

微孢子虫感染下意大利蜜蜂谷胱甘肽降解酶基因 *AmCHAC2* 的表达分析*

陈兰春, 秦启倩, 曾慧妮, 张毅, 王菲, 王悦弟, 李治

(重庆师范大学 生命科学学院 媒介昆虫重庆市高校重点实验室, 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】通过生物信息学鉴定意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)谷胱甘肽特异性 γ -谷氨酰环转移酶2(*AmCHAC2*),并通过定量PCR分析该蛋白的编码基因*AmCHAC2*在意大利蜜蜂组织中的时空表达特征,探讨该基因在蜜蜂抵抗微孢子虫感染中的作用。【方法】采用多重序列比对分析*AmCHAC2*的氨基酸序列特征和结构域组成;在线预测该蛋白的结构、互作蛋白网络、细胞定位特征和功能;构建系统进化树分析该蛋白的系统分类和进化关系;实时定量PCR分析*AmCHAC2*在供试蜜蜂组织中的时空表达特征;采用试剂盒检测分析供试蜜蜂组织谷胱甘肽含量的表达特征;采用ELISA法检测分析供试蜜蜂中肠活性氧含量。【结果】*AmCHAC2*由245个氨基酸残基组成,相对分子质量为28.3 kDa, pI为6.71。*AmCHAC2*为疏水蛋白,不具备信号肽,定位于细胞质。供试蜜蜂在感染东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)14 d后大量死亡,存活率仅为23%;与对照组相比,感染微孢子虫的供试蜜蜂胸部和中肠组织中*AmCHAC2*表达明显上调,GSH含量明显下降,且中肠内活性氧含量明显上升而触发氧化应激。【结论】*AmCHAC2*在受到东方蜜蜂微孢子虫感染后表达上调,这可能在意大利蜜蜂抵抗微孢子虫感染过程中扮演着重要角色。

关键词:谷胱甘肽特异性 γ -谷氨酰环转移酶;东方蜜蜂微孢子虫;意大利蜜蜂

中图分类号:Q966

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2023)02-0043-11

谷胱甘肽(GSH)是一种重要的非酶类抗氧化剂^[1],在清除机体活性氧中起着关键作用^[2]。GSH耗竭与细胞凋亡紧密相关^[3]。低水平的GSH与肿瘤等疾病密切相关^[4],但高水平的GSH对细胞却是有害的^[5-8]。GSH降解在GSH和氧化还原稳态中起重要作用。因此,机体内的GSH水平受到严格调节,以维持GSH稳态。谷胱甘肽特异性 γ -谷氨酰环转移酶(CHAC)是GSH的降解酶,在胞质中特异性作用于GSH的 γ -谷氨酰基团,将GSH降解为5-L-氧丙噻和胱氨酰-甘氨酸^[9-11],由此参与生物体内GSH稳态的调节。CHAC由CHAC1和CHAC2两个成员组成,二者竞争以维持GSH稳态。CHAC2对GSH的降解速率是CHAC1对GSH的降解速率的5%~10%。CHAC2能够以剂量依赖的方式抑制CHAC1对GSH的过度降解^[9]。编码CHAC2的基因即CHAC2的表达水平上调会让GSH被过度降解,导致癌细胞抗氧化不足,触发活性氧大量产生和氧化应激,从而诱发癌细胞的凋亡^[12]。此外,CHAC2不仅能降解GSH,还是抗氧化剂主要调节因子NRF2的上游调节器,它通过靶向NRF2上调谷氨酸半胱氨酸连接酶(GCL)的合成来增强GSH的产生^[9]。不仅如此,通过上调CHAC2表达水平来激活NRF2还能够减轻由乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤^[13]。

蜜蜂(Apidae)是十分重要的资源昆虫,在作物授粉和生物多样性保护方面发挥着重要作用^[14]。然而有研究报告显示,欧洲、北美洲和亚洲的蜜蜂种群因东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)感染而大规模死亡^[15-16]。东方蜜蜂微孢子虫是一种高度特化的真菌,寄生于蜜蜂中肠上皮细胞^[17],抑制宿主免疫应答^[18],破坏肠道氧化还原平衡,导致活性氧累积的氧化应激,造成脂质和蛋白质损伤^[19-20],最终导致蜜蜂大量死亡。鉴于GSH在机体清除活性氧中起着至关重要作用且CHAC2的大量表达不利于GSH的抗氧化作用,加上CHAC2在蜜蜂抵抗微

* 收稿日期:2022-06-28 修回日期:2022-08-20 网络出版时间:2023-04-20T17:13

资助项目:国家自然科学基金面上项目(No. 31101770;No. 31302037);重庆市教育委员会科学技术研究重点项目(No. KJZD-K202100502);重庆市自然科学基金面上项目(No. cstc2021jcyj-msxmX0422);重庆高校创新研究群体项目(No. CXQT21013);重庆市大学生创新创业训练计划项目(国家级)(No. 202110637013)

第一作者简介:陈兰春,女,研究方向为动物学,E-mail:1277309553@qq.com;通信作者:李治,男,副教授,博士,E-mail:lizhicqn@gmail.com

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20230420.1334.014.html

孢子虫感染引发的氧化应激中是否发挥重要作用至今仍未有明确报道;因此本研究通过生物信息学方法鉴定了意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)的 CHAC2(后文简称 AmCHAC2),并通过定量 PCR 分析了该蜂种在受到东方蜜蜂微孢子虫感染后体内不同组织中编码该蛋白的基因即 *AmCHAC2* 的表达特征,以及不同组织中的 *AmCHAC2* 相对表达水平与 GSH、活性氧含量之间的关系,由此探讨了 *AmCHAC2* 在意大利蜜蜂抵抗微孢子虫感染过程中扮演的角色。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

供试意大利蜜蜂由重庆师范大学资源昆虫与病原微生物学实验室饲养。饲养温度为 29~32℃,相对湿度为 50%~70%,以质量分数为 50%的蔗糖溶液和花粉浆作为口粮。

实验所用试剂 Trizol(货品编号:AG21102)、cDNA Synthesis Kit(货品编号:AG11728)反转录试剂盒等购于艾科瑞生物工程有限公司,DEPC 水(货品编号:B501005)购于生工生物工程(上海)股份有限公司,氯仿、异丙醇等试剂购于重庆川东化工(集团)有限公司,qPCR Mix (SYBR Green I) (货品编号:TSE201)购于北京擎科生物有限公司,GSH 含量检测试剂盒(货品编号:G0206W)购于苏州格锐思生物科技有限公司,活性氧簇(ROS) ELISA 检测试剂盒(货品编号:A022928)购于上海纪宇生物科技有限公司。

1.2 AmCHAC2 的氨基酸序列特征和系统进化分析

在 NCBI 中下载 AmCHAC2 的氨基酸序列(GenBank 收录号:XP_026299744.1)。使用 NCBI 蛋白保守区数据库预测 AmCHAC2 的保守功能结构域;通过 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)、Portscale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 在线分析该蛋白的理化性质;使用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测该蛋白的跨膜结构;通过 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析该蛋白是否为分泌型蛋白;使用 NetNGlyc(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>)在线预测该蛋白的 N-糖基化位点;使用 NetOGlyc(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetOGlyc-4.0>)在线预测该蛋白的 O-糖基化位点;利用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)在线预测该蛋白的二级结构;利用 Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)在线预测该蛋白的三级结构;运用 PSORT II (<https://psort.hgc.jp/form2.html>)在线预测蛋白的亚细胞定位特征;采用 STRING(<https://string-db.org/>)在线预测蛋白互作网络。此外,在 NCBI 中下载不同物种(表 1)的 CHAC2 的氨基酸序列并与 AmCHAC2 在 MUSCLE 软件进行氨基酸序列多重比对,分析保守氨基酸序列,比对结果通过 MEGA 7.0.14 软件以邻接法构建系统进化树。

1.3 微孢子虫感染处理和存活统计

在温度为 30℃、相对湿度为 55%的恒温恒湿培养箱中孵化封盖子脾获取出房工蜂,于实验室饲养 7 d 后进行 CO₂ 麻醉处理,并转移到 48 孔细胞培养板中进行微孢子虫感染实验。实验设置 1 个不进行微孢子虫感染的对照组(CK 组)和 1 个进行微孢子虫感染的处理组(TG 组),每个组设 3 个生物学重复,每个重复有 50 只蜜蜂。供试蜜蜂首先被禁食 3 h,然后给 TG 组每只蜜蜂饲喂 3 μL 含 1×10⁵ 个东方蜜蜂微孢子虫的质量分数为 50%的蔗糖溶液,CK 组蜜蜂则每只饲喂 3 μL 质量分数为 50%的蔗糖溶液。微孢子虫感染实验持续 14 d,每日记录供试蜜蜂的存活情况并移除死亡的供试蜜蜂,在此期间保证它们获得充足的饮水和食物。取实验进行至第 14 d 的供试蜜蜂样本用于测定 *AmCHAC2* 表达、GSH 含量和活性氧含量。采用 GraphPad 软件进行蜜蜂生存分析,以该软件中的 Log-rank (Mantel-Cox) test 对有关数据进行统计检验。当 $p < 0.05$ 时,检验结果具有统计学意义。

1.4 AmCHAC2 和东方蜜蜂微孢子虫 16S rRNA 基因的荧光定量 PCR 分析

分别取供试蜜蜂的头、胸、中肠、脂肪体等 4 个组织,采用 Trizol 法提取各组织 RNA 并反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,以基因 *RP49* (引物 *RP49*-F:5'-CGTCATATGTTGCCAACTGGT-3',引物 *RP49*-R:5'-TTG-AGCACGTTCAACAATGG-3')为内参,对 *AmCHAC2* (引物 *AmCHAC2*-F:5'-AATCACCAGGCGAAAGT-GGG-3',引物 *AmCHAC2*-R:5'-GATTTGACAAGCGCGACACG-3')和微孢子虫 16S rRNA 基因(引物 16S rRNA-F:5'-CGGATAAA-AGAGTCCGTTACC-3',引物 16S rRNA-R:5'-TGAGCAGGGTTCTAGGGAT-3')进行实时荧光定量 PCR 分析。构建 PCR 反应体系如下:依次加入 10 μL 2×T5 Fast qPCR Mix、1 μL 质量浓度

为 $150\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 cDNA、浓度为 $0.2\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上下游引物各 $0.8\text{ }\mu\text{L}$,最后加入 $7.4\text{ }\mu\text{L}$ 双蒸水使反应体系总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 程序分为两步:第 1 步为扩增程序,即 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min ,共 40 个循环的 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s 、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 15 s 。第 2 步为溶解曲线分析:从 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 每 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 读数 1 次。整个反应程序在 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行。*AmCHAC2* 的实时荧光定量 PCR 表达分析中 CK 组和 TG 组分别设有 3 个生物学重复,每个生物学重复同时设有 4 个技术重复。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *AmCHAC2* 的相对表达量。

表 1 典型物种 CHAC2 的氨基酸序列信息
Tab. 1 Amino acid sequence information of typical species CHAC2

编号	物种	GenBank 登录号	编号	物种	GenBank 登录号
1	意大利蜜蜂 (<i>A. mellifera ligustica</i>)	XP_026299743.1	15	白纹伊蚊 (<i>Aedes albopictus</i>)	XP_019529944.1
2	小蜜蜂 (<i>Apis florea</i>)	XP_012339582.1	16	淡色库蚊 (<i>Culex pipiens pallens</i>)	XP_039437959.1
3	大蜜蜂 (<i>Apis dorsata</i>)	XP_006614309.1	17	人 (<i>Homo sapiens</i>)	NP_001008708.1
4	中华蜜蜂 (<i>Apis cerana cerana</i>)	XP_028521168.1	18	黑猩猩 (<i>Pan troglodytes</i>)	XP_515472.2
5	美洲东部熊蜂 (<i>Bombus impatiens</i>)	XP_003488209.1	19	阿奴比斯狒狒 (<i>Papio anubis</i>)	XP_031511011.1
6	白蜡窄吉丁 (<i>Agrilus planipennis</i>)	XP_018330367.1	20	棱皮龟 (<i>Dermochelys coriacea</i>)	XP_038250489.1
7	黑拟谷盗 (<i>Tribolium madens</i>)	XP_044257332.1	21	鲑鱼 (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	XP_024264493.2
8	黄粉虫 (<i>Tenebrio molitor</i>)	CAG9032139.1	22	多氏花鲈鱼 (<i>Poecilia formosa</i>)	XP_007562468.1
9	云南扁萤 (<i>Lamprigera yunnana</i>)	KAF5283366.1	23	阿肯色镖鲈 (<i>Etheostoma cragini</i>)	XP_034716406.1
10	萤火虫 (<i>Photinus pyralis</i>)	XP_031336874.1	24	红点鲑 (<i>Salvelinus namaycush</i>)	XP_038843435.1
11	隐白蚁 (<i>Cryptotermes secundus</i>)	PNF23577.1	25	安氏蜂鸟 (<i>Calypte anna</i>)	XP_030304190.1
12	德国小蠊 (<i>Blattella germanica</i>)	PSN39926.1	26	船嘴鹭 (<i>Cochlearius cochlearius</i>)	NXE75715.1
13	湿木白蚁 (<i>Zootermopsis nevadensis</i>)	XP_021938521.1	27	红冠鸚 (<i>Lophotis ruficrista</i>)	NXE05044.1
14	埃及伊蚊 (<i>Aedes aegypti</i>)	XP_001662226.1	28	小须凤头雨燕 (<i>Hemiprocne comata</i>)	NXG63880.1

1.5 GSH 含量测定

分别取供试蜜蜂的头、胸、中肠、脂肪体等 4 个组织,并测定它们的质量,加入 GSH 含量检测试剂盒内的提取液($m_{\text{组织}}:V_{\text{提取液}}=1\text{ g}:20\text{ mL}$),以 70 Hz 的频率匀浆 180 s ,然后以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,取上清液,并放置于冰上待测。使用 GSH 含量检测试剂盒按如下步骤测定供试蜜蜂各组织的 GSH 含量:1) 设置标准品孔、样本孔和对照孔,在标准品孔中各加不同浓度的 GSH 标准品 $20\text{ }\mu\text{L}$,在样本孔和对照孔中加入供试样本

20 μL 。2) 在标准品孔和样本孔中加入试剂一 120 μL , 在对照孔中加入试剂一 160 μL 。3) 在标准品孔和样本孔中加入试剂二 40 μL , 对照孔不加, 立即混匀, 静置 5 min。4) 分别读取各孔中混合溶液在 $\lambda=412\text{ nm}$ 处的 OD 值。5) 绘制标准曲线: 在 Excel 工作表中以 GSH 标准品浓度为横坐标、与之对应的 OD 值作纵坐标, 绘制出 GSH 标准品的浓度-OD 值标准曲线并求得回归方程, 按回归方程计算供试蜜蜂各组织样本中 GSH 含量(以浓度计, 单位: $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

1.6 活性氧含量测定

测定每只蜜蜂的中肠质量, 加入生理盐水($m_{\text{组织}} : V_{\text{生理盐水}} = 1\text{ g} : 20\text{ mL}$), 以 70 Hz 的频率匀浆 180 s, 再以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后取上清液。随后用活性氧簇(ROS)ELISA 检测试剂盒按以下步骤测定供试蜜蜂各组织的活性氧含量: 1) 从室温平衡 20 min 后的铝箔袋中取出所需板条, 剩余板条用自封袋密封放回 4 $^{\circ}\text{C}$ 。2) 设置标准品孔和样本孔, 在标准品孔中各加不同质量浓度的活性氧标准品 50 μL , 在样本孔中先后加入 10 μL 待测样本和 40 μL 样本稀释液, 空白孔不加任何样本或试剂。3) 除空白孔外, 在标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μL , 用封板膜封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅或恒温箱温育 60 min; 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液, 静置 1 min, 倒去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 5 次; 每孔内加入底物 A、B 各 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min; 每孔内加入终止液 50 μL 。4) 在 15 min 内, 测定各孔中混合溶液在 $\lambda=450\text{ nm}$ 处的 OD 值。5) 绘制标准曲线: 在 Excel 工作表中以活性氧标准品质量浓度作横坐标, 与之对应的 OD 值作纵坐标, 绘制出活性氧标准品的质量浓度-OD 值标准曲线并求得回归方程, 按回归方程计算供试蜜蜂各组织样本中活性氧含量(以质量浓度计, 单位: $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.7 数据统计

实验所得数据以“平均值 $\pm$ 标准误”表示。采用 t -检验分析 CK 组和 TG 组数据的组间差异, 当 $p < 0.05$ 时, 检验结果具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 AmCHAC2 的序列特征

2.1.1 理化性质

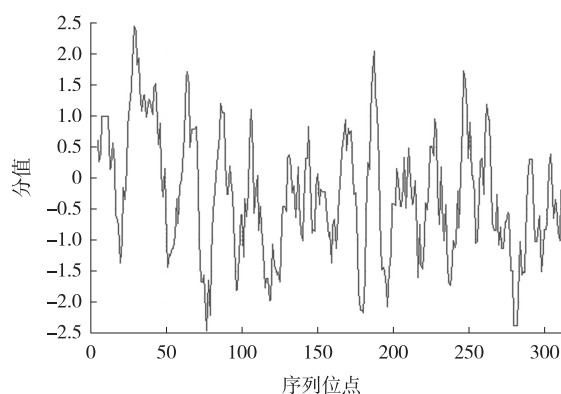
AmCHAC2 含有 245 个氨基酸残基, 分子式为 $\text{C}_{1257}\text{H}_{1943}\text{N}_{353}\text{O}_{368}\text{S}_{12}$, 相对分子质量为 28.3 kDa, pI 为 6.71, 带负电荷氨基酸残基(天冬氨酸+谷氨酸)为 30 个, 带正电荷氨基酸残基(精氨酸+赖氨酸)为 29 个。该蛋白不稳定指数为 46.58, 为不稳定蛋白; 它的脂肪族指数为 77.96, 总平均亲水系数预测为 -0.487, 因此为疏水蛋白(图 1)。AmCHAC2 中天冬酰胺占比最高, 为 9.0%, 无吡咯赖氨酸和硒半胱氨酸。

2.1.2 氨基酸序列多重比对分析

NCBI 功能位点搜索(conserved domain database)结合多重序列同源性比对结果表明, AmCHAC2 与哺乳动物、鱼类、鸟类和昆虫的 CHAC2 在氨基酸序列特征上相对保守。AmCHAC2 具有 CHAC2 中有助于形成活性位点腔的严格保守位点: Tyr¹⁶、Glu¹⁷、Ser¹⁸、His⁴⁹、Arg⁵⁰、Tyr⁸⁷、Tyr¹⁴⁴ 和 Tyr²¹¹, 以及典型的 N-糖基化位点与磷酸化位点(图 2)。

2.1.3 功能域特征

磷酸化位点及糖基化位点预测结果显示, AmCHAC2 有 1 个 N-糖基化位点, 位于第 46 位氨基酸残基(图 3)。AmCHAC2 无 O-糖基化位点。此外, 该蛋白质中的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基磷酸化位点共计 18 个, 其中丝氨酸残基磷酸化位点位于第 10、30、105、181 和 228 位, 苏氨酸残基磷酸化位点位于第 47、48、52、61、81、92、102、120、206、217 和 239 位, 酪氨酸残基磷酸化位点位于第 21 和 71 位(图 4)。此外, 在线 TMHMM 软件预测结果显示, AmCHAC2 无跨膜结构域。运用 PSORT II Prediction 在线进行 AmCHAC2 的亚细胞定位预测发

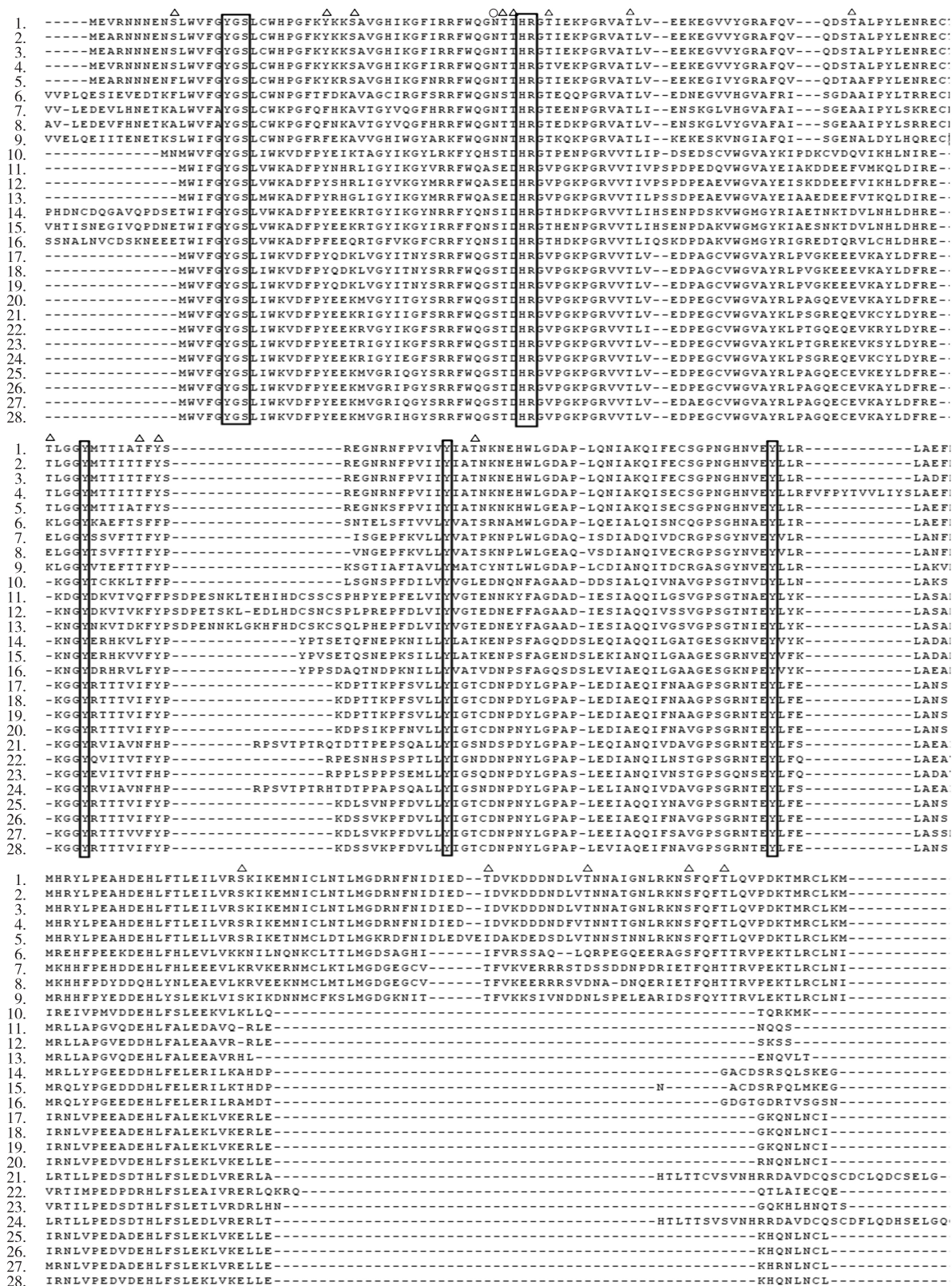


注: 高峰值表示疏水区域, 低峰值表示亲水区域。

图 1 AmCHAC2 的亲/疏水性预测分析结果

Fig. 1 The prediction results of AmCHAC2 in hydrophilic/hydrophobic

现,该蛋白可能为细胞质定位,在细胞质内发挥作用。SignalP 预测结果则表明 *AmCHAC2* 的 N 端不具有信号肽,说明它可能不属于分泌型蛋白。



注:黑色方框为 CHAC 家族有助于形成活性位点腔的严格保守位点,“△”为磷酸化位点,“○”为 N-糖基化位点,编号对应的物种学名见表 1。

图 2 *AmCHAC2* 的氨基酸序列特征和多重序列比对分析

Fig. 2 Amino acid sequence characteristics and multiple alignment of *AmCHAC2*

2.1.4 结构预测

通过 SOPMA 在线进行 AmCHAC2 的二级结构预测分析,结果发现:AmCHAC2 的无规则卷曲占比达 47.35%,7 个 α -螺旋的占比为 28.16%,C 端延伸链的占比为 21.22%,4 个 β -折叠的占比为 3.27%(图 5)。对 AmCHAC2 的三级结构预测结果则显示,该蛋白以二聚体的形式存在,这一结构与典型的 CHAC 家族成员结构模型相似度达 38.96%(图 6)。

2.1.5 功能预测

通过 STRING 蛋白质互作在线数据库对 AmCHAC2 进行分析,结果表明 CHAC2 与 5-氧脯氨酸酶(5-oxoprolinase) (GenBank 登录号: XP_006567330.1) 和 γ -谷氨酰转移酶 GGT1 (GenBank 登录号: XP_016766952.1) 存在相互作用关系(图 7)。 γ -谷氨酰转移酶和 5-氧脯氨酸酶都通过 γ -谷氨酰循环反应降解 GSH^[21]。因此,这 3 种酶可能共同参与了意大利蜜蜂体内 GSH 的降解过程。

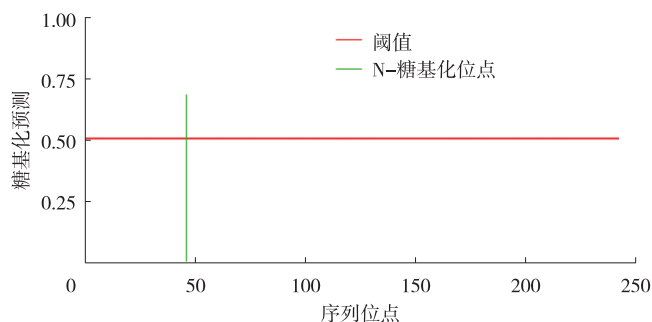


图 3 AmCHAC2 的 N-糖基化位点分析

Fig. 3 N-glycosylation sites analysis of AmCHAC2

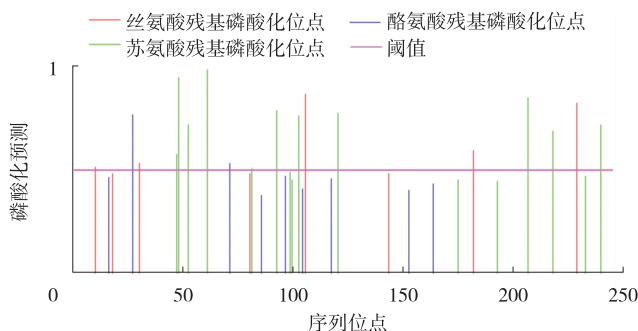
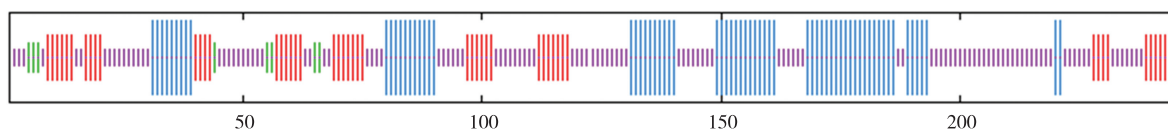


图 4 AmCHAC2 的磷酸化位点分析

Fig. 4 Phosphorylation sites analysis of AmCHAC2



注:粉线区域表示 C 段延伸链,绿线区域表示 β -折叠,红线区域表示无规则卷曲,蓝线区域表示 α -螺旋,横坐标为氨基酸序列范围。

图 5 AmCHAC2 的二级结构预测

Fig. 5 Secondary structure analysis of AmCHAC2

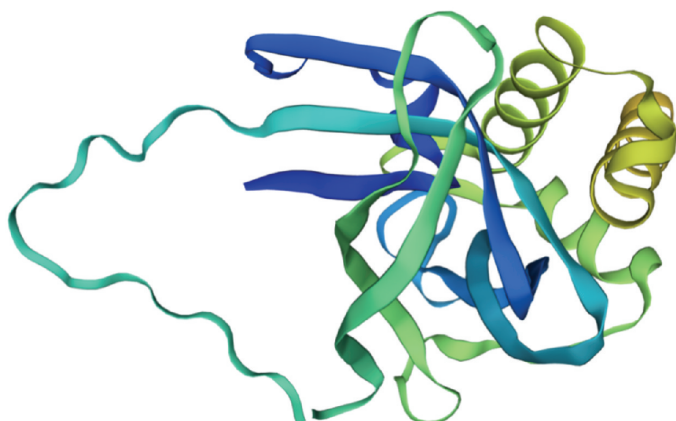
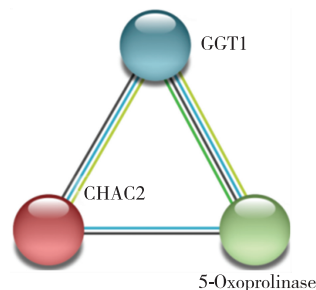


图 6 AmCHAC2 的 3D 结构模型预测

Fig. 6 3D structural model prediction of AmCHAC2



注:蓝线代表来自数据精选库,绿线代表邻域基因,蓝线代表共线的基因,黑线代表共表达的基因,黄线代表从文本挖掘证据证明的基因;线的粗细表示相互作用的置信预测度。

图 7 AmCHAC2 相互作用靶蛋白的预测

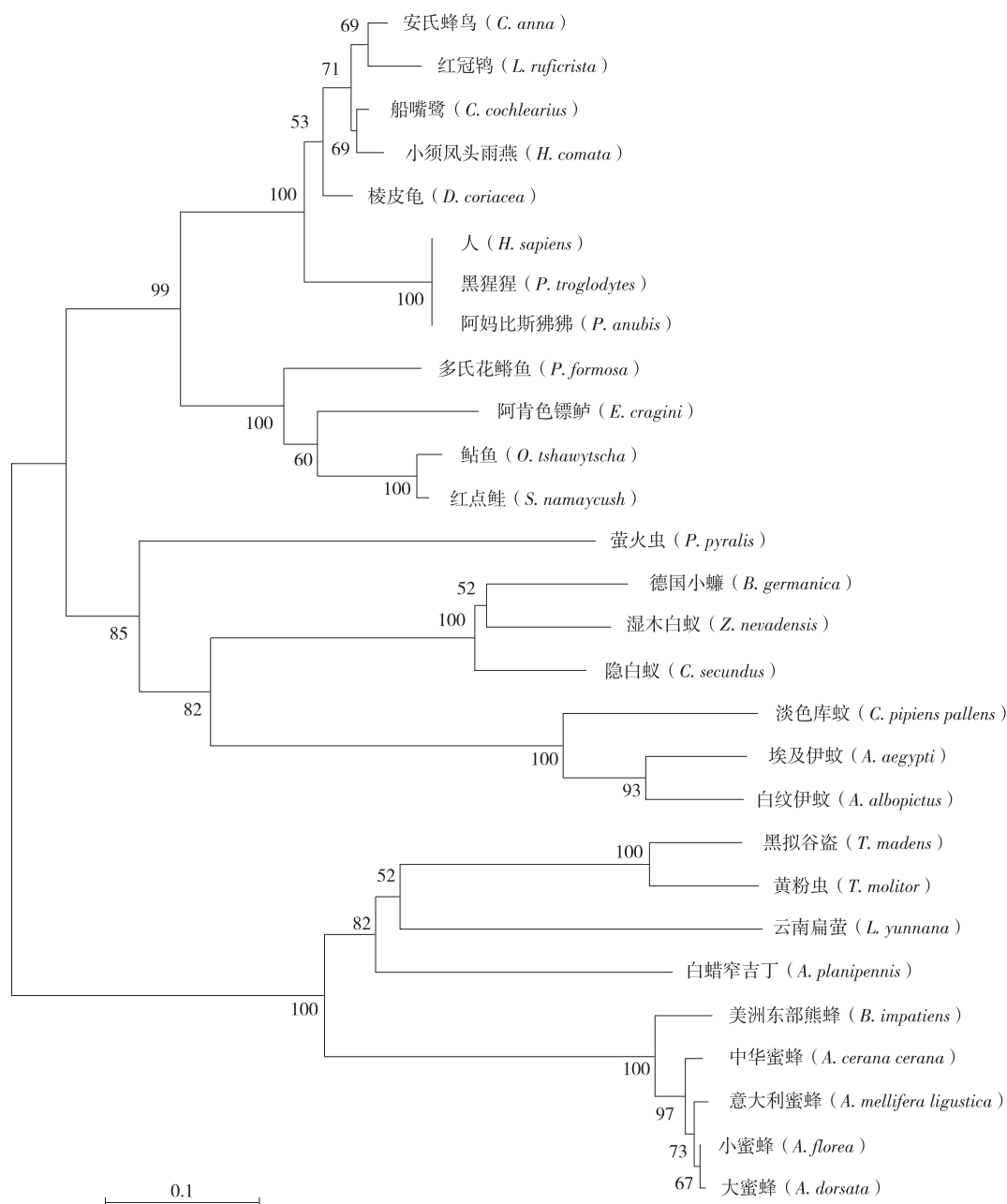
Fig. 7 Prediction of target proteins interacting with AmCHAC2

2.1.6 系统进化分析

结合昆虫、鱼类、哺乳动物和鸟类的代表物种的 CHAC2 的氨基酸序列,对 AmCHAC2 的氨基酸序列进行了聚类分析,结果如图 8 所示:AmCHAC2 在昆虫大类中与蜜蜂属(*Apis*)的 CHAC2 聚为一支,且与大蜜蜂和小蜜蜂的 CHAC2 距离最为接近。

2.2 东方蜜蜂微孢子虫感染下意大利蜜蜂的存活率

存活率分析结果表明:CK 组的存活状况较为稳定,直至实验结束(14 d 后),该组供试蜜蜂的存活率为 86%,属于自然响应频率。而 TG 组在实验进行至第 4 d 时即有供试蜜蜂死亡,且存活率随着东方蜜蜂微孢子虫的感染时间延长而急剧下降;直至实验结束时,该组供试蜜蜂的存活率仅为 23%(图 9)。



注:各物种 CHAC2 的 GenBank 登录号见表 1。

图 8 基于邻接法构建意大利蜜蜂和其他物种 CHAC2 的氨基酸序列的系统进化树

Fig. 8 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of CHAC2 from *A. mellifera ligustica* and other species constructed using neighbor-joining method

2.3 东方蜜蜂微孢子虫在蜜蜂体内的增殖情况

为探究供试蜜蜂存活率下降是否与体内微孢子虫增殖水平有关,通过荧光定量 PCR 检测分析蜜蜂体内东方蜜蜂微孢子虫 16Sr RNA 基因的相对表达情况,结果提示 TG 组被感染蜜蜂体内东方蜜蜂微孢子虫大量增殖(图 10)。

2.4 东方蜜蜂微孢子虫感染下蜜蜂不同组织中 *AmCHAC2* 的表达分析

荧光定量 PCR 检测分析结果(图 11)表明:与 CK 组相比,TG 组供试蜜蜂胸部和中肠的 *AmCHAC2* 的表达

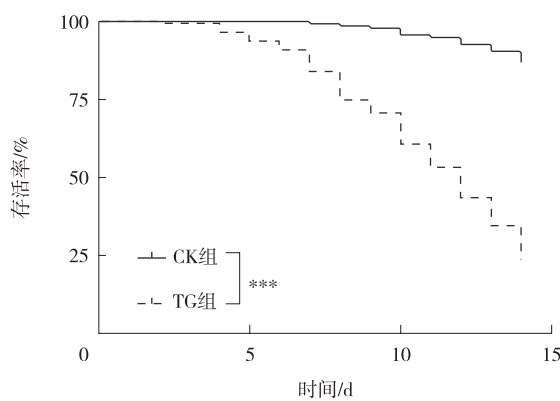
明显上调,该基因相对表达量在东方蜜蜂微孢子虫赖以生存增殖的中肠中增加了 2.5 倍,在胸部增加了 0.7 倍。此外,TG 组供试蜜蜂头部和脂肪体中 *AmCHAC2* 的表达情况与 CK 组相比无明显差异。

2.5 东方蜜蜂微孢子虫感染对意大利蜜蜂不同组织中 GSH 含量的影响

图 12 显示:与 CK 组相比,TG 组供试蜜蜂头部 GSH 含量明显更高,但它们胸部、中肠和脂肪体内 GSH 含量则有明显下降,其中脂肪体内 GSH 含量下降幅度最大,中肠和胸部内 GSH 含量下降幅度次之。与其他 3 种组织相比,TG 组蜜蜂中肠内 GSH 含量最低。

2.6 东方蜜蜂微孢子虫感染下意大利蜜蜂中肠组织中活性氧含量分析

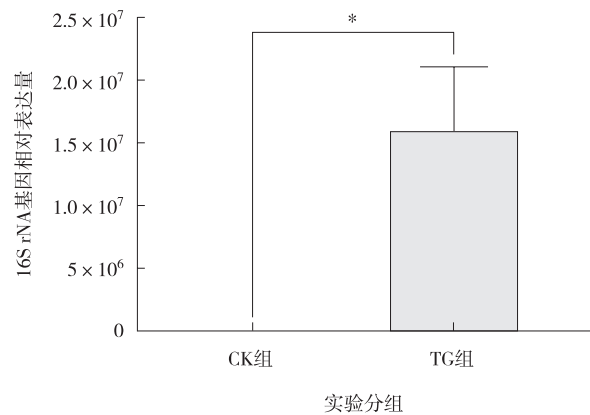
由图 13 可知,TG 组供试蜜蜂中肠中活性氧含量明显比 CK 组的这一指标更高,表明被感染蜜蜂中肠组织发生了明显的氧化应激。



注:“***”表示组间数据差异在 $p < 0.001$ 水平上有统计学意义,下同。

图 9 东方蜜蜂微孢子虫感染下意大利蜜蜂的存活率统计

Fig. 9 Survival statistics of *A. mellifera ligustica* infected by microsporidia *N. ceranae*



注:“*”表示组间数据差异在 $p < 0.05$ 水平上有统计学意义,下同。

图 10 东方蜜蜂微孢子虫 16S rRNA 基因的表达水平

Fig. 10 The relative expression level of 16S rRNA gene of *N. ceranae*

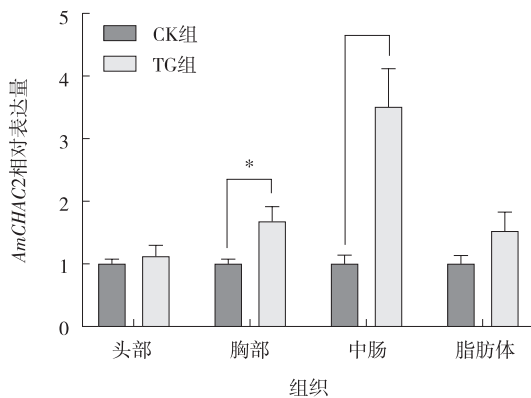


图 11 东方蜜蜂微孢子虫感染下 *AmCHAC2* 相对表达水平

Fig. 11 The relative expression level of *AmCHAC2* of *A. mellifera ligustica* infected by *N. ceranae*

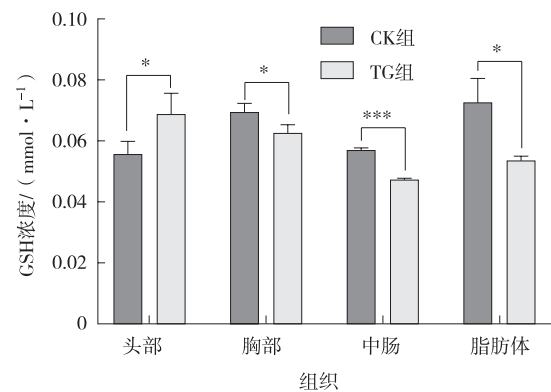


图 12 东方蜜蜂微孢子虫感染下意大利蜜蜂不同组织中 GSH 含量

Fig. 12 Contents of GSH in different tissues of *A. mellifera ligustica* infected by *N. ceranae*

3 讨论

本研究预测 *AmCHAC2* 定位于细胞质行使功能,这一结果与其他物种 CHAC 的细胞定位特征一致^[22]。此外,在系统进化上 *AmCHAC2* 与其他物种如昆虫、哺乳动物、鱼类和鸟类的 CHAC2 具有较高亲缘关系,说明 *AmCHAC2* 与 CHAC2 可能属于同一家族成员。氨基酸多重序列比对分析结果显示,*AmCHAC2* 与其他物种的 CHAC2 均具有 CHAC 家族中保守的由 Tyr¹⁶、Glu¹⁷、Ser¹⁸、His⁴⁹、Arg⁵⁰、Tyr⁸⁷、Tyr¹⁴⁴ 和 Tyr²¹¹ 组成的活性

位点腔^[23],这一保守的进化结构被认为是共同功能特征的证据。在功能方面,有研究报道 CHAC 与 5-氧脯氨酸酶和 γ -谷氨酰转移酶共同参与 γ -谷氨酰循环,完成对 GSH 的降解^[24-25]。本研究蛋白互作网络预测分析结果则表明 *AmCHAC2* 与 γ -谷氨酰转移酶和 5-氧脯氨酸酶之间存在紧密相互作用关系,提示 *AmCHAC2* 可能参与机体对 GSH 的降解过程。综合上述结果,本研究认为 *AmCHAC2* 具有 CHAC2 典型的生物信息学特征,可将它归属于 CHAC 家族成员。

CHAC2 是生物体胞质 GSH 稳态的重要调节因子,它在微孢子虫感染蜜蜂过程中扮演什么样的角色至今还未见报道。在本研究中,与 CK 组相比,TG 组供试蜜蜂头部和脂肪体组织中 *AmCHAC2* 表达水平没有明显差异,而胸部和中肠组织中 *AmCHAC2* 表达水平明显上升,这说明 *AmCHAC2* 的表达上升与微孢子虫感染紧密相关并呈组织特异性。大量研究表明,CHAC 的主要功能是降解 GSH^[9]。GSH 作为一种抗氧化剂在清除活性氧中起着至关重要的作用^[26-27]。因此,*AmCHAC2* 的大量表达很可能会导致 GSH 被降解并造成组织内活性氧过剩累积。事实上在本研究中,也的确出现了 TG 组供试蜜蜂胸部、中肠和脂肪体组织中 GSH 含量与 CK 组相比明显下降的情况,尤其是 TG 组供试蜜蜂的中肠 GSH 含量与 CK 组相比差异极大。进一步分析发现,TG 组供试蜜蜂中肠组织的活性氧相较于 CK 组而言出现了大量累积。因此,与前人的结论一致^[9],本研究结果表明,东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂后导致后者 *AmCHAC2* 的表达明显上调,这造成了机体内抗氧化物 GSH 不足,由此破坏了肠道的氧化还原平衡,导致活性氧过剩累积,最终触发了氧化应激。

除了中肠,本研究也发现,与 CK 组相比,东方蜜蜂微孢子虫感染下的意大利蜜蜂胸部和脂肪体中 *AmCHAC2* 的表达明显上调,且 GSH 含量明显下降。这一结果提示这些供试蜜蜂胸部和脂肪体中可能发生了氧化应激。这是因为 GSH 作为重要的非酶类抗氧化剂,在抵抗氧化应激中起着关键的作用^[1-2],但它同时受 CHAC2 的降解调节,以维持机体的抗氧化平衡^[9]。CHAC2 的大量合成将导致 GSH 被过度降解,这会导致细胞抗氧化不足,触发活性氧大量产生和氧化应激^[12],特别是让蜜蜂中肠产生氧化应激。至于为何微孢子虫只感染中肠细胞却诱导了其他组织如胸部和脂肪体的 *AmCHAC2* 的大量表达,其中涉及机制可能非常复杂。本研究推测:中肠是蜜蜂消化吸收食物营养和能量的场所,而微孢子虫在中肠的感染寄生严重破坏了蜜蜂对营养能量的摄入,这必然会对蜜蜂整体的代谢造成胁迫;蜜蜂的胸部富含血淋巴,脂肪体是代谢中心,这两个重要组织将会对这一胁迫做出反应;因此,在供试蜜蜂感染东方蜜蜂微孢子虫后,*AmCHAC2* 在它们的胸部和脂肪体中的表达上调,以此来维持机体的抗氧化平衡。当然,这一推测还有待于更进一步的研究予以证明。

通常而言,由活性氧过剩累积导致的氧化应激对细胞是极为不利的,因为这会诱发细胞凋亡。例如 CHAC2 的过度表达会导致癌细胞内 GSH 耗竭,从而导致活性氧累积并出现氧化应激,最终促进癌细胞凋亡^[20]。在这种情况下,细胞通常会增加 GSH 等抗氧化物以抵抗氧化应激的伤害。然而在本研究中,供试蜜蜂机体也并没有选择下调 *AmCHAC2* 表达以减少体内 GSH 的降解并由此增强机体抗氧化能力以耐受微孢子虫的感染,反而选择了上调 *AmCHAC2* 表达。考虑到中肠细胞是蜜蜂微孢子虫寄生的唯一场所,因此本研究推测这很可能是蜜蜂为抵抗病原而采取的一种自杀式策略,最终目的在于让微孢子虫失去赖以生存和增殖的场所。然而这一推测也需要更多的研究证据来加以证实。

综上所述,本研究结果表明,*AmCHAC2* 在受到东方蜜蜂微孢子虫感染后表达上调,这可能在意大利蜜蜂抵抗微孢子虫感染过程中扮演着重要角色。

参考文献:

- [1] LIU Y L, HYDE A S, SIMPSON M A, et al. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism[J]. *Advance in Cancer Research*, 2014, 122: 69-101.

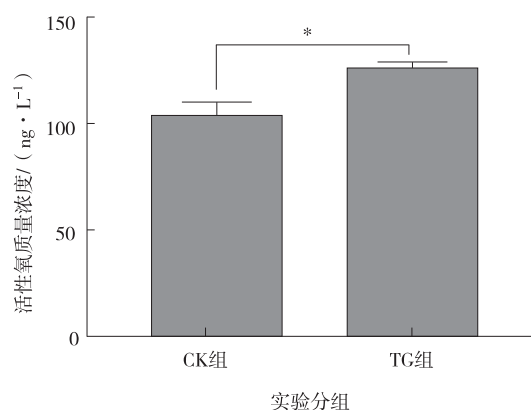


图 13 东方蜜蜂微孢子虫感染下意大利蜜蜂中肠组织中活性氧含量

Fig. 13 Contents of ROS in midgut of *A. mellifera ligustica* infected by *N. ceranae*

- [2] MESSINA J P, LAWRENCE D A. Cell cycle progression of glutathione-depleted human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase[J]. *Journal of Immunology*, 1989, 143(6): 1974-1981.
- [3] FRANCO R, CIDLOWSKI J A. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2009, 16(10): 1303-1314.
- [4] TOWNSEND D M, TEW K D, TAPIER H. The importance of glutathione in human disease[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003, 57(3/4): 145-155.
- [5] KUMAR A, TIKOO S, MAITY S, et al. Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as γ -glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione[J]. *EMBO Reports*, 2012, 13(2): 1095-1101.
- [6] KUMAR C, IGBARIA A, D'AUTREAUX B, et al. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control[J]. *The EMBO Journal*, 2011, 30(10): 2044-2056.
- [7] SRIKANTH C V, VATS P, BOURBOULOUX A, et al. Multiple *cis*-regulatory elements and the yeast sulphur regulatory network are required for the regulation of the yeast glutathione transporter, Hgt 1p[J]. *Current Genetics*, 2005, 47(6): 345-358.
- [8] RAJASEKARAN N S, CONNELL P, CHRISTIANS E S, et al. Human α B-crystallin mutation causes oxido-reductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice[J]. *Cell*, 2007, 130(3): 427-439.
- [9] KAUR A, GAUTAM R, SRIVASTAVA R, et al. ChaC2, an enzyme for slow turnover of cytosolic glutathione[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(2): 638-651.
- [10] WANG C K, YANG S C, HSU S C, et al. CHAC2 is essential for self-renewal and glutathione maintenance in human embryonic stem cells[J]. *Free Radic Biology and Medicine*, 2017, 113: 439-451.
- [11] AARON O, MARJORIE C, BOARD P G, et al. Identification and characterization of γ -glutamylamine cyclotransferase, an enzyme responsible for γ -glutamyl- ϵ -lysine catabolism[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(13): 9642-9648.
- [12] LIU S P, FEI W Q, SHI Q L, et al. CHAC2, downregulated in gastric and colorectal cancers, acted as a tumor suppressor inducing apoptosis and autophagy through unfolded protein response[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8: e3009.
- [13] ZHAI X H, DAI T T, CHI Z C, et al. Naringin alleviates acetaminophen-induced acute liver injury by activating Nrf2 via CHAC2 upregulation[J]. *Environmental Toxicology*, 2022, 37(5/6): 1332-1342.
- [14] CORNARA L, BIAGI M, XIAO J B, et al. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 412.
- [15] HIGES M, MARTIN R, MEANA A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2006: 92: 93-95.
- [16] GOULSON D, NICHOLLS E, BOTÍAS C, et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers[J]. *Science*, 2015, 347(6229): 1435.
- [17] ADL S M, SIMPSON A G B, FARMER M A, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2005, 52(5): 399-451.
- [18] LI W F, CHEN Y P, COOK S C. Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees[J]. *International Journal for Parasitology*, 2018, 48(6): 433-444.
- [19] PARIS L, ROUSSEL M, PEREIRA B, et al. Disruption of oxidative balance in the gut of the western honeybee *Apis mellifera* exposed to the intracellular parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fipronil[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1702-1717.
- [20] RODRÍGUEZ-GARCÍA C, HEERMAN M C, COOK S C, et al. Transferrin-mediated iron sequestration suggests a novel therapeutic strategy for controlling *Nosema* disease in the honey bee, *Apis mellifera* [J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(2): e1009270.
- [21] ORLOWSKI M, MEISTER A. The γ -glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1970, 67(3): 1248-1255.
- [22] MUNGRUE I N, PAGNON J, KOHANNIM O, et al. CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade[J]. *Journal of Immunology*, 2009, 182(1): 466-476.
- [23] OAKLEY A J, YAMADA T, LIU D, et al. The identification and structural characterization of C7orf24 as γ -glutamyl cyclotransferase: an essential enzyme in the γ -glutamyl cycle[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(32): 22031-22042.
- [24] NGUYEN Y T K, PARK J S, JANG J Y, et al. Structural and functional analyses of human ChaC2 in glutathione metabolism [J]. *Biomolecules*, 2019, 10(1): 31.
- [25] Van Der WERF P, ORLOWSKI M, MEISTER A. Enzymatic conversion of 5-oxo-L-proline (L-pyrrolidone carboxylate) to L-

- glutamate coupled with cleavage of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate, a reaction in the γ -glutamyl cycle[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1971, 68(12): 2982-2985.
- [26] CHESNEY J A, EATON J W, MAHONEY J R. Bacterial glutathione: a sacrificial defense against chlorine compounds[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(7): 2131-2135.
- [27] HIGASHI Y, ARATAKE T, SHIMIZU T, et al. Protective role of glutathione in the hippocampus after brain ischemia[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(15): 7765.

Animal Sciences

Expression Analysis of the Glutathione-Degrading Enzyme Gene *AmCHAC2* of *Apis mellifera ligustica* under *Nosema ceranae* Infection

CHEN Lanchun, QIN Qiqian, ZENG Huini, ZHANG Yi, WANG Fei, WANG Yuedi, LI Zhi

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Key Laboratory of Vector Insects,
College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] Bioinformatics was used to identify glutathione specific γ -glutamyl cyclotransferase 2 (*AmCHAC2*) in *Apis mellifera ligustica*, and quantitative PCR was used to analyze the temporal and spatial expression characteristics of *AmCHAC2* in *A. mellifera ligustica*. To explore the role of this gene in bee resistance to *Nosema* infection. [Methods] The amino acid sequence characteristics and domain composition of *AmCHAC2* were analyzed by multiple sequence alignment. Online prediction of the protein structure, interacting protein network, cell localization characteristics and function. The phylogenetic tree was constructed to analyze the phylogenetic classification and evolutionary relationship of the protein. Temporal and spatial expression characteristics of *AmCHAC2* in honeybee tissues were analyzed by real-time quantitative PCR. The expression characteristics of glutathione content in honeybee tissues were analyzed by kit. The content of reactive oxygen species in honeybee midgut was determined by ELISA. [Findings] *AmCHAC2* was composed of 245 amino acid residues with a relative molecular weight of 28.3 kDa and a pI of 6.71. *AmCHAC2* is a hydrophobic protein with no signal peptide and is localized in the cytoplasm. A large number of honeybees died after 14 days of infection with *Nosema ceranae*, and the survival rate was only 23%. Compared with the control group, the expression of *AmCHAC2* was significantly up-regulated in the breast and midgut tissues of the bees infected with *Nosema*, the content of GSH was significantly decreased, and the content of reactive oxygen species was significantly increased in the midgut, which triggered oxidative stress. [Conclusions] The upregulation of *AmCHAC2* after infection with *Nosema* may play an important role in the resistance of *A. mellifera ligustica* to *Nosema* infection.

Keywords: glutathione-specific γ -glutamyl cyclotransferase; *Nosema ceranae*; *Apis mellifera ligustica*

(责任编辑 方 兴)