

西方蜜蜂 *caspase-3* 基因克隆、 分析与表达模式*

张天泽^{1**} 李婧娴^{1**} 王梦怡¹ 范小雪^{1,2,3} 邱剑丰^{1,2,3} 骆庆明^{2,4}
卢兆辉⁴ 陈大福^{1,2,3} 严提珍^{2,4***} 郭睿^{1,2,3***}

(1. 福建农林大学蜂学与生物医药学院, 福州 350002; 2. 天然生物毒素国家地方联合工程实验室, 福州 350002;
3. 福建农林大学蜂疗研究所, 福州 350002; 4. 东莞市妇幼保健院, 东莞 523000)

摘要 【目的】本研究旨在为深入开展西方蜜蜂 *Apis mellifera caspase-3* 基因 (*Am-caspase-3*) 的功能研究提供参考和依据。【方法】通过 PCR 扩增 *Am-caspase-3* 的编码序列 (Coding sequences, CDS) 后进行 Sanger 测序验证, 并利用生物信息学工具预测 *Am-caspase-3* 蛋白的理化性质、分子特征及蛋白互作网络。利用 MEGA 软件进行西方蜜蜂和其他物种 *caspase-3* 系统进化分析。采用 RT-qPCR 检测 *Am-caspase-3* 在不同组织和发育阶段, 工蜂成虫应答东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 侵染过程以及工蜂幼虫应答蜜蜂球囊菌 *Ascosphaera apis* 侵染过程中的相对表达量。【结果】*Am-caspase-3* 的 CDS 长度为 1 023 bp, 编码 340 个氨基酸。*Am-caspase-3* 的分子式为 $C_{1760}H_{2703}N_{459}O_{539}S_{23}$, 相对分子量为 39 kD, 不含跨膜结构域和信号肽区, 但包含 44 个磷酸化位点, 主要分布于细胞质。*Am-caspase-3* 的二级结构包括 184 条无规则卷曲, 90 个 α -螺旋, 46 条延伸链和 20 个 β -转角。在 *Am-caspase-3* 中鉴定到 1 个结构域和 3 个保守基序; *Am-caspase-3* 与其模版 1m72.1.A 之间的同源性达 73.00%。*Am-caspase-3* 与 CytC 等 12 个蛋白构成 1 个互作网络。西方蜜蜂与东方蜜蜂 *Apis cerana* 的 *caspase-3* 之间同源性达 81.23%, 在进化树上聚为一支。*Am-caspase-3* 在西方蜜蜂工蜂不同组织中差异表达, 在中肠中的表达量最高且极显著高于其他 6 个组织 ($P < 0.01$)。*Am-caspase-3* 在 3 日龄幼虫中的表达量达峰值且极显著高于卵、7-8 日龄预蛹及 12 日龄蛹 ($P < 0.01$)。*Am-caspase-3* 在 2、6、15 和 18 日龄成虫体内的表达量显著高于 1 日龄成虫体内的表达量 ($P < 0.05$)。*Am-caspase-3* 在工蜂成虫应答东方蜜蜂微孢子虫侵染的 1、4、7、10 和 13 d 皆显著下调 ($P < 0.05$)。*Am-caspase-3* 在工蜂幼虫应答蜜蜂球囊菌侵染的 1、2 和 3 d 均显著上调 ($P < 0.05$)。【结论】成功克隆到 *Am-caspase-3* 的 CDS; *Am-caspase-3* 是潜在的酸性蛋白、亲水性蛋白和胞内蛋白, 与 CytC 等 11 个蛋白之间存在互作关系; 西方蜜蜂与东方蜜蜂的 *caspase-3* 之间同源性最高; *Am-caspase-3* 潜在参与西方蜜蜂工蜂不同组织和虫态的发育过程及宿主应答病原真菌侵染的过程。

关键词 西方蜜蜂; *caspase-3* 基因; 细胞凋亡; 东方蜜蜂微孢子虫; 蜜蜂球囊菌

Cloning, analysis and expression of the *Apis mellifera caspase-3* gene

ZHANG Tian-Ze^{1**} LI Jing-Xian^{1**} WANG Meng-Yi¹ FAN Xiao-Xue^{1,2,3} QIU Jian-Feng^{1,2,3}
LUO Qing-Ming^{2,4} LU Zhao-Hui⁴ CHEN Da-Fu^{1,2,3} YAN Ti-Zhen^{2,4***} GUO Rui^{1,2,3***}

(1. College of Bee Science and Biomedicine, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. National & Local United Engineering Laboratory of Natural Biotoxin, Fuzhou 350002, China; 3. Apitherapy Research Institute of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 4. Dongguan Maternal and Children Health Hospital, Dongguan 523000, China)

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目 (32372943, 32172792); 国家现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-44-KXJ7); 福建省自然科学基金面上项目 (2022J01133); 福建农林大学科技创新专项基金项目 (KFb22060XA); 福建农林大学硕士生导师项目; 福建省大学生创新创业训练计划项目 (S202410389065, S202410389062)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 13230693196@163.com; 18236228430@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: yantizhen@gdmu.edu.cn; ruiguo@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-09-12; 接受日期 Accepted: 2024-10-22

Abstract [Aim] To provide a reference and foundation for functional research on the *Apis mellifera caspase-3* gene (*Am-caspase-3*). [Methods] The CDS of *Am-caspase-3* was amplified with RT-PCR and verified using Sanger sequencing. The physicochemical properties, protein structure and protein interaction network of the *Am-caspase-3* protein were then analyzed with bioinformatics software. A phylogenetic analysis of caspase-3 was conducted by using MEGA software. RT-qPCR was used to detect the expression of *Am-caspase-3* in different tissues of adult workers infected with *Nosema ceranae*, and in worker larvae infected with *Ascosphaera apis*. [Results] The CDS of *Am-caspase-3* is 1 023 bp in length and encodes 340 amino acids. The molecular formula of the *Am-caspase-3* protein is $C_{1760}H_{2703}N_{459}O_{539}S_{23}$, and its relative molecular weight is 39 kD. There are 44 potential phosphorylation modification sites and no transmembrane structure or signal peptide region. *Am-caspase-3* is mainly distributed in the cytoplasm. Its secondary structure is comprised of 184 random coils, 90 α -helices, 46 extended strands and 20 β -turns. One structural domain and ten conserved motifs were identified. There is 73.00% homology between *Am-caspase-3* and its template 1m72.1.A. There is an interaction network among *Am-caspase-3* and 12 other proteins such as CytC. There is 81.23% homology between the caspase-3 of *A. mellifera* and *A. cerana*, with the homologous genes of each species clustering within a single clade on the phylogenetic tree. *Am-caspase-3* was differentially expressed in different worker tissues. Expression was significantly higher ($P < 0.01$) in the midgut than in the other 6 tissues tested, and significantly higher ($P < 0.01$) in 3-day-old larvae than in eggs, 7-day-old prepupae, 8-day-old prepupae or 12-day-old pupae. Expression of *Am-caspase-3* in 2, 6, 15 and 18-day-old workers was significantly higher ($P < 0.05$) than in 1-day-old workers. Expression was significantly downregulated ($P < 0.05$) 1, 4, 7, 10 and 13 days, after infection with *Nosema ceranae*. Conversely, expression was significantly upregulated ($P < 0.05$) 1, 2, and 3 days, after infection with *Ascosphaera apis*. [Conclusion] The CDS of *Am-caspase-3* was successfully cloned. *Am-caspase-3* is a putative acidic, hydrophilic, intracellular protein that interacts with 11 other proteins including CytC, *Am-caspase-3* is most homologous to *Apis cerana* caspase-3. *Am-caspase-3* potentially participates in the developmental processes of different tissues and developmental stages of *A. mellifera* workers, as well as in the immune response to infection by pathogenic fungi.

Key words *Apis mellifera*; caspase-3 gene; apoptosis; *Nosema ceranae*; *Ascosphaera apis*

caspase-3 是主要的凋亡效应部半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶, 作为 caspase 家族中最重要的凋亡执行者之一, 是细胞凋亡的关键执行者, 主要负责切割某些蛋白质, 也是细胞杀伤机制的重要组成部分, 具有重要的生物学功能, 在基因研究领域备受关 注 (Porter and Jänicke, 1999)。

细胞凋亡是由多细胞生物体内基因控制而发生的涉及基因激活、表达及调控等的细胞自主性死亡过程, 能够维持机体内环境的稳定 (Newton *et al.*, 2024)。经典的细胞凋亡途径主要包括细胞外途径 (也称为死亡受体途径) 和细胞内途径 (涉及线粒体、内质网等细胞器)。这两种途径虽起始点不同, 但最终均会汇聚到核心的执行阶段——激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶类 (Cysteine proteinases with specificity for aspartic acid residues, caspases), 即 Caspase 家族。caspase-3 位于凋亡有序级联反应的下游, 在细胞凋亡过程中居核心地位, 一旦被激活, 凋亡便不

可避免, 因此常被称为“死亡执行蛋白酶” (Odonkor and Achilefu, 2009)。智人 *Homo sapiens*、小鼠 *Mus musculus*、猪 *Sus scrofa* 和牛 *Bos taurus* 等哺乳动物的 caspase-3 已被研究地较为深入。目前, 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Vishwanathreddy *et al.*, 2014)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Shahidi-Noghabi *et al.*, 2010)、绿棉铃虫 *Heliothis virescens* (Parthasarathy and Palli, 2007)、大蜡螟 *Galleria mellonella* (Khoa and Takeda, 2012) 等多种鳞翅目昆虫的 caspase-3 基因已被鉴定和报道。在大蜡螟中, *Gm-caspase-3* 在不同发育时期均有表达, 但 5 龄幼虫体内特异性高表达, 饥饿状态下 *Gm-caspase-3* 的表达水平上调, 同时伴随着中肠细胞凋亡的发生 (Khoa and Takeda, 2012)。绿棉铃虫幼虫在蜕皮进入最终幼虫龄期后 108 h, *Hv-caspase-3* 的表达量达到峰值 (Parthasarathy and Palli, 2007)。在鞘翅目昆虫花绒寄甲

Dastarcus helophoroides 中, *Dh-caspase-3* 在不同组织和不同发育阶段中动态差异表达, 此外, 高温胁迫导致 *Dh-caspase-3* 的 mRNA 转录水平在成虫、蛹、幼虫三个关键发育阶段均显著上升, 结果暗示 *Dh-caspase-3* 基因可能参与调控花绒寄甲的发育、组织特异性功能、高温适应性以及细胞凋亡过程 (Vu et al., 2016)。

caspase-3 已被证实在无脊椎动物中参与免疫应答, 例如在副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 感染诱导激活泥蟹 *Scylla paramamosain* 体内 *Sp-caspase-3* 的表达, 进而提高了 *caspase-3* 的活性, 体内抑制 *Sp-caspase-3* 表达可显著减少副溶血弧菌感染后泥蟹的细胞凋亡 (Cheng et al., 2021); 番茄黄曲叶病毒 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 侵染后, 烟粉虱 *Bemisia tabaci* 体内 *caspase-3* 的表达量显著升高, 细胞凋亡水平因病毒侵染而增强 (王超, 2019)。

作为自然界的关键授粉昆虫, 蜜蜂对维护生态平衡和保障粮食安全有重要贡献。西方蜜蜂 *Apis mellifera* 是一个具有诸多优良生产性能的蜂种, 广泛用于我国和其他许多国家的养蜂生产 (曾志将, 2017), 具有重要的生态、研究和经济价值。相比于人类和一些模式生物, 昆虫的 *caspase-3* 研究较为滞后, 蜜蜂的相关研究更为匮乏。本研究通过对西方蜜蜂 *Am-caspase-3* 基因的编码序列 (Coding sequence, CDS) 进行克隆, 探究 *Am-caspase-3* 蛋白的理化特性、分子特征、系统进化及 *Am-caspase-3* 在工蜂不同组织和发育阶段的表达谱、工蜂成虫应答东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 侵染过程以及工蜂幼虫应答蜜蜂球囊菌 *Ascoaphaera apis* 侵染的表达模式, 为进一步开展 *Am-caspase-3* 的功能研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品制备

实验所用西方蜜蜂工蜂及幼虫均取自福建农林大学蜜蜂-病原互作机制研究团队的实验蜂

群。参照本实验室已建立的技术流程 (吴鹰等, 2023; 刘小玉等, 2024) 制备 (1) 3 日龄幼虫 ($n=3$)、7 和 8 日龄预蛹 ($n=3$) 和 12 日龄蛹 ($n=3$), (2) 1、2、6、12、15 和 18 日龄工蜂成虫 ($n=3$), (3) 工蜂的中肠 ($n=3$)、毒腺 ($n=30$)、触角 ($n=10$)、咽下腺 ($n=30$)、脑 ($n=20$)、表皮 ($n=3$) 和脂肪体 ($n=5$)。上述样品分别放入灭菌的 RNA-Free 离心管, 液氮速冻后转存至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱进行备用。上述实验设置 3 次生物学重复。

参照本实验室前期已建立的方法 (Chen et al., 2019) 进行对西方蜜蜂工蜂的东方蜜蜂微孢子虫接种感染和人工饲养: (1) 使用无菌水和化学纯蔗糖配制 50% (w/v) 蔗糖溶液, 加入东方蜜蜂微孢子虫纯净孢子配制终浓度为 2×10^8 个孢子/mL 的蔗糖溶液; (2) 选取强群西方蜜蜂的成熟封盖子脾, 立即转移至实验室, 并放入 SPX-250BIII 恒温恒湿生化培养箱 (博讯, 上海) [$(34\pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60%-70% RH], 24 h 后收集羽化出房的工蜂, 35 头/盒放入灭菌的饲喂盒, 并以含 50% (w/v) 无菌蔗糖溶液的饲喂器 (4 mL) 置于盒顶进行饲喂; (3) 出房工蜂在 $(34.0\pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60%-70% RH 条件下培养 24 h; 然后进行饥饿处理 2 h, 处理组工蜂每头饲喂 5 μL 含 10^6 个孢子蔗糖溶液, 对照组工蜂每头饲喂 5 μL 不含孢子的蔗糖溶液, 未食尽的工蜂舍弃, 食尽的工蜂 35 头/盒放入饲喂盒; (4) 更换新的饲喂器 (装有不含孢子的蔗糖溶液 3 mL), 每日更换蔗糖溶液, 并及时清理死蜂。东方蜜蜂微孢子虫接种后 1、4、7、10 和 13 dpi (1 day post inoculation), 分别剖取处理组和对照组工蜂中肠, 每 3 头中肠样品放入 1 个 RNA-Free 离心管, 液氮速冻后转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。将处理组 1、4、7、10 和 13 dpi 工蜂肠道样品分别命名为 AmT1、AmT4、AmT7、AmT10 和 AmT13, 对照组 1、4、7、10 和 13 dpi 工蜂肠道样品分别命名为 AmCK1、AmCK4、AmCK7、AmCK10 和 AmCK13。上述实验进行 3 次生物学重复。

根据本实验室前期已建立的方法 (熊翠玲等, 2020) 对西方蜜蜂工蜂幼虫进行蜜蜂球囊菌

接种感染和人工饲养:选取 3 群健康的强群西方蜜蜂(外观无白垩病症状,且经 PCR 检测呈阴性)作为实验蜂群。随后,将 2 日龄幼虫转移至已添加 1 000 μ L 饲料的 6 孔细胞培养板中,放入 SPX-250BIII 恒湿恒温生化培养箱(博讯,上海)进行饲养,条件为:(35.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C, 90% RH。24 小时后,将 3 日龄幼虫转移至 48 孔细胞培养板。处理组幼虫饲喂含蜜蜂球囊菌孢子的饲料(孢子终浓度 1×10^6 个/mL),对照组则饲喂不含孢子的饲料。此后每日定时清理残留饲料并补充新鲜饲料。分别剖取处理组和对照组 4、5 和 6 日龄幼虫中肠(即蜜蜂球囊菌接种后 1、2 和 3 dpi),每 3 个肠道置于 1 个 RNA-Free 离心管,液氮速冻后转存至 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱。将处理组 4、5 和 6 日龄的幼虫中肠样品分别命名为 AmT1、AmT2 和 AmT3,对照组 4、5 和 6 日龄幼虫中肠样品分别命名为 AmCK1、AmCK2 和 AmCK3。上述实验均设置 3 次生物学重复。

1.2 PCR 扩增与 Sanger 测序

使用 SteadyPure Quick RNA Extraction Kit 试剂盒(艾科瑞,中国)提取 4 日龄幼虫肠道的总 RNA,反转录合成第一链 cDNA,作为模板进行 PCR 扩增,引物参考表 1,反应体系与程序按照郭意龙等(2022)的报道设置。产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段,进行 TA 克隆。转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(擎科,中国)后,挑取单菌落接种至含有氨苄抗生素 LB 液体培养基中,经 12 h 的 37 $^{\circ}$ C 振荡培养后取少量菌液进行 PCR 鉴定,阳性结果的菌液送至上海生工生物工程股份有限公司进行 Sanger 测序分析。

1.3 生物信息学分析

使用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质理化性质。分别采用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>), SignalP-5.0 (SignalP 5.0 - DTU Health Tech - Bioinformatic Services), TMHMM (<http://cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), Cell-

Ploc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-Ploc-2/>), SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), SMART (<http://smart.Embi-Heidelberg.de>), MEME (<https://meme-suite.org/meme/index.html>) 和 SWISSMODEL 等软件 (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 分析蛋白质的理化性质和亲疏水性,预测信号肽、跨膜结构域和磷酸化结构点,进行蛋白亚细胞定位,预测蛋白质二级结构、蛋白结构域、保守基序和三级空间结构。利用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 构建蛋白互作网络。使用 NCBI 中 BLAST 在线软件对西方蜜蜂、东方蜜蜂(XP_394855.4)、黑大蜜蜂 *Apis laboriosa* (XP_016920946.1)、大蜜蜂 *Apis dorsata* (XP_043792908.1)、小蜜蜂 *Apis florea* (XP_012345965.2)、巴西无刺蜂 *Tetragonisca angustula* (XP_043519748.1)、彩条蜂 *Frieseomelitta varia* (CAL7952146.1)、紫木蜂 *Xylocopa violacea* (KAK9297039.1)、四纹小蜜蜂 *Melipona quadrifasciata* (KOX80590.1)、黑条蜂 *Habropoda laboriosa* (XP_017794868.1)、火红熊蜂 *Bombus pyrosoma* (XP_043595975.1)、墨西哥优弗里斯蜂 *Eufriesea mexicana* (XP_017762123.1)、火山小条蜂 *Hylaeus volcanicus* (XP_053994453.1)、苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata* (XP_012145510.1)、黑腹果蝇寄生蜂 *Leptopilina heterotoma* (XP_043473119.1)、角花蜂 *Ceratina calcarata* (XP_017880112.2)、埃塞俄比亚微盾蜂 *Microctonus aethioides* (KAK0092038.1)、金赛氏角胡蜂 *Belonocnema kinseyi* (XP_033226618.1)、异角瘦蜂 *Diachasma alloeum* (XP_015116488.1) 和小鼠 *Mus musculus* (NP_031637.1) 的 caspase-3 进行氨基酸序列多重比对,随后利用 MEGA 软件工具构建系统进化树,采用 Bootstrap Neighbor-joining 法,并设置重复次数为 1 000 次。

1.4 RT-qPCR 检测

分别提取 1.1 节中制备的各样品的总 RNA,反转录合成第一链 cDNA 作为模板,进行 RT-qPCR,引物参考表 1,以检测 *Am-caspase-3*

在不同组织和发育阶段的相对表达量。以 *GAPDH* 基因(GeneBank 登录号: XM_393605.7)作为内参, 利用 QuantStudio 3.0 定量 PCR 仪进行 qPCR 反应, 按照吴鹰等 (2023) 的报道设置反应体系与程序。所有反应均包含 3 次技术重复和 3 次平行重复。 *Am-caspase-3* 的相对表达量采

用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行量化计算。使用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析及可视化, 而相对表达量的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 通过使用 SPSS 26.0 软件进行, 以 $P < 0.05$ 为显著性阈值。通过 Tukey 检验法和字母显著标记法两两比较分析实验数据。

表 1 本研究使用的引物信息
Table 1 Summary of primers used in this work

名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Purpose
caspase-3-F	CAGTATGACGGATGCC	qPCR
caspase-3-R	TGGTTTACCAGCCAAT	
GAPDH-F	CACCTTCTGCAAATTATGGCG	
GAPDH-R	ACCTTTGCCAAGTCTAACTGTAA	
caspase-3-CDS-F	GCAAGTTCAAGACTACAT	PCR 和 Sanger 测序
caspase-3-CDS-R	ACTTGCCTAAATCCCATC	PCR and Sanger sequencing

2 结果与分析

2.1 *Am-caspase-3* 基因 CDS 的分子克隆

如图 1 (A) 所示, 成功扩增出符合预期大小 (约 1 023 bp) 的目的片段。 Sanger 测序结果显示上述目的片段序列与 GeneBank 数据库收录的 *Am-caspase-3* 的预测序列完全一致 (100%) (图 1: B)。以上结果表明 *Am-caspase-3* 的 CDS 被成功克隆。

2.2 *Am-caspase-3* 蛋白的理化性质和分子特征

预测结果显示 *Am-caspase-3* 含 340 个氨基酸, 分子式为 C₁₇₆₀H₂₇₀₃N₄₅₉O₅₃₉S₂₃, 分子量约为 39 kD, 理论等电点、不稳定指数、半衰期、脂肪系数和平均亲水性分别为 6.12, 30.85, 30 h, 66.24, - 0.538 (图 2: A); *Am-caspase-3* 不含信号肽 (图 2: B) 和跨膜结构域 (图 2: C), 但包含 13 个苏氨酸磷酸化位点, 23 个丝氨酸磷酸化位点及 8 个酪氨酸磷酸化位点 (图 2: D)。另外, *Am-caspase-3* 定位于细胞质中。

如图 3 (A) 所示, *Am-caspase-3* 包含 184 (54.12%) 个无规则卷曲, 90 (26.47%) 个 α -

螺旋, 46 (13.53%) 条延伸链和 20 (5.88%) 个 β -转角。该蛋白含有 1 个 CASc 结构域, 位于第 95-336 位氨基酸残基 (图 3: B)。此外, 在 *Am-caspase-3* 中鉴定到 10 个保守基序: Motif1、Motif2、Motif3、Motif4、Motif5、Motif6、Motif7、Motif8、Motif9 和 Motif10 (图 3: C)。三级结果分析结果显示 *Am-caspase-3* 的模板为 1m72.1.A, 二者之间的同源性达到 73.00% (图 3: D)。

2.3 *Am-caspase-3* 蛋白的互作网络

Am-caspase-3 与其他 11 个蛋白 (CytC、LOC724543 和 A0a088ALK2 等) 构成 1 个互作网络, 该网络由 11 个节点构成, 包含 42 条边, 节点的平均连接数为 7.64, 平均局部聚类系数达到 0.897 (图 4)。

2.4 *Am-caspase-3* 蛋白的系统进化

Am-caspase-3 与东方蜜蜂 *caspase-3* 的同源性最高 (81.23%), 其次为黑大蜜蜂 (78.72%)、大蜜蜂 (77.97%)、小蜜蜂 (70.72%) 和巴西无刺蜂 (57.26%)。系统进化分析结果显示, 西方蜜蜂与东方蜜蜂、黑大蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂的

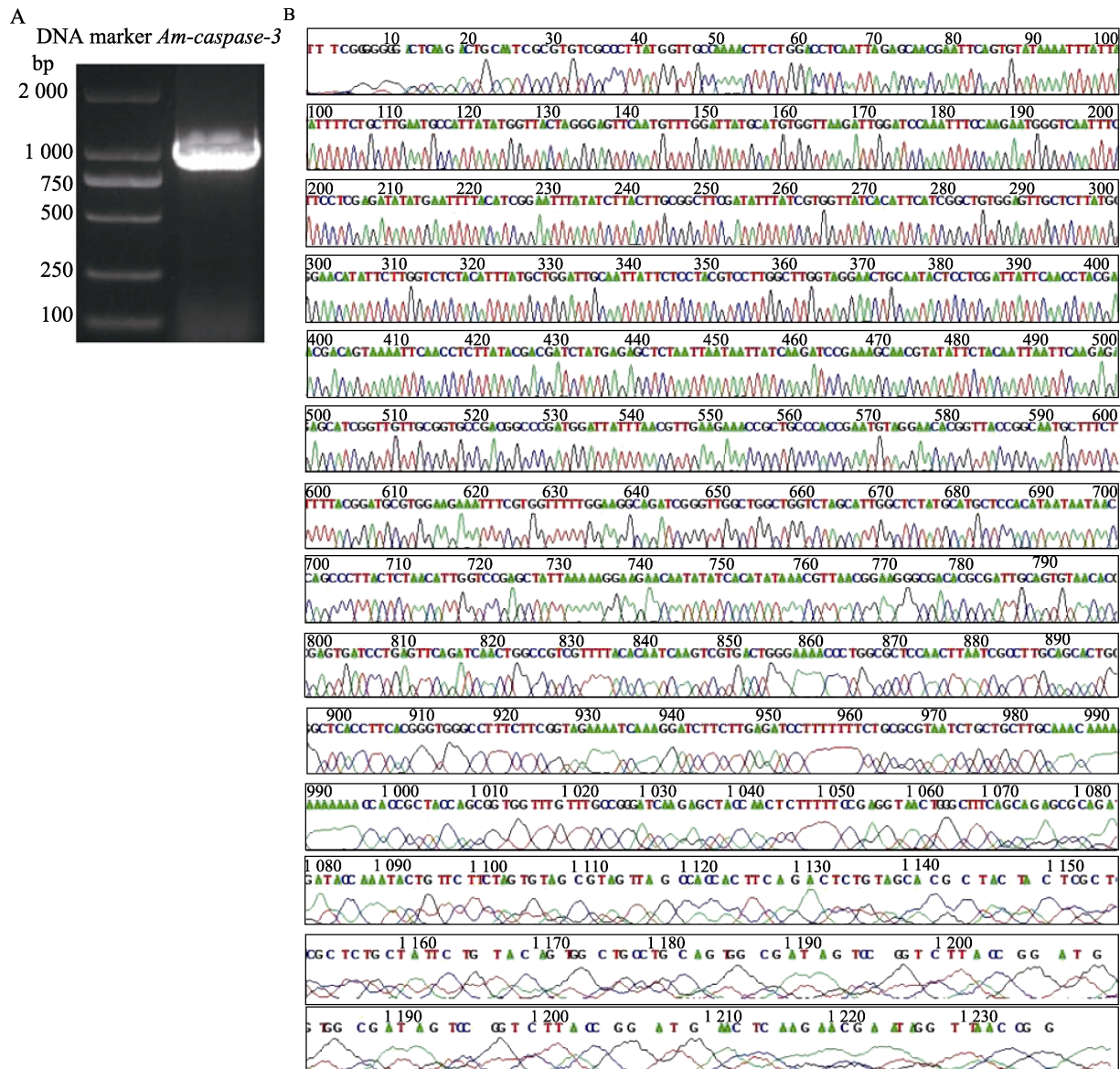


图 1 *Am-caspase-3* 基因编码序列扩增产物的琼脂糖凝胶电泳 (A) 和 Sanger 测序 (B)
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis (A) and Sanger sequencing (B) of amplification product from coding sequence of *Am-caspase-3* gene

caspase-3 聚为一支, 角花蜂与彩条蜂、火山小条蜂、墨西哥优弗里斯蜂、黑条蜂、火红熊蜂、紫木蜂、四纹小蜜蜂、巴西无刺蜂的 *caspase-3* 聚为一支, 金赛氏角胡蜂和黑腹果蝇寄生蜂、埃塞俄比亚微盾蜂、异角瘦蜂的 *caspase-3* 聚为一支, 而苜蓿切叶蜂和小鼠的 *caspase-3* 分别单独聚为一支 (图 5)。

2.5 西方蜜蜂工蜂不同组织中 *Am-caspase-3* 基因的表达模式

RT-qPCR 结果显示 *Am-caspase-3* 在工蜂中

肠中的表达量最高且极显著高于脑、咽下腺、触角、毒腺、表皮和脂肪体中的表达量 ($P < 0.01$), 其中在脑中的表达量最低 (图 6)。

2.6 西方蜜蜂工蜂不同发育时期 *Am-caspase-3* 基因的表达模式

在 3 日龄幼虫中, *Am-caspase-3* 的表达量达到峰值且显著高于卵及 7 日龄预蛹、8 日龄预蛹和 12 日龄蛹中的表达量 ($P < 0.01$) (图 7: A)。 *Am-caspase-3* 在 6 和 18 日龄工蜂体内的表达量相近且较高, 均显著高于 1 日龄工蜂体内的表达

量 ($P < 0.01$) (图 7: B)。

2.7 西方蜜蜂工蜂成虫应答东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中 *Am-caspase-3* 基因的表达模式

东方蜜蜂微孢子虫接种后, 工蜂成虫中肠中

Am-caspase-3 的表达水平在 1 和 13 dpi 极显著下调 ($P < 0.01$), 在 4、7 和 10 dpi 皆显著下调 ($P < 0.05$), 在接种后 4 dpi 东方蜜蜂微孢子虫对 *Am-caspase-3* 的抑制效率最大, 达到 31.8%, 在接种后 7 dpi 对 *Am-caspase-3* 抑制效率最小, 达到 9.8% (图 8)。

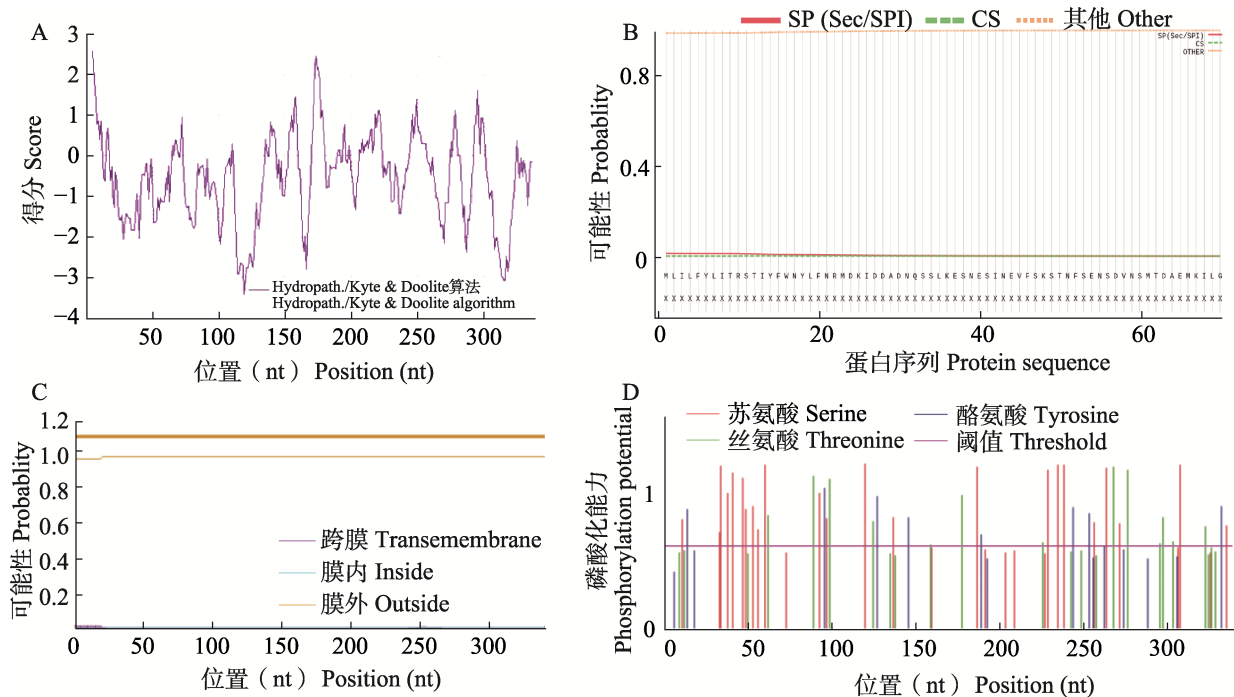


图 2 *Am-caspase-3* 蛋白的亲水性 (A)、信号肽 (B)、跨膜结构域 (C) 和磷酸化位点 (D)
Fig. 2 Hydrophilia (A), signal peptide (B), transmembrane domain (C) and phosphorylation site (D) of *Am-caspase-3* protein

SP: 信号肽 Signal peptide; CS: 切割位点 Cleavage site.

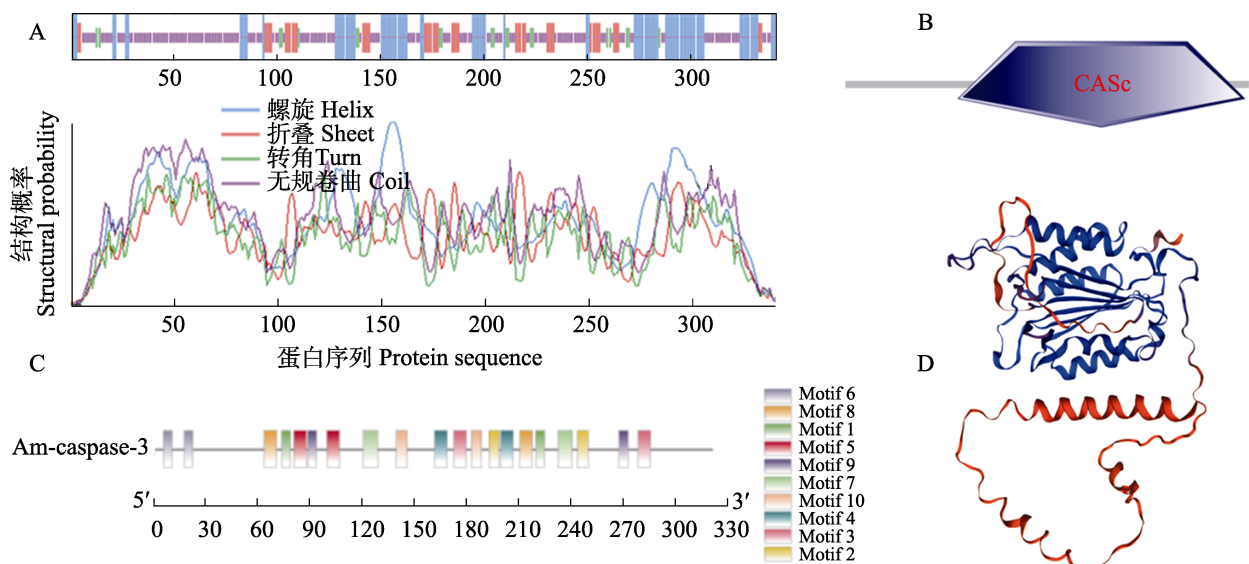


图 3 *Am-caspase-3* 蛋白的二级结构 (A)、结构域 (B)、保守基序 (C) 和三级结构 (D)
Fig. 3 Secondary structure (A), structural domain (B), conserved motif (C) and tertiary structure (D) of *Am-caspase-3* protein

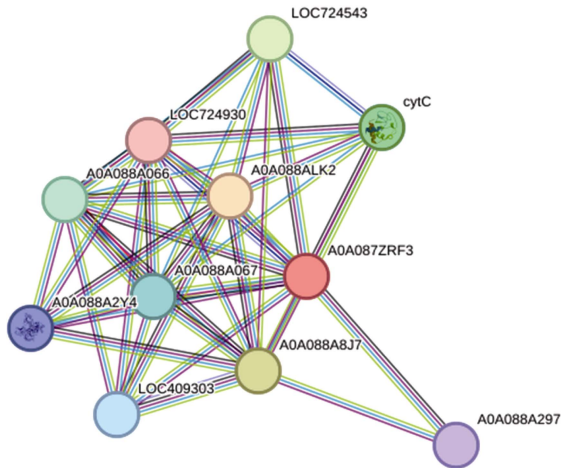


图 4 Am-caspase-3 的蛋白互作网络

Fig. 4 Protein interaction network of Am-caspase-3

2.8 西方蜜蜂工蜂幼虫应答蜜蜂球囊菌侵染过程中 *Am-caspase-3* 基因的表达模式

蜜蜂球囊菌接种后，工蜂幼虫肠道中 *Am-caspase-3* 的表达水平 1、2 和 3 dpi 均显著上调 ($P < 0.05$)，其中在接种蜜蜂球囊菌的 3 dpi 对 *Am-caspase-3* 的上调效率最大，达到 379.2%，在接种 2 dpi 的上调效率最小，为 177.7% (图 9)。

3 结论与讨论

caspase-3 作为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族的核心凋亡执行者,通过特异性切割关键细胞蛋白(如 α -fodrin、gelsolin、ICAD/DFF-45),不

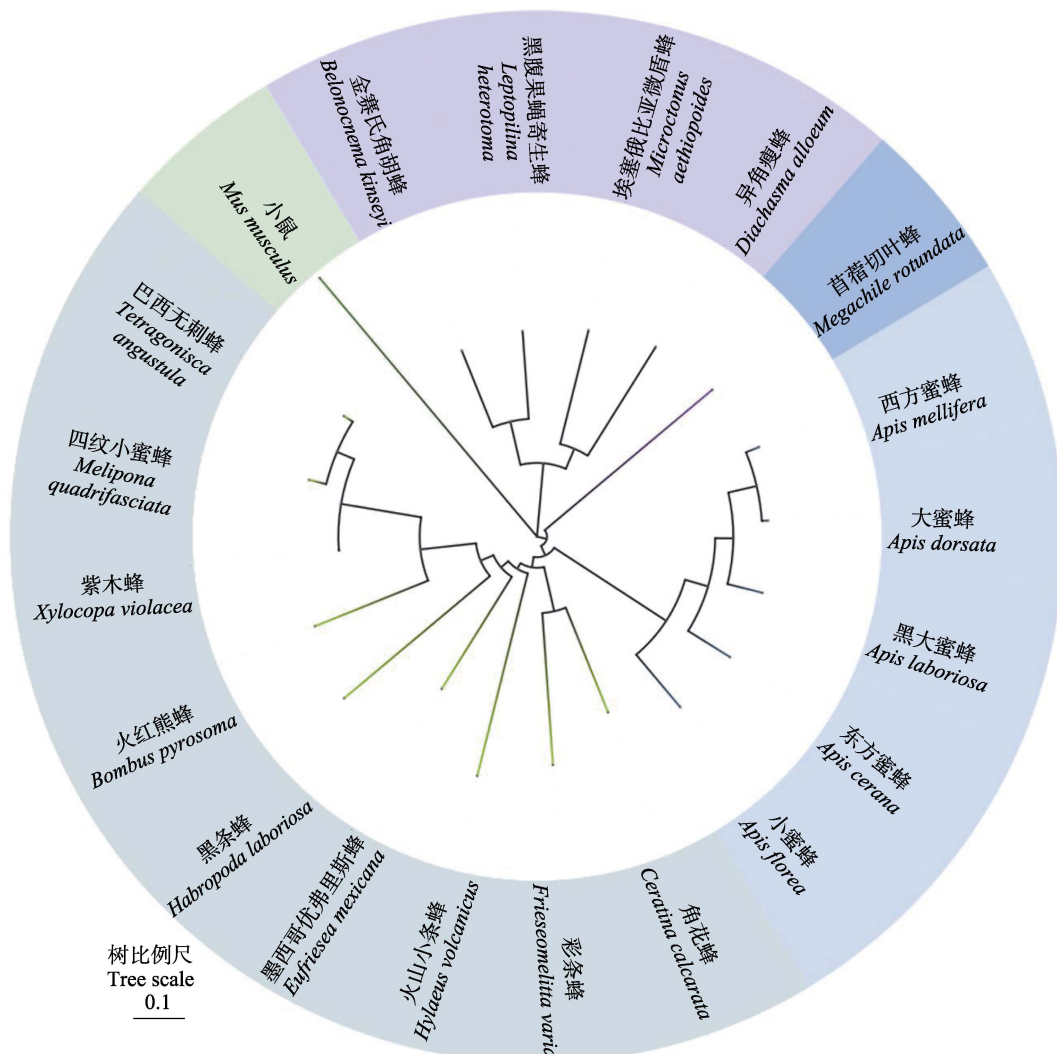


图5 基于西方蜜蜂与其他19个物种 caspase-3 蛋白氨基酸序列的系统进化树(1 000次重复)

Fig. 5 Phylogenetic tree of *Apis mellifera* and other 19 species based on amino acid sequences of caspase-3 proteins (1 000 repetitions)

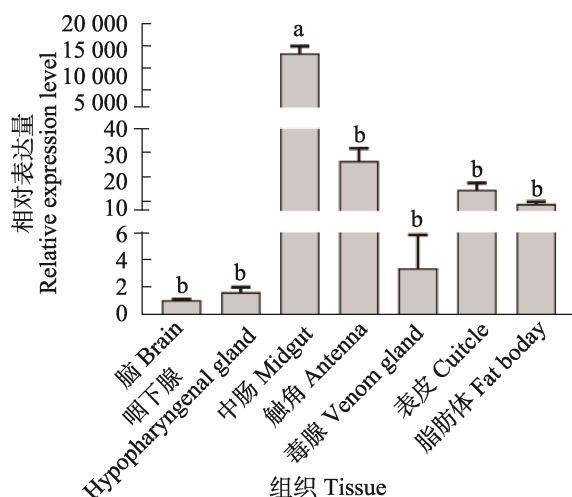


图6 *Am-caspase-3* 基因在西方蜜蜂工蜂 7 个不同组织中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *Am-caspase-3* gene in 7 different tissues of *Apis mellifera* worker

柱上标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Tukey's 多重比较检验)。图 7 同。

Different lowercase letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, Tukey's multiple range test). The same for Fig. 7.

仅驱动染色质凝聚和 DNA 断裂等凋亡终末事件, 还在组织发育和死亡信号特异性应答中发挥不可替代的作用 (Porter A and Jänicke, 1999)。此前, GeneBank 数据库收录的 *Am-caspase-3* 序

列仅为预测序列。本研究成功克隆到 *Am-caspase-3* 的 CDS (图 1: B)。生物信息学分析显示, *Am-caspase-3* 蛋白不含信号肽区域 (图 2: B) 和跨膜结构 (图 2: C), 存在 44 处潜在磷酸化位点 (图 2: D), 此外主要在细胞质发挥作用。该蛋白有 1 个保守性结构域, 是位于第 95-336 位氨基酸残基处的 CASc 结构域 (图 3: B)。Am-caspase-3 与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura caspase-3* (鲁金晶, 2015) 具有相似的亚细胞定位和 CASc 结构域, 不存在前结构域。在功能上, *caspase-3* 基因属于凋亡执行者, 处于细胞凋亡反应下游, 通过接收级联反应上游基因传递的凋亡信号, 进行裂解活化, CASc 结构域列结成大亚基和小亚基, 通过低聚反应, 聚合成凋亡相关复合物, 最后直接导致细胞凋亡, 暗示 Am-caspase-3 与 Sf-caspase-3 类似, 是一个潜在的胞内细胞凋亡执行蛋白。

Am-Caspase-3 蛋白互作网络节点数为 11 个, 边数为 42 个, 平均节点数 7.64, 平均局部聚类系数 0.897, 能与 CytC 和 LOC724543 等蛋白存在互作关系 (图 4)。在细胞凋亡过程中, CytC 具有直接介导细胞凋亡的功能, CytC 的释放启动了细胞凋亡的信号传导途径, 通过多种机制参

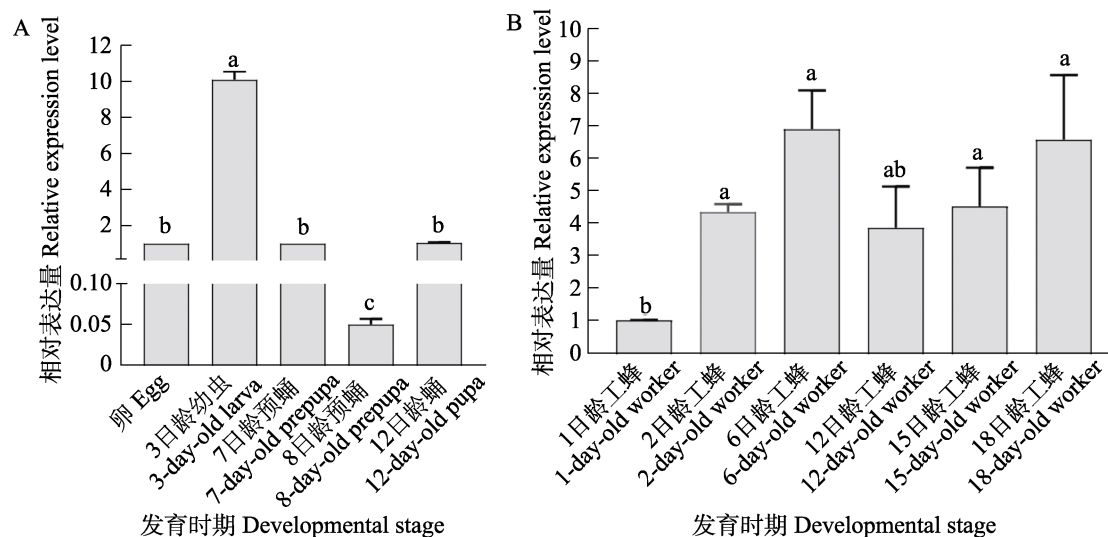


图7 *Am-caspase-3* 基因在西方蜜蜂工蜂不同发育时期的相对表达量

Fig. 7 Relative expression level of *Am-caspase-3* gene in different developmental stages of *Apis mellifera* worker

A. 卵、幼虫和蛹期相对表达量变化; B. 成虫期相对表达量变化。

A. Changes in relative expression levels at egg, larval and pupal stages;

B. Changes in relative expression levels at the adult stage.

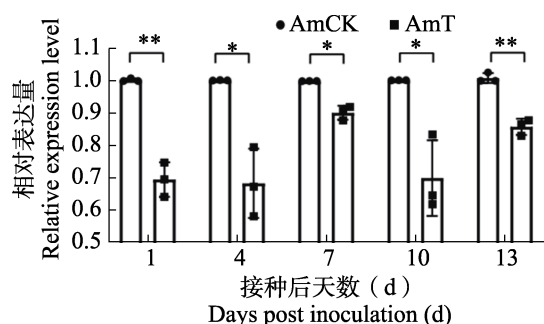


图 8 *Am-caspase-3* 基因在西方蜜蜂工蜂成虫应答东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中的相对表达量

Fig. 8 Relative expression level of *Am-caspase-3* gene in the process of response of *Apis mellifera* worker adults to *Nosema ceranae* infection

AmCK: 意大利蜜蜂对照组; AmT: 意大利蜜蜂处理组。星号表示不同处理间差异显著 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, 独立样本 t 检验)。图 9 同。

AmCK: *A. mellifera* control check group; AmT: *A. mellifera* treatment group. Asterisks above bars indicate significant difference among treatments (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, independent sample t -test). The same for Fig. 9.

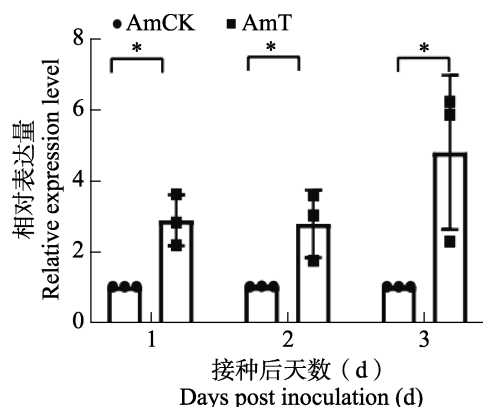


图 9 *Am-caspase-3* 基因在西方蜜蜂工蜂幼虫应答蜜蜂球囊菌侵染过程中的相对表达量

Fig. 9 Relative expression level of *Am-caspase-3* gene in the process of response of *Apis mellifera* worker larvae to *Ascosphaera apis* infection

与凋亡过程, 包括扰乱电子传递链的正常运作、阻断细胞能量的合成途径, 以及促进活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的生成 (李宏和冯有胜, 2010), 而 caspase-3 则是这一通路中的关键执行者。因此, CytC 的释放和 caspase-3 的激活共同反映了细胞凋亡的进程。

本研究发现 *Am-caspase-3* 在西方蜜蜂工蜂中肠中的表达量最高且极显著高于脑、咽下腺、

触角、毒腺、表皮和脂肪体中的表达量 (图 6)。舒本水等 (2020) 曾对 6 日龄草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 不同组织中 caspase-3 的表达水平进行检测, 发现 caspase-3 在中肠中表达量最高。昆虫中肠是细胞更新最快的组织之一, 需要动态维持一定的细胞数量以发挥功能 (Caccia et al., 2019)。细胞的更新和凋亡是一个动态平衡的过程, 凋亡细胞会被周围的细胞吞噬并分解。caspase-3 作为一种关键的凋亡执行蛋白酶, 在肠道细胞凋亡过程中起到关键作用。当肠道细胞受到刺激或损伤时, caspase-3 被激活进而诱导细胞凋亡, 从而维持肠道组织的稳态 (朱丽慧等, 2011)。因此, caspase-3 在西方蜜蜂工蜂中肠中的特异性高表达可能是为了更好地调控细胞的凋亡和更新以维持中肠组织的稳态。

在昆虫的变态发育过程中, 细胞凋亡通过清除衰老或损伤细胞及组织降解等发挥重要作用 (包希艳等, 2017; Tettamanti and Casartelli, 2019)。Sf-caspase-3 在草地贪夜蛾 3-6 日龄幼虫期表达量较高, 而在卵和蛹期表达量较低 (舒本水等, 2020)。二化螟 *Chilo suppressalis* Cs-caspase-1 和家蚕 *BmDronc* 的表达水平均在老熟幼虫期和蛹期达到峰值 (何馥晶, 2022; Zhang et al., 2013)。本研究发现, *Am-caspase-3* 在西方蜜蜂 3 日龄幼虫中的表达水平最高且极显著高于卵、7 日龄预蛹、8 日龄预蛹和 12 日龄蛹中的表达水平 (图 7: A)。鉴于幼虫期是蜜蜂组织消解与重塑的关键阶段, 推测西方蜜蜂工蜂幼虫体内 *Am-caspase-3* 的高量表达伴随着活跃的细胞凋亡, 参与组织的消解与重塑。6 日龄工蜂通常在蜂巢内分泌蜂王浆, 承担哺育幼虫的重要工作, 而 18 日龄工蜂一般从事外出采蜜采粉等工作 (曾志将, 2017)。本研究中, *Am-caspase-3* 在 6 和 18 日龄工蜂体内的表达量相近且较高, 均显著高于 1 日龄工蜂体内的表达量 (图 7: B)。这暗示 *Am-caspase-3* 参与了西方蜜蜂工蜂的职能分工, 但仍需要进一步的实验验证。

东方蜜蜂微孢子虫和蜜蜂球囊菌是两种常见的蜜蜂病原真菌, 前者专性侵染蜜蜂成虫中肠上皮细胞导致蜜蜂微孢子虫病, 后者专性侵染蜜

蜂幼虫引发白垩病, 均给养蜂业造成较大损失(梁勤和陈大福, 2009)。Higes 等(2013)通过 TUNEL 和免疫组化检测发现东方蜜蜂微孢子虫侵染的西方蜜蜂工蜂中肠上皮细胞凋亡指数低于未受侵染的工蜂, 表明东方蜜蜂微孢子虫可抑制宿主细胞的凋亡过程。Kurze 等(2018)通过对比东方蜜蜂微孢子虫感染下敏感蜜蜂与耐受性蜜蜂中肠不同区域凋亡细胞数量的变化也证实了东方蜜蜂微孢子虫对蜜蜂宿主细胞凋亡的抑制作用。本研究发现, 东方蜜蜂微孢子虫接种后, 西方蜜蜂工蜂成虫中肠中 *Am-caspase-3* 的表达水平在 1、4、7、10 和 13 dpi 均显著下调(图 8)。这表明东方蜜蜂微孢子虫抑制了西方蜜蜂工蜂中肠中 *Am-caspase-3* 的表达。考虑到 *caspase-3* 在细胞凋亡过程中的重要性, 推测东方蜜蜂微孢子虫通过下调 *Am-caspase-3* 的表达水平抑制西方蜜蜂工蜂中肠上皮细胞的凋亡, 进而延长宿主细胞的存活时间以利于自身增殖。本研究中, 蜜蜂球囊菌接种后工蜂幼虫肠道中 *Am-caspase-3* 的表达水平在 1、2 和 3 dpi 均显著上调(图 9), 说明蜜蜂球囊菌侵染激活了宿主 *Am-caspase-3* 的表达。本团队前期研究发现西方蜜蜂工蜂幼虫与蜜蜂球囊菌之间存在复杂的相互作用, 并系统解析了二者互作中的表观调控作用(Ye *et al.*, 2022)。推测幼虫通过上调 *Am-caspase-3* 的表达量增强细胞凋亡以抵抗蜜蜂球囊菌的侵染。下一步拟通过 RNAi 明确西方蜜蜂工蜂幼虫-蜜蜂球囊菌互作中 *Am-caspase-3* 的分子功能。

参考文献 (References)

- Bao XY, Chen P, Liu TH, Wang L, Liu WB, Pan MH, Lu C, 2017. Advances in apoptosis-related genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 60(4): 487–498. [包希艳, 陈鹏, 刘太行, 王腊, 刘文波, 潘敏慧, 鲁成, 2017. 家蚕凋亡相关基因研究进展. 昆虫学报, 60(4): 487–498.]
- Caccia S, Casartelli M, Tettamanti G, 2019. The amazing complexity of insect midgut cells: Types, peculiarities, and functions. *Cell and Tissue Research*, 377(3): 505–525.
- Chen DF, Du Y, Chen HZ, Fan YC, Fan XX, Zhu ZW, Wang J, Xiong CL, Zheng YZ, Hou CS, Diao QY, Guo R, 2019. Comparative identification of microRNAs in *Apis cerana cerana* workers' midguts in response to *Nosema ceranae* invasion. *Insects*, 10(9): 258–280.
- Cheng CH, Liu XZ, Ma HL, Liu GX, Deng YQ, Feng J, Jie YK, Guo ZX, 2021. The role of caspase 3 in the mud crab (*Scylla paramamosain*) after *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 118: 213–218.
- Guo YL, Yu KJ, Zhao X, Qian JJ, Zhao HD, Zhang J, Zhang Y, Zhao HX, Xu XJ, Luo Q, Chen DF, Guo R, 2022. Bioinformatic analysis and functional study of nkd gene in larvae of *Apis mellifera ligustica* workers. *Acta Microbiologia Sinica*, 62(12): 5005–5017. [郭意龙, 余岢骏, 赵萧, 钱加珩, 赵浩东, 张婕, 张扬, 赵红霞, 徐细建, 骆群, 陈大福, 郭睿, 2022. 意大利蜜蜂工蜂幼虫 nkd 基因的生物信息学分析及功能研究. 微生物学报, 62(12): 5005–5017.]
- He FJ, 2022. Characteristics of high temperature response of *Cotesia chilonis* and construction of RNAi system of temperature response genes. Master dissertation. Yangzhou: Yangzhou University. [何馥晶, 2022. 二化螟盘绒茧蜂高温响应特性及温度响应基因 RNAi 体系的构建. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学]
- Higes M, Juarranz Á, Dias-Almeida J, Lucena S, Bot í as C, Meana A, García-Palencia P, Martí n-Hernández R, 2013. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, 5(4): 530–536.
- Khoa DB, Takeda M, 2012. Expression analysis of inhibitor of apoptosis and related caspases in the midgut and silk gland of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during metamorphosis and under starvation. *Gene*, 510(2): 133–141.
- Kurze C, Le Conte Y, Kryger P, Lewkowski O, Müller T, Moritz RFA, 2018. Infection dynamics of *Nosema ceranae* in honey bee midgut and host cell apoptosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 154: 1–4.
- Li H, Feng YS, 2010. Mechanism of mitochondria CytC release and its action on apoptosis. *Chinese Journal of Bioinformatics*, 8(3): 210–213. [李宏, 冯有胜, 2010. 线粒体 CytC 的释放机制及其在细胞凋亡中的作用. 生物信息学, 8(3): 210–213.]
- Liang Q, Chen DF, 2009. Bee Protect. Second edition. Beijing: China Agriculture Press. 5–7. [梁勤, 陈大福, 2009. 蜜蜂保护学. 第二版. 北京: 中国农业出版社. 5–7.]
- Liu XY, Liu ZT, Jing X, Feng PL, Gao XZ, Wu Y, Li QM, Fan N, Chen DF, Fu ZM, Guo R, 2024. Molecular cloning and expression pattern determination of *AmMETTL3* gene in *Apis mellifera ligustica*. *Journal of China Agricultural University*, 29(1): 99–108. [刘小玉, 刘治滩, 荆欣, 冯佩林, 高旭泽, 吴鹰, 李琪明, 樊念, 陈大福, 付中民, 郭睿, 2024. 意大利蜜蜂

- AmMETTL3 基因的分子克隆与表达模式. 中国农业大学学报, 29(1): 99–108.]
- Lu JJ, 2015. Gene cloning, prokaryotic expression and activity analysis of Caspase-3 and Caspase-6 protein from cotton leafworm, *Spodoptera litura*. Doctor dissertation. Wuhan: Central China Normal University. [鲁金晶, 2015. 斜纹夜蛾 Caspase-3、Caspase-6 的基因克隆、原核表达及活性分析. 博士学位论文. 武汉: 华中师范大学.]
- Newton K, Strasser A, Kayagaki N, Dixit VM, 2024. Cell death. *Cell*, 187(2): 235–256.
- Odonkor CA, Achilefu S, 2009. Modulation of effector caspase cleavage determines response of breast and lung tumor cell lines to chemotherapy. *Cancer Invest*, 27(4): 417–429.
- Parthasarathy R, Palli SR, 2007. Developmental and hormonal regulation of midgut remodeling in a lepidopteran insect, *Heliothis virescens*. *Mechanisms Development*, 124(1): 23–34.
- Porter AG, Jänicke RU, 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6(2): 99–104.
- Shahidi-Noghabi S, Van Damme EJM, Mahdian K, Smagghe G, 2010. Entomotoxic action of *Sambucus nigra* agglutinin I in *Acyrtosiphon pisum* aphids and *Spodoptera exigua* caterpillars through caspase-3-like-dependent apoptosis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 75(3): 207–220.
- Shu BS, Zhong HX, Feng J, Hong YF, Lin JT, 2020. Cloning and expression analysis of caspase-3 in *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Environmental Entomology*, 42(6): 1352–1360. [舒本水, 钟宏新, 冯杰, 洪一峰, 林进添, 2020. 草地贪夜蛾半胱氨酸蛋白酶 *Sf-caspase-3* 基因克隆与表达分析. 环境昆虫学报, 42(6): 1352–1360.]
- Tettamanti G, Casartelli M, 2019. Cell death during complete metamorphosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1783): 20190065.
- Vishwanathreddy H, Bhat GG, Inamdar SR, Gudihal RK, Swamy BM, 2014. *Sclerotium rolfsii* lectin exerts insecticidal activity on *Spodoptera litura* larvae by binding to membrane proteins of midgut epithelial cells and triggering caspase-3-dependent apoptosis. *Toxicon*, 78: 47–57.
- Vu T, Pham T, Li ML, 2016. Isolation and expression of caspase-3 genes in different development stages, tissues and treatments of the *Dastarcus helophoroides* (Fairmaire) (Coleoptera: Bothrioderidae). *Research Journal of Biotechnology*, 11(7): 1–10.
- Wang C, 2019. Role of apoptosis in the interactions between whitefly and tomato yellow leaf curl virus and the underlying mechanisms. Master dissertation. Hangzhou: Zhejiang University. [王超, 2019. 细胞凋亡在烟粉虱——番茄黄曲叶病毒互作中的作用及机制. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学.]
- Wu Y, Liu ZT, Zhao HD, Guo SJ, Liu XY, Zhang YQ, Feng PL, Zhao HX, Xu XJ, Chen DF, Guo R, 2023. Gene cloning, polyclonal antibody preparation, and expression pattern of m⁶A methyltransferase in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 66(7): 885–895. [吴鹰, 刘治滩, 赵浩东, 郭思佳, 刘小玉, 张艺琼, 冯佩林, 赵红霞, 徐细建, 陈大福, 付中民, 郭睿, 2023. 西方蜜蜂 m⁶A 甲基转移酶的基因克隆、多克隆抗体制备及表达模式. 昆虫学报, 66(7): 885–895.]
- Xiong CL, Du Y, Feng RR, Jiang HB, Shi XY, Wang HP, Fan XX, Wang J, Zhu ZW, Fan YC, Chen HZ, Zhou DD, Zheng YZ, Chen DF, Guo R, 2020. Differential expression pattern and regulation network of microRNAs in *Ascosphaera apis* invading *Apis cerana cerana* 6-day-old larvae. *Acta Microbiologica Sinica*, 60(5): 992–1009. [熊翠玲, 杜宇, 冯睿蓉, 蒋海宾, 史小玉, 王海朋, 范小雪, 王杰, 祝智威, 范元婵, 陈华枝, 周丁丁, 郑燕珍, 陈大福, 郭睿, 2020. 侵染中华蜜蜂 6 日龄幼虫的蜜蜂球囊菌的微小 RNA 差异表达谱及调控网络. 微生物学报, 60(5): 992–1009.]
- Ye YP, Fan XX, Cai ZB, Wu Y, Zhang WD, Zhao HD, Guo SJ, Feng PL, Li QM, Zou PY, Chen MJ, Fan N, Chen DF, Guo R, 2022. Unveiling the circRNA-mediated immune responses of western honey bee larvae to *Ascosphaera apis* invasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1): 613.
- Zeng ZJ, 2017. Beekeeping. Third edition. Beijing: China Agriculture Press. 11. [曾志将, 2017. 养蜂学第三版. 北京: 中国农业出版社. 11.]
- Zhang Y, Cook A, Kim J, Baranov SV, Jiang JY, Smith K, Cormier K, Bennett E, Browner RP, Day AL, Carlisle DL, Ferrante RJ, Wang X, Friedlander RM, 2013. Melatonin inhibits the caspase-1/cytochrome c/caspase-3 cell death pathway, inhibits MT1 receptor loss and delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology Disease*, 55: 26–35.
- Zhu LH, Xu JX, Chen XL, 2011. Relationship between apoptosis and intestinal functions. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 23(11): 1862–1869. [朱丽慧, 徐建雄, 陈小连, 2011. 细胞凋亡与肠道功能的关系. 动物营养学报, 23(11): 1862–1869.]