

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)CypA 基因 应答 WSSV 侵染的表达研究*

朱俊杰^{1,2} 林 锋³ 王 岩¹ 张海琪³

(1. 浙江大学 杭州 310058; 2. 湖州师范学院 湖州 313000; 3. 浙江省淡水水产研究所 湖州 313001)

摘要 克氏原螯虾亲环素蛋白 A(*Procambarus clarkii* Cyclophilin A, 简称 PcCypA)是一种存在于克氏原螯虾(*P. clarkii*)中高度保守的重要蛋白,具有多种生物学功能。为了初步阐明 CypA 在病毒侵染克氏原螯虾过程中的免疫应答机制,本研究利用 qRT-PCR 等技术分析了克氏原螯虾在 WSSV 病毒感染后, PcCypA 在不同组织中的转录表达情况。研究结果表明克氏原螯虾在感染 WSSV 后,心脏和肌肉组织中都出现了肌纤维断裂溶解的情况,在肝胰腺组织中出现了脂肪颗粒脱落、细胞空泡化和细胞膜溶解现象。同时,不同组织中的 PcCypA 基因表达存在明显的时序差异,以 24hpi 为界,0—24hpi 为注射应激期,在此期间,肝胰腺、心脏等组织中的 PcCypA 转录表达量均有上调;24—36hpi 为应激恢复期,绝大多数的组织中 PcCypA 转录表达均出现了回落,但在心脏、肌肉、血淋巴组织中出现了上调,说明这三个组织对 WSSV 感染的响应可能早于其他组织;48hpi 之后为病毒感染响应阶段,在此期间鳃和肌肉组织中 PcCypA 表达量显著提升,而在肝胰腺和精巢组织中却出现表达下调;96—120hpi 为感染响应后期阶段,肝胰腺和肠组织的 PcCypA 转录水平再次上调。因而,可以初步推断 PcCypA 在病毒 WSSV 侵染克氏原螯虾过程中参与了机体的免疫应答,且在不同的组织中 PcCypA 的转录表达水平存在显著差异。

关键词 克氏原螯虾; CypA; qRT-PCR; WSSV

中图分类号 Q789 **doi:** 10.11693/hyh20180400091

亲环素家族(Cyclophilins, Cyps)是一类从原核生物到高等哺乳动物中广泛分布于自然界、高度保守的多功能蛋白家族,也是免疫抑制剂环孢素 A(Cyclophilins, CsA)细胞内受体蛋白,所以又被称为 CsA 结合蛋白(Feng *et al.*, 2013)。在高等生物上的大量研究结果显示,作为一个免疫抑制剂 CypA 基因参与病毒复制的中间过程,促进病毒在机体中的复制表达(Franke *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2012),比如在 HIV 侵染过程中,人体 CypA 能影响 HIV 病毒的复制, CypA 通过绑定 HIV1 的蛋白外壳富含脯氨酸的环上的 GlyPro 位点,催化 Pro 肽键顺反异构化,形成有功能的蛋白外壳,通过相互作用增加了 HIV1 病毒在人

身上的感染机率(潘克厚等, 2008);猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)感染 PK-15 细胞后,细胞中的 CypA 明显上调表达,而采用 RNA 干扰方法下调 PK-15 细胞中 CypA 的表达,能够抑制 CSFV 在细胞中的增殖(戴雅娟等, 2012);传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)感染鳊鱼实验表明,宿主的 CypA 对 ISKNV 的增殖起着重要的作用,通过添加其抑制剂 CsA 能有效抑制病毒的增殖(胡先勤等, 2016)。在近年来在水产动物方面的研究发现, CypA 在栉孔扇贝、池蝶蚌以及中华绒螯蟹、斑节对虾、凡纳滨对虾、黄颡鱼、斑点叉尾鲴等水生生物中可能充当一种免疫应激的

* 浙江省重大科技攻关项目, 2014C02011 号。朱俊杰, 博士研究生, 副研究员, E-mail: zhjj@zjhu.edu.cn

通讯作者: 张海琪, 教授级高级工程师, E-mail: zmk407@126.com

收稿日期: 2018-04-11, 收修改稿日期: 2018-05-09

角色(Yeh *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2009; Song, 2009; 丁兆坤等, 2011; He *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2015)。但总体上而言 CypA 基因在水产动物上的研究的深度和广度都还远远不足, 特别是在克氏原螯虾方面相关报道较少。

白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是一种具有囊膜的杆状病毒(Escobedo-Bonilla *et al.*, 2007), 地理分布广、流行范围大、传染性强、发病时间短, 目前尚无有效的药物能够控制疫情, 是中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)养殖中的主要病原(雷质文等, 2002; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2007; Sánchez-Paz, 2010)。研究表明 WSSV 具有广泛的宿主, 可以感染甲壳纲十足目的大部分动物(Pradeep *et al.*, 2012)。近年来发现 WSSV 在克氏原螯虾养殖中也广泛流行, 给克氏原螯虾养殖业带来巨大的经济损失(丁正峰等, 2008)。深入理解克氏原螯虾免疫系统的特征是防控克氏原螯虾病害的关键, 挖掘免疫系统的重要功能基因是深入理解克氏原螯虾免疫系统的必经之路。

为探究 CypA 在克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)抗病毒免疫调控方面的作用机制, 本研究通过采用实时荧光定量 PCR 技术结合组织病理分析 PcCypA 在 WSSV 感染克氏原螯虾后在各组织中的表达情况, 初步阐明 PcCypA 在克氏原螯虾抗病毒免疫应答方面的功能, 为揭示克氏原螯虾 CypA 基因在克氏原螯虾免疫系统中的作用奠定基础。

1 实验材料与方法

1.1 克氏原螯虾

克氏原螯虾由浙江省淡水水产研究所浙北公司提供, 平均体长和体重分别为(8.25±0.94)cm 和(23.18±8.99)g, 养殖间的容积为 0.5m³ 的塑料缸中, 水温 21—25℃, 每天投喂 2 次。饲养 7d 后, 挑取 200 只健康、有活力的克氏原螯虾用于攻毒实验。

1.2 人工感染实验

取 200 只健康状况良好的克氏原螯虾进行攻毒实验, 分为 2 步: 一是采用腹节注射攻毒, 通过注射不同浓度病毒悬液(100μL, 200μL, 300μL)确定致死浓度; 二是按照致死浓度, 进行攻毒, 攻毒后在 0h、6h、12h、24h、36h、48h、72h、96h、120h 等不同时间点分别采集样本, 对照组腹节注射相同体积的 0.9% 的生理盐水。

1.3 组织病理学观察

取健康虾和 WSSV 感染病虾的心脏、肌肉和胰腺组织, 用福尔马林固定。经酒精脱水, 石蜡包埋切片(5μm 厚度), 再用苏木精-伊红染色, 中性树胶封片后在显微镜(DMLB2, Leica)下观察, 用数码摄像系统(DC300F, Leica)拍照。

1.4 CypA 基因转录水平分析

采用 primer 5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物, 如表 1 所示。对克氏原螯虾的胰腺、腮丝、精巢、卵巢、心脏、肌肉、眼柄、全血等组织在不同时段的 CypA 基因的表达情况进行分析。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列
Tab.1 Nucleotide sequences of the primers used for qRT-PCR

引物	序列(5'→3')
CypA F	AGGGCAACAGTGGTATCAAC
CypA R	GAAAGTGGACCCTTTGTAGC
18S rRNA F	CTGAGAAACGGCTACCACATC
18S rRNA R	CTAGTTAGCTGTTCCGAGCGT

2 结果

2.1 WSSV 对克氏原螯虾的致死浓度

试验结果表明, WSSV 病毒对克氏原螯虾有很强的感染能力, 对照组没有死亡个体, 而注射组均有不同比例的死亡个体。WSSV 病毒感染力与注射浓度呈依赖关系(见图 1), 其中注射 300μL 病毒悬液时, 在 12 天累计死亡率接近百分百。因此, 为保证实验效果中, 选择注射 300μL WSSV 病毒悬液(LC=10⁷/μL)攻毒。

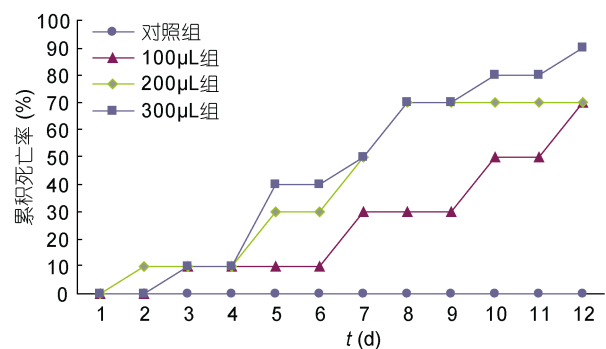


图 1 WSSV 感染后克氏原螯虾的累积死亡率

Fig.1 Cumulative mortality of *P. clarkii* after WSSV injection

2.2 WSSV 感染克氏原螯虾的组织病理分析

病理组织学观察发现, 与健康虾相比, 在感染 WSSV 的克氏原螯虾心脏(图 2A, 图 2B)和肌肉组织(图 2C, 图 2D)中都出现了肌纤维断裂溶解的现象,

心脏组织中细胞排列由井然有序变得杂乱无章; 在肝胰腺组织(图 2E, 图 2F)中, 出现了脂肪颗粒脱落、

细胞空泡化和细胞膜溶解现象, 表明 WSSV 侵染宿主成功, 对宿主组织有较强的破坏性。

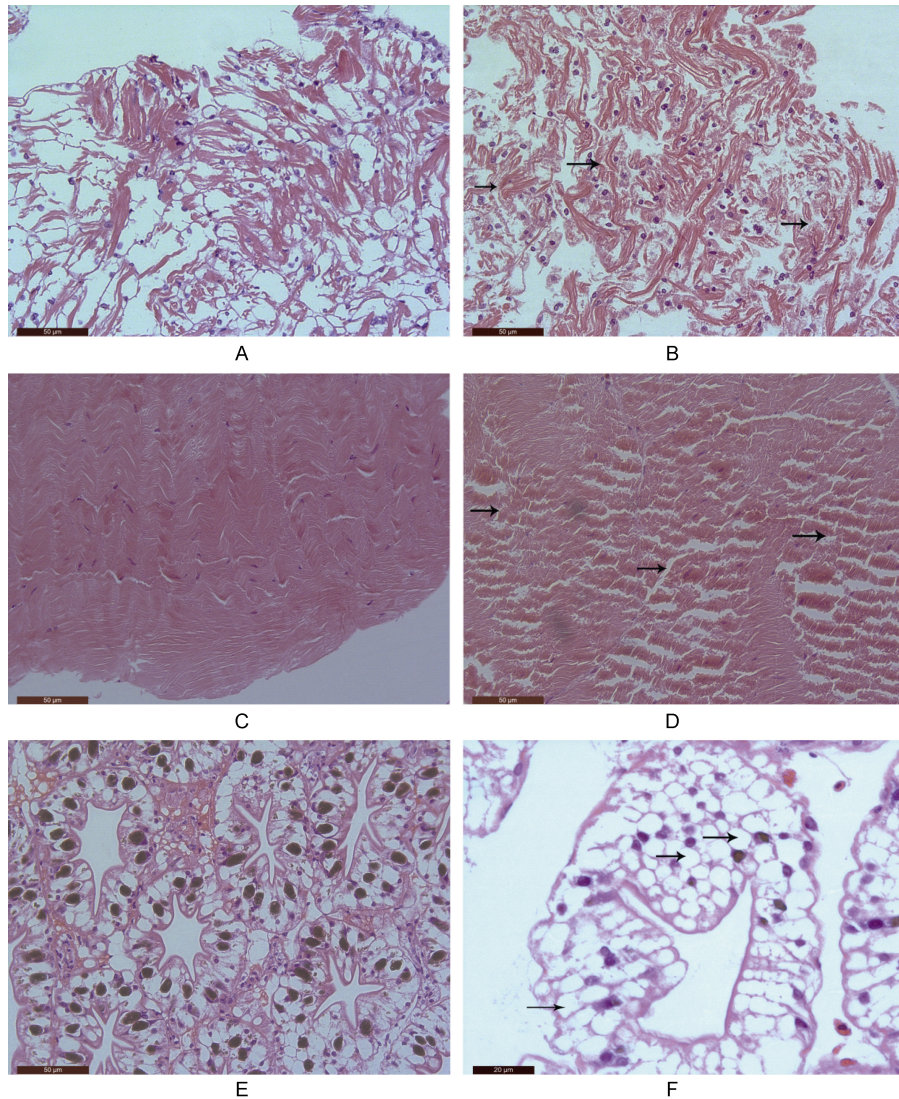


图 2 WSSV 感染前后克氏原螯虾的心、肌肉和肝胰腺的组织学观察

Fig.2 Heart, muscle, hepatopancreas sections of *P. clarkii* under a light microscope

注: A: 健康虾心脏组织切片(20×); B: WSSV 感染虾心脏组织切片(20×); C: 健康虾肌肉组织切片(20×); D: WSSV 感染虾肌肉组织切片(20×); E: 健康虾肝胰腺组织切片(20×); F: WSSV 感染虾肝胰腺组织切片(40×)

2.3 克氏原螯虾 CypA 在不同时段的转录水平分析

利用 Real-time PCR 方法分别检测了 CypA 在 WSSV 感染后克氏原螯虾不同组织的表达水平。

在克氏原螯虾眼柄组织(图 3A)中, 72hpi (hours post injection)的 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 24hpi 后 PcCypA 的相对表达量最高(88.91 倍), 其次是 0hpi(58.50 倍); 48hpi 之后的表达量都非常低。

在克氏原螯虾鳃丝组织(图 3B)中, 48hpi 的

PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 72hpi 后 PcCypA 的相对表达量最高(79.82 倍), 其次是 12hpi(50.24 倍); 整个表达图谱显示出前高后高中间低的特征, 推测前期是机体鳃丝组织对注射的应激反应, 后期是鳃丝组织 PcCypA 基因对 WSSV 病毒感染的响应。

在克氏原螯虾心脏组织(图 3C)中, 96hpi 的 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 36hpi 后 PcCypA 的相对表达量最高(150.17 倍), 其次是

24hpi(146.70 倍); 整个表达图谱显示出高低起伏的表达特征, 与鳃丝中的表达图谱对比分析认为, 心脏 CypA 对 WSSV 感染的响应比鳃丝对 WSSV 感染的响应早 24—48h。

在克氏原螯虾肝胰腺组织(图 3D)中, 72hpi 的 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 12hpi 后 PcCypA 的相对表达量最高(2452 倍), 其次是 6hpi(1443 倍); 说明在前期的注射应激响应中, 肝脏 CypA 的超高表达对于克氏原螯虾机体应对注射应激是有重要作用的。中间 24—96hpi 的相对表达量很低, 120hpi 的表达量(421.24 倍)再次上升, 说明肝胰腺对 WSSV 感染的响应比其他的组织都迟。

在克氏原螯虾肠组织(图 3E)中, 6hpi 的 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 0hpi 后 PcCypA 的相对表达量最高(145.87 倍), 其次是 72hpi(59.68 倍)和 120hpi(44.68 倍)。这表明肠对注射行为的应激非常早, 而且应激反应中 CypA 的表达量也很高, 这可能与腹节注射病毒悬液的行为有关, 在注射过程中, 针头碰到肠组织, 对肠形成了直接的应激行为, 而其他组织则是间接的应激行为。

在克氏原螯虾肌肉组织(图 3F)中, 24hpi 的 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 48hpi 后 PcCypA 的相对表达量最高(2065 倍), 其次是 36hpi(906.07 倍)和 72hpi(542.34 倍)。说明肌肉组织 PcCypA 对 WSSV 的响应大约是从 36h 开始的。

在克氏原螯虾血淋巴组织(图 3G)中, 48hpi 的 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 12hpi 后 PcCypA 的相对表达量最高(489.36 倍), 其次是 36hpi(144.44 倍)。对比心脏、鳃丝和肝胰腺等血液交换较大的组织来看, 血淋巴组织 PcCypA 基因转录表达对 WSSV 的响应晚于心脏, 早于鳃丝, 早于肝胰腺。

在克氏原螯虾精巢组织(图 3H)中, 96hpi 的 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 0hpi 后 PcCypA 的相对表达量最高(860.62 倍), 其次是 12hpi(217.00 倍)。对比卵巢、肠、肝胰腺等内脏组织, 发现受腹节注射病毒悬液的行为影响, 内脏组织 PcCypA 均表现出迅速的应激反应, 表达量迅速上调。精巢与卵巢对 WSSV 感染的响应在 24—120h 没有明显的响应表达。

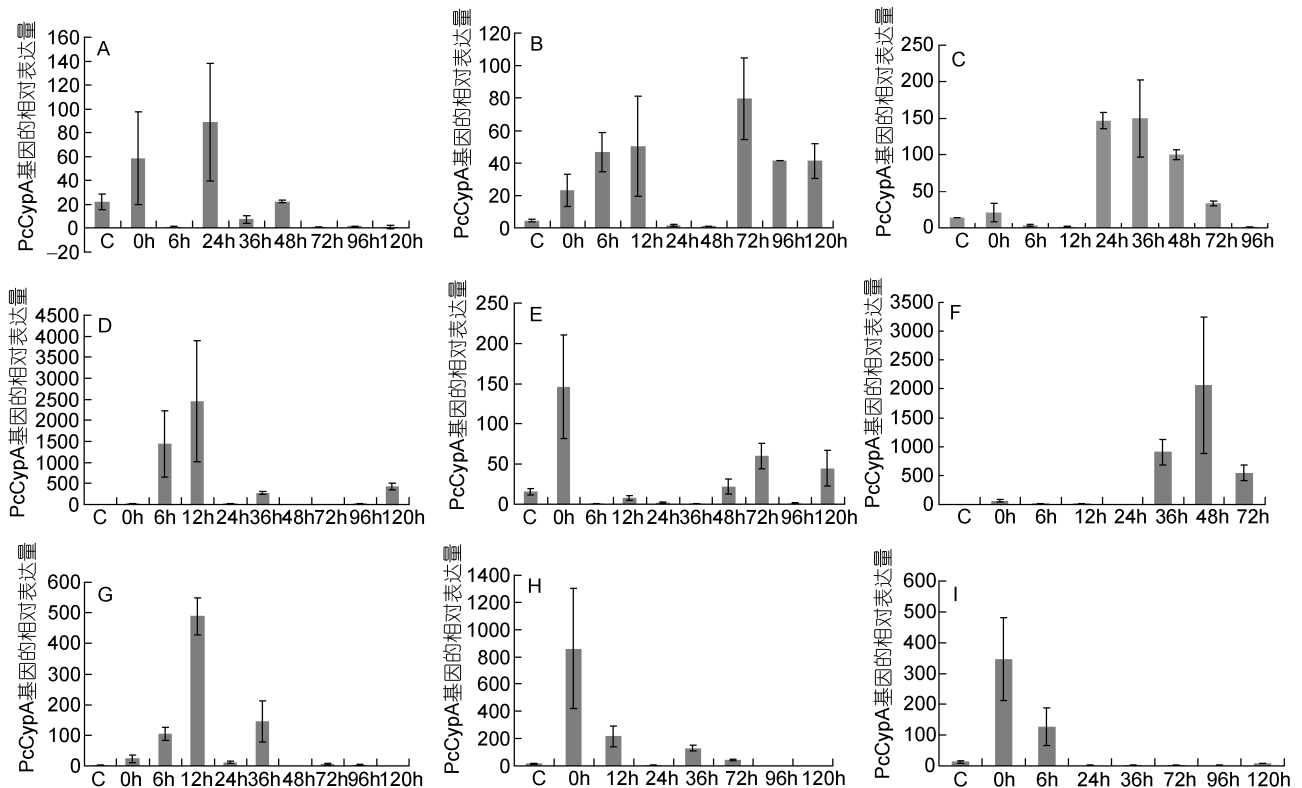


图 3 WSSV 感染后克氏原螯虾不同组织的 CypA 转录的时序表达模式

Fig.3 The relative temporal expression levels of PcCypA in different tissues from *P. clarkii* infected with WSSV

注: A—I 分别代表眼柄、鳃丝、心脏、肝胰腺、肠、肌肉、血淋巴、精巢和卵巢

在克氏原螯虾卵巢组织(图 3I)中, 96hpi 的 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 0hpi 后 PcCypA 的相对表达量最高(346.39 倍), 其次是 6hpi(125.95 倍)。WSSV 感染下卵巢 PcCypA 的时序表达模式基本与精巢表达模式一致。

由此可知, WSSV 感染后克氏原螯虾不同组织的 CypA 转录水平分析, 可以 24hpi 为界, 0—24hpi 为注射应激期, 在此期间, 眼柄、鳃丝、肝胰腺、肠、血淋巴、精巢、卵巢等组织的 PcCypA 转录表达均有上调; 24—36hpi 为应激恢复期, 绝大多数的组织中 PcCypA 转录表达均出现了下调回落, 但在心脏、肌肉、血淋巴组织中出现了上调, 说明这三个组织对 WSSV 感染的响应早于其他组织; 48hpi 之后为 WSSV 感染响应阶段, 在此期间鳃和肌肉组织有大量 PcCypA 转录表达, 肝胰腺和精巢组织表达下调; 96—120hpi 为感染响应后期阶段, 肝胰腺和肠组织的 PcCypA 转录水平再次上调。

2.4 PcCypA 基因在 WSSV 感染后的不同组织中的转录水平比较

在对照组(图 4A)中, 肝胰腺 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 表达量从高到底分别为肠(41.63 倍)、眼柄(31.38 倍)、心脏(6.27 倍)、卵巢(5.80 倍)、精巢(4.61 倍)、鳃、肌肉和血淋巴。

在 WSSV 感染后 0hpi(图 4B), 肝胰腺 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 肠 PcCypA 的相对表达量最高(120.91 倍), 其次是精巢(79.24 倍)。与对照组相比, PcCypA 在精巢(79.24 倍)和卵巢(49.33 倍)的表达都有所上调, 眼柄组织的 PcCypA(25.84 倍)表达显著下调。

在 WSSV 感染后 6hpi(图 4C), 心脏 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 肝胰腺 PcCypA 的相对表达量最高(196.34 倍), 其次是血淋巴组织(36.16 倍)和鳃(27.76 倍)。与对照组相比, PcCypA 在肝胰腺组织的表达上调非常显著, 血淋巴组织也显著上调; PcCypA 在眼柄组织(25.84 倍)表达下调极显著, 心脏组织中也显著下调。

在 WSSV 感染后 12hpi(图 4D), 心脏 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 肝胰腺 PcCypA 的相对表达量最高(649.16 倍), 其次是血淋巴组织(326.70 倍)。与对照组相比, PcCypA 在肝胰腺组织的表达上调非常显著, 血淋巴组织也显著上调。说明在腹节注射病毒悬液后的早期应激反应(0—12hpi)中, PcCypA 的调控模式以肝胰腺和血淋巴的上调为主。

在 WSSV 感染后 24hpi(图 4E), 肌肉 PcCypA 的

相对表达量最低, 以此为基数(1), 心脏 PcCypA 的相对表达量最高(314.30 倍), 其次是肠(27.38 倍)和血淋巴组织(25.86 倍)。

在 WSSV 感染后 36hpi(图 4F), 肠 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 肌肉 PcCypA 的相对表达量最高(62.56 倍), 其次是血淋巴组织(16.42 倍)。说明在此期间(24—36hpi)肠组织 PcCypA 显著下调, 而肌肉 PcCypA 显著上调。

在 WSSV 感染后 48hpi(图 4G), 肝胰腺 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 肌肉 PcCypA 的相对表达量最高(1328.62 倍), 其次是肠(181.84 倍)和心脏组织(137.78 倍)。说明在 24—48hpi 期间, 肌肉组织 PcCypA 持续上调; 在 36—48hpi 期间, 在肠组织中的表达由下调转为上调。

在 WSSV 感染后 72hpi(图 4H), 肝胰腺 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 肠 PcCypA 的相对表达量最高(874.99 倍), 其次是肌肉(613.72 倍)和鳃丝组织(362.54 倍)。说明在 48—72hpi 期间, 肌肉和肠组织中 PcCypA 维持高表达水平, 鳃组织表达开始上调。

在 WSSV 感染后 96hpi(图 4I), 精巢 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 鳃 PcCypA 的相对表达量最高(114.74 倍), 其次是血淋巴(13.14 倍)和肠组织(12.45 倍)。说明在 72—96hpi 期间, 鳃组织 PcCypA 维持高表达水平, 精巢组织显著下调。

在 WSSV 感染后 120hpi(图 4J), 精巢 PcCypA 的相对表达量最低, 以此为基数(1), 肠 PcCypA 的相对表达量最高(354.31 倍), 其次是血淋巴(227.86 倍)和鳃(101.12 倍)组织(12.45 倍)。说明在 72—120hpi 期间, 鳃组织 PcCypA 维持高表达水平, 精巢组织显著下调; 96—120hpi 期间, 血淋巴组织 PcCypA 开始上调。

综上所述, WSSV 感染后克氏原螯虾各组织 CypA 基因在不同时间转录水平, 以 24hpi 为界, 0—24hpi 为注射应激期, 在此期间, 肝胰腺(0—12hpi)、心脏(12—24hpi)等组织的 PcCypA 转录表达均有上调。24—36hpi 为应激恢复期, 绝大多数的组织中 PcCypA 转录表达均出现了回落, 但在心脏、肌肉、血淋巴组织中出现了上调, 说明这三个组织对 WSSV 感染的响应早于其他组织。48hpi 之后为 WSSV 感染响应阶段, 在此期间鳃和肌肉组织有大量 PcCypA 转录表达, 肝胰腺和精巢组织表达下调。96—120hpi 为感染响应后期阶段, 肝胰腺和肠组织的 PcCypA 转录水平再次上调。该综述结果与 3.3 结果基本一致, 说明结果基本可靠。

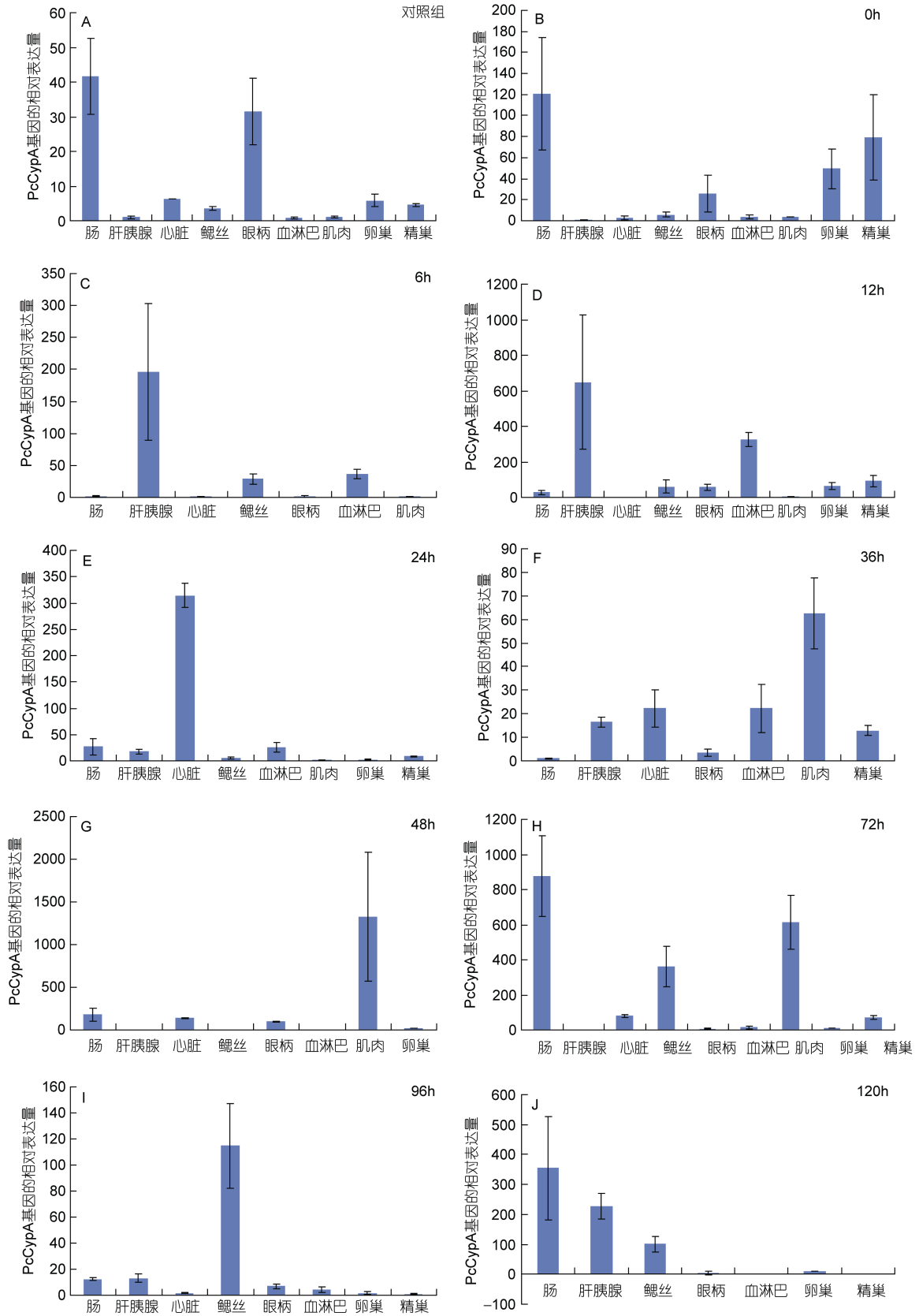


图 4 WSSV 感染后 PcCypA 基因在不同时间的组织空间转录表达模式

Fig.4 The tissue expression pattern of PcCypA in different hours post infection with WSSV

注: A 代表对照组, B—J 分别代表 WSSV 感染后 0、6、12、24、36、48、72、96、120h

3 讨论

CypA 基因广泛分布于从原核生物到高等哺乳动物的各种组织中,有研究表明 CypA 基因在水生生物方面具有肽酰脯氨酸顺反异构酶(PPIase)活性(王旭辉, 2014; 罗春, 2015)、免疫疫苗候选分子(陈金桃等, 2015)、趋化作用(Sherry *et al*, 1992; Allain *et al*, 2002; Yurchenko *et al*, 2002; Yeh *et al*, 2008; Damsker *et al*, 2009; Wang *et al*, 2014; Dong *et al*, 2015; Guo *et al*, 2015)、抗逆作用(王旭辉, 2014)等多种生理功能。目前, CypA 基因在水产动物上的研究的深度和广度都还远远不足,特别是在克氏原螯虾方面相关报道较少。Zhu 等(2017)研究表明克氏原螯虾 CypA (*Procambarus clarkii* Cyclophilin A, PcCypA)在克氏原螯虾肝胰腺、腮丝、精巢、卵巢、心脏和肌肉等 6 种组织器官中都有转录表达,在心脏中表达量最高,其次是肌肉、腮丝、卵巢和精巢,肝胰腺中表达量最低。而 CypA 蛋白在克氏原螯虾的肝胰腺、腮丝、精巢、心脏和肌肉中均有发现,大小约 17kDa,而在卵巢中未发现相应的蛋白。

在本研究中通过组织病理分析发现,与健康虾相比,在感染 WSSV 的克氏原螯虾心脏和肌肉组织中均出现了肌纤维断裂溶解的现象,心脏组织中细胞排列由井然有序变得杂乱无章;在肝胰腺组织中,出现了脂肪颗粒脱落、细胞空泡化和细胞膜溶解现象。而洪徐鹏等研究了克氏原螯虾 WSSV 感染后的鳃、肝胰腺和心肌组织病理组织学,结果发现细胞排列无序、细胞破裂、核仁皱缩等明显的病理变化(洪徐鹏等, 2014),此结果与本研究结果基本一致,可以相互印证。此外,在本研究中注射病毒悬液感染后 5—9d 出现个体死亡高峰,此结果与潘子豪等的人工感染实验结果基本相同(潘子豪等, 2013),进一步佐证克氏原螯虾是白斑综合征病毒的宿主之一, WSSV 可以引起克氏原螯虾的大规模死亡。

现有大量研究证明 CypA 涉及多种病理状态,包括感染和炎症(Liu *et al*, 1991; Sherry *et al*, 1992; Jin *et al*, 2000; Matsuda *et al*, 2000; Suzuki *et al*, 2006)。Qiu 等研究发现,在脂多糖刺激下,斑节对虾 (*Penaeus monodon*) CypA 基因的 mRNA 在肝胰腺和血液中显著上调(Qiu *et al*, 2009)。Lu 等(2013)研究了环境污染物邻苯二甲酸(Di-2-ethylhexylPhthalate, DEHP)对菲律宾蛤仔 CypA 等免疫相关基因的影响,结果发现暴露于 4mg/L 的 DEHP 使 CypA 的 mRNA 表达上

调了 4.72 倍,说明 CypA 可能参与贝类环境应激的免疫应答。Song(2009)用鳃弧菌(*V. anguillarum*)感染栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)2、4、8、16、24 和 48h 后,血液中 CypAmRNA 表达没有显著变化,但在性腺中却显著上调,感染后 4h 和 8h CypAmRNA 转录表达量分别达到了 22.59 和 7.20 倍。Dong 等(2015)研究发现黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) CypA 基因在肾脏中蛋白表达含量较高;在感染爱德华氏菌(*E. ictaluri*)后,肝脏、脾脏、肾脏、头肾中 CypA 的蛋白表达量均有少量上升。这些研究均显示, CypA 在水生生物的先天性免疫系统中发挥重要作用。Xu 等(2016)在发现牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)在类立克次体(Rickettsia-like organism, RLO)刺激下, CaCypA 转录表达明显增加,表明 CypA 在牡蛎体内参与抗 RLO 应激免疫防御。与此类似,在本研究中, WSSV 感染后在 24—36hpi 期间,心脏、肌肉、血淋巴组织中 PcCypA 转录表达出现了上调; 48—120hpi 期间鳃和肌肉组织有大量 PcCypA 转录表达,肝胰腺和精巢组织表达下调。96—120hpi 为感染响应后期阶段,肝胰腺和肠组织的 PcCypA 转录水平再次上调。研究结果表明, WSSV 感染后不同组织 CypA 基因对感染后的响应有时序差异。

本研究通过 WSSV 感染下克氏原螯虾 CypA 基因的表达响应研究,发现 WSSV 感染后克氏原螯虾 CypA 基因表达有不同程度的上调和下调,不同组织 CypA 基因对感染后的响应有时序差异。从而可以初步推断 CypA 在克氏原螯虾中可能参与机体的先天免疫应答,且由于不同组织中的 PcCypA 在病毒感染的同一时段表达水平具有明显差异,同时同一组织的 PcCypA 在病毒感染不同时段存在显著差别,表明 PcCypA 在机体内并非均匀分布,在抵御病毒侵染过程中的应答也有着明显的时序性。

4 结论

综上所述, CypA 基因对病毒感染后的响应有时序差异性,也有组织差异性,初步判定 CypA 在克氏原螯虾中可能参与机体的先天免疫系统,同时参与生物性免疫响应和物理性应激响应,下一阶段研究将进一步挖掘 CypA 在克氏原螯虾免疫系统中的作用机制,为克氏原螯虾病害防控提供基础数据支撑。

参 考 文 献

丁正峰, 薛 晖, 夏爱军等, 2008. 白斑综合征病毒在养殖克氏原螯虾中感染流行研究. 南京农业大学学报, 31(4):

- 129—133
- 丁兆坤, 辛文伦, 陈秀荔等, 2011. 凡纳滨对虾亲环素 A 基因的克隆及表达分析. 武汉大学学报(理学版), 57(4): 323—328
- 王旭辉, 2014. 小球藻亲环蛋白 A(CyPA)基因克隆与功能研究. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文
- 陈金桃, 宋天章, 尹红玲等, 2015. 重组日本血吸虫亲环素 A 的原核表达及免疫保护作用的研究. 热带医学杂志, 15(4): 429—432, 424
- 罗春, 徐灵, 何静等, 2015. 池蝶蚌 CyPA 的应激表达及对 Hela 细胞生长的影响. 水生生物学报, 39(3): 475—481
- 胡先勤, 付小哲, 董星星等, 2016. 鳃亲环蛋白 A 在传染性脾肾坏死病毒增殖中的作用. 水产学报, 40(1): 100—109
- 洪徐鹏, 陆宏达, 张庆华等, 2014. 黄芪多糖对克氏原螯虾抗白斑综合征病毒(WSSV)感染的效果研究. 上海海洋大学学报, 23(3): 423—428
- 雷质文, 黄捷, 张立敬等, 2002. 白斑综合征病毒(WSSV)的宿主调查. 海洋与湖沼, 33(3): 250—258
- 潘子豪, 杨政霖, 陆承平, 2013. 安徽地区克氏原螯虾白斑综合征的诊断及溯源. 微生物学报, 53(5): 492—497
- 潘克厚, 马晓磊, 石娟, 2008. 亲环素的研究进展与展望. 中国海洋大学学报(自然科学版), 38(3): 371—376
- 戴雅娟, 李江南, 郭焕成等, 2012. 细胞亲环蛋白 A 对猪瘟病毒增殖的影响. 中国预防兽医学报, 34(6): 432—435
- Allain F, Vanpouille C, Carpentier M *et al*, 2002. Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood t lymphocytes to extracellular matrix. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(5): 2714—2719
- Damsker J M, Okwumabua I, Pushkarsky T *et al*, 2009. Targeting the chemotactic function of CD147 reduces collagen-induced arthritis. Immunology, 126(1): 55—62
- Dong X X, Qin Z D, Hu X Q *et al*, 2015. Molecular cloning and functional characterization of cyclophilin A in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Fish & Shellfish Immunology, 45(2): 422—430
- Escobedo-Bonilla C M, Wille M, Sanz V A *et al*, 2007. Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile, specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei*. Diseases of Aquatic Organisms, 74(2): 85—94
- Feng W H, Xin Y, 2013. Progress in research on cyclophilin A and malignant tumors. Tumor, 33(10): 928—934
- Franke E K, Luban J, 1996. Inhibition of HIV-1 replication by cyclosporine A or related compounds correlates with the ability to disrupt the Gag-cyclophilin A interaction. Virology, 222(1): 279—282
- Guo N, Zhang K, Lv M H *et al*, 2015. CD147 and CD98 complex-mediated homotypic aggregation attenuates the CypA-induced chemotactic effect on Jurkat T cells. Molecular Immunology, 63(2): 253—263
- He S H, Peng K, Hong Y J *et al*, 2013. Molecular properties and immune defense of two ferritin subunits from freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii*. Fish & Shellfish Immunology, 34(3): 865—874
- Jin Z G, Melaragno M G, Liao D F *et al*, 2000. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. Circulation Research, 87(9): 789—796
- Liu J, Farmer J D Jr, Lane W S *et al*, 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. Cell, 66(4): 807—815
- Lu Y L, Zhang P, Li C H *et al*, 2013. Characterisation of immune-related gene expression in clam (*Venerupis philippinarum*) under exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate. Fish & Shellfish Immunology, 34(1): 142—146
- Matsuda S, Koyasu S, 2000. Mechanisms of action of cyclosporine. Immunopharmacology, 47(2—3): 119—125
- Pradeep B, Rai P, Mohan S A *et al*, 2012. Biology, host range, pathogenesis and diagnosis of white spot syndrome virus. Indian Journal of Virology, 23(2): 161—174
- Qiu L H, Jiang S G, Huang J H *et al*, 2009. Molecular cloning and mRNA expression of cyclophilin A gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish & Shellfish Immunology, 26(1): 115—121
- Sánchez-Paz A, 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. Veterinary Research, 41(6): 43
- Sherry B, Yarlett N, Strupp A *et al*, 1992. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89(8): 3511—3515
- Song X Y, 2009. Molecular cloning, characterization and expression of Lectins from *Argopecten irradians* and Cyclophilin A from *Chlamys farreri*. Northwest A & F University
- Suzuki J, Jin Z G, Meoli D F *et al*, 2006. Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. Circulation Research, 98(19): 811—817
- Wang C H, Rong M Y, Wang L *et al*, 2014. CD147 up-regulates calcium-induced chemotaxis, adhesion ability and invasiveness of human neutrophils via a TRPM-7-mediated mechanism. Rheumatology, 53(12): 2288—2296
- Wang M Q, Zhang D X, Wang L L *et al*, 2013. The molecular characterization of a cyclophilin A from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* and the antifungal activity of its recombinant protein. Electronic Journal of Biotechnology, 16(2): 230—240
- Xu T, Xie J S, Yang S B *et al*, 2016. First characterization of three cyclophilin family proteins in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. Fish & Shellfish Immunology, 55: 257—266
- Yeh H Y, Klesius P H, 2008. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, cyclophilin A and B cDNA characterization and expression analysis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 121(3-4): 370—377
- Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M *et al*, 2002. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. Journal of Biological Chemistry, 277(25): 22959—22965
- Zhou D J, Mei Q, Li J T *et al*, 2012. Cyclophilin A and viral

infections. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424(4): 647—650
Zhu J J, Lin F, Li F *et al*, 2017. Molecular identification and

expression analysis of a novel cyclophilin a gene in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 72: 383—388

EXPRESSION OF CYP A AFTER WSSV CHALLENGE IN RED SWAMP CRAYFISH, *PROCAMBARUS CLARKII*

ZHU Jun-Jie^{1,2}, LIN Feng³, WANG Yan¹, ZHANG Hai-Qi³

(1. *College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*; 2. *College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China*; 3. *Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China*)

Abstract Cyclophilins A is a family of highly conserved and multi-functional proteins that exist extensively from microorganisms to mammals. In order to explore the immune function of CypA in *Procambarus clarkii* after WSSV challenge, real-time quantitative PCR was used to detect the expression characteristics after WSSV challenge. Histologic observation under a light microscope showed that the heart, the hepatopancreas and the striate muscle of the abdomen were severely affected. PcCypA transcriptional levels were significantly up-regulated in the heart and the hepatopancreas tissues at 0—24hpi. After 48hpi, CypA transcripts in the gill and the muscle were significantly increased, while transcripts in the hepatopancreas and the testicle decreased. During 96—120hpi, CypA transcripts in the hepatopancreas and the intestine were significantly increased again. The results suggested that CypA might be involved in the immune response of *P. clarkii*.

Key words *Procambarus clarkii*; CypA; qRT-PCR; WSSV