. clarkii*, indicating that *PcCyt<sub>c</sub>* may be involved in the related biological processes. Based on the above results, we speculate that *PcCyt<sub>c</sub>*

① Corresponding author: SHEN Huaishun, E-mail: shenhuaishun@ffrc.cn

may play different functions in different tissues.

WSSV infection experiments showed that the expression level of *PcCytc* in the tested hepatopancreas, intestines, and muscle tissues increased after virus infection, and reached the highest value at 24 h ( $P<0.01$ ), after which it began to decrease until it returned to a normal level at 96 h; the overall performance was an induced expression pattern. This showed that *PcCytc* is involved in the process of WSSV infection. In addition, considering that *PcCytc* can participate in ATP production as a key element in the mitochondrial respiratory chain, the low expression of *PcCytc* leads to energy deficiency. We speculate that once the virus disrupts the energy metabolism of the host cell, the host may compensate for the loss by upregulating the expression of *PcCytc*.

RNAi technology revealed the role of *PcCytc* in the process of WSSV infection. At 24 and 48 h after WSSV infection, the WSSV copies of the *PcCytc* RNAi group were significantly increased compared to the uninterrupted group ( $P<0.01$ ), and at 72 h were still significantly increased ( $P<0.05$ ). These results indicate that *PcCytc* plays an important role in inhibiting the replication of WSSV in *P. clarkii* and delays the infection process. To further confirm whether *PcCytc* mainly inhibits WSSV infection through the apoptotic pathway, we tested the expression changes of some important apoptosis-related genes (*bcl-2*, *bax*, and *caspase-3*). Among them, *caspase-3* is an effector protein that regulates cell apoptosis, and its expression directly reflects the result of cell apoptosis. The ratio of *bcl-2/bax* is considered to be an indicator of the process of cell apoptosis; an increase in the ratio indicates that apoptosis has been affected. Inhibition (a decrease in the ratio) indicates that apoptosis was promoted. The test results were as follows: compared with the PBS group, the expression of *bcl-2*, *bax*, and *caspase-3* genes of *P. clarkii* in the WSSV group was up-regulated to varying degrees, with a very significant difference in values ( $P<0.01$ ). This shows that WSSV can cause hemolymph apoptosis in *P. clarkii*, which is consistent with observations in mud crab and shrimp. In addition, the expression of *caspase-3* in the ds*Cytc* injection group was significantly downregulated ( $P<0.01$ ), indicating that apoptosis was inhibited after interfering with *PcCytc*. The value of *bcl-2/bax* in the ds*Cytc* injection group was significantly increased ( $P<0.01$ ), which supported this conclusion.

In summary, our results indicate that *PcCytc* can inhibit WSSV infection by regulating the apoptotic pathway. The results of this study provide new insights into the immune response of *P. clarkii* to WSSV infection.

**Key words** *Procambarus clarkii*; Cytochrome *c* gene; Apoptosis; WSSV infection; RNA interference