

# 文蛤(*Meretrix meretrix*)幼虫发育过程中细胞凋亡 和 Caspase 功能分析\*

王晓梅<sup>1,2</sup> 刘保忠<sup>1</sup> 相建海<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘要** 以文蛤为研究对象,利用 TUNEL 技术(Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling)检测了文蛤各发育阶段的幼虫中细胞凋亡的部位,利用 Caspase 原位标记分析了有活性的 Caspase 在幼虫中的分布情况,用 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 处理受精后 4 天和 5 天的变态前幼虫,同时以抑制剂的有机溶剂 DMSO(Dimethyl sulfoxide)作对照,根据其对幼虫变态的影响,分析 Caspase 在文蛤幼虫变态中的作用。细胞凋亡检测结果显示,幼虫发育过程中发生细胞凋亡的部位主要在壳顶幼虫的面盘,说明细胞凋亡可能是文蛤幼虫变态过程中面盘退化的主要机制;在担轮幼虫至壳顶幼虫中都检测到有活性的 Caspase,说明整个幼虫形态变化过程中都有 Caspase 的参与;用 Caspase 特异性抑制剂处理变态前幼虫,发现处理组幼虫变态率均显著低于对照组( $P < 0.05$ ),说明 Caspase 在变态早期和晚期都有重要作用,同时发现 DMSO 对幼虫变态有诱导作用,可以在生产中加以利用。

**关键词** 文蛤幼虫,细胞凋亡,Caspase,发育,变态

**中图分类号** S968.3

细胞凋亡(apoptosis)的概念是 Kerr 等(1972)提出的,是指一种参与了生物体多种过程的细胞去除机制,是由基因编程调控的细胞主动自杀过程。生物体通过这种机制完成对衰老细胞和畸形细胞的清除。细胞凋亡可以分为 Caspase 依赖性凋亡和 Caspase 非依赖性凋亡(Kroemer *et al.*, 2005)。在人类中最早发现的 Caspase 蛋白酶是一种半胱氨酸蛋白酶,与线虫细胞凋亡密切相关的 CED-3 同源,随后陆续发现了很多类型,因为均具有特异性地将肽链从天门冬氨酸(Asp)之后切断的特点,故被统一命名为 Caspase (Alnemri *et al.*, 1996)。各成员的分子量大约在 30—50kD 之间,通常以无活性的蛋白酶原形式存在,在细胞内合成和分泌。

细胞凋亡是生物生长发育过程中一种非常关键的作用机制(Meier *et al.*, 2000)。最早关于细胞凋亡研

究始于对线虫发育的研究,随后在多个物种中都相继进行了探索(Okusu, 2002)。而很多生物在发育阶段需要经历一个变态过程,细胞凋亡在其中的主导作用也得到了公认,主要分解成体不需要的组织细胞,如幼体运动相关的肌肉和神经组织。因此,人们对各种物种变态过程中的作用机理进行了大量研究,如海鞘(*Ciona intestinalis*)(Chambon *et al.*, 2002; Rowe *et al.*, 2005)、昆虫(Ricci *et al.*, 2004; Vilaplana *et al.*, 2007); 两栖类(Du Pasquier *et al.*, 2006; Domanski *et al.*, 2007)等等。对这些物种的研究都表明,细胞凋亡在个体发育中的形态改变等过程中均起到关键作用。

文蛤(*Meretrix meretrix*)是一种在东亚各国沿海和滩涂地区广泛分布的双壳贝类,是我国重要的养殖贝类(沈怀舜等, 2003)。与其它双壳贝类幼虫发育过程相似,文蛤幼虫的发育也要经过浮游生活阶段

\* 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目资助, 2006AA10A410 号; 农业部行业专项, nyhyzx07-047 号; 山东省优秀青年科学家奖励基金, 2005BS07005 号。王晓梅, 博士研究生, E-mail: wangxiaomei@ms.qdio.ac.cn、xiaomei\_wang328@126.com

通讯作者: 刘保忠, E-mail: bzliu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2008-03-19, 收修改稿日期: 2008-09-30

(担轮幼虫、面盘幼虫和壳顶幼虫), 然后经过附着变态成为稚贝, 进而变为营底栖生活的成体。目前, 对于贝类幼虫发育过程中的细胞凋亡研究比较少, 只在腹足类神经发育方面有过一些研究(Leise *et al.*, 2004; Gifondorwa *et al.*, 2006)。在贝类幼虫发育及变态过程中发生很多变化, 如壳的生成、消化系统的完善、肌肉组织的改变、足的生成等(Gros *et al.*, 1996), 其中面盘的退化是形态上的重要变化之一(Loosanoff, 1961; Scheltema, 1962), 这些改变是否是由于细胞凋亡发生作用, 以及 Caspase 在其中的功能目前还没有相关研究。本文中对各发育时期文蛤幼虫进行了细胞凋亡和活性 Caspase 的检测, 对文蛤幼虫变态中的细胞凋亡情况进行了初步分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

将购买的文蛤(*Meretrix meretrix*)亲贝(山东潍坊)放入自然温度的海水中暂养, 随后每天升温 0.5℃, 至水温到 25℃, 人工阴干 5—6h, 然后放到 26℃ 海水中刺激亲贝排放精子和卵子, 在海水中自然受精和孵化。在幼虫培育阶段, 每日换水一次, 换水量为 100%。每日投喂等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)四次(王国栋等, 2006)。

幼虫在水温为 26℃ 的海水中培养, 受精后约 12h, 用 15μm 筛绢收集担轮幼虫(L1); 分别在 24h 和 5d 时, 用 60μm 筛绢收集 D 形幼虫(L2)和壳顶幼虫(L3)。

Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 和 Caspase 原位检测标记(CaspACE™ FITC-VAD-FMK *In Situ* Marker)购于 Promega 公司, TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(*In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red)购于 Roche 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 不同发育时期幼虫中细胞凋亡部位的检测

利用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒分析 L1、L2 和 L3 期幼虫中发生凋亡的细胞分布。首先将幼虫收集固定: L1 期收集后直接用 4% 多聚甲醛-PBS 溶液固定过夜; L2 和 L3 期的幼虫收集到烧杯中, 待幼虫浮游起来, 逐滴加入 1mol/L MgCl<sub>2</sub> 将幼虫麻痹, 保持贝壳处于张开状态, 立即用 4% 多聚甲醛-PBS 溶液固定 4 过夜(Wang *et al.*, 2006)。过夜后将固定的幼虫转入 100% 甲醇中, 放于 -20℃ 保存待用。

后续实验步骤根据商品说明略作修改: PBS 洗 3 次; 用新鲜配置的含有 0.5% Triton X-100 的 0.1% 柠

檬酸钠溶液渗透, 置于室温 30min, 在 PBS 中洗一次; 分出用于做阳性和阴性对照的样品, 加入 1U/μl DNase (Promega)37℃ 温育 30min; 再用 PBS 洗 3 次; 避光加入新鲜配置的 50 μl 末端转移酶溶液和标记物 (TUNEL reaction mixture), 37℃ 保温 60min, 阴性对照加入没有末端转移酶的标记物溶液; 在 PBS 中洗 3 次; 最后用荧光显微镜观察并拍照。

#### 1.2.2 Caspase 在不同发育时期幼虫分布部位的检测

用 Caspase 原位标记检测有活性的 Caspase 在 L1、L2 和 L3 期幼虫中的分布部位。用 1.5ml 离心管在 100μl 过滤海水中加入约 50 个幼虫。以下步骤全部避光进行: 加入 CaspACE FITC-VAD-FMK *In situ* Marker (Promega), 终浓度为 10μmol/L, 放置 20min, 离心、弃上清; 再加入 1ml 过滤海水, 让幼虫浮游起来 5min; 随后逐滴加入 1mol/L 的 MgCl<sub>2</sub>, 直到幼虫麻痹下沉, 用海水配置的 4% PFA 将幼虫固定, 4℃ 2 h; 固定后幼虫在过滤海水中洗 3 次, 每次 5min; 放在荧光显微镜下观察并拍照。

#### 1.2.3 Z-VAD-FMK 对幼虫变态影响的检测

Z-VAD-FMK 是 Caspase 广谱抑制剂。幼虫在 26℃ 水温下培养, 分别收集受精后第 4 天和第 5 天的浮游幼虫, 分装到六孔板中。实验处理组和空白对照组都设定 6 个平行, 每个约 50 个幼虫; 处理组根据预实验设定 Z-VAD-FMK 浓度为 1μmol/L 的实验组及相应浓度的 DMSO 对照组(表 1), 约 12h 后, 观察和记录浮游幼虫和变态幼虫的数目。变态率的计算用变态的幼虫数目占幼虫总数的比例, 即变态率 = 变态幼虫数目 / (变态幼虫数目 + 浮游幼虫数目 + 死亡幼虫数目) × 100%。得到的数据用 SPSS11.0 软件进行 One Way ANOVA 统计分析。

表 1 各组 Z-VAD-FMK 和 DMSO 的终浓度

Tab.1 The final concentration of DMSO and Z-VAD-FMK in each group

组别	DMSO(μl/ml)	Z-VAD-FMK(μmol/L)
空白对照组	0	0
DMSO 对照组	0.2	0
Z-VAD-FMK 处理组	0.2	1.0

## 2 结果

### 2.1 文蛤幼虫发育过程中凋亡细胞的分布

在 L1 期幼虫中没有检测到发生凋亡的细胞(图 1A), 而在 L2 期, 只在面盘检测到少量信号(图 1B);

到 L3 期, 即变态前的壳顶幼虫期, 在幼虫面盘上检测到大量细胞发生凋亡(图 1C)。

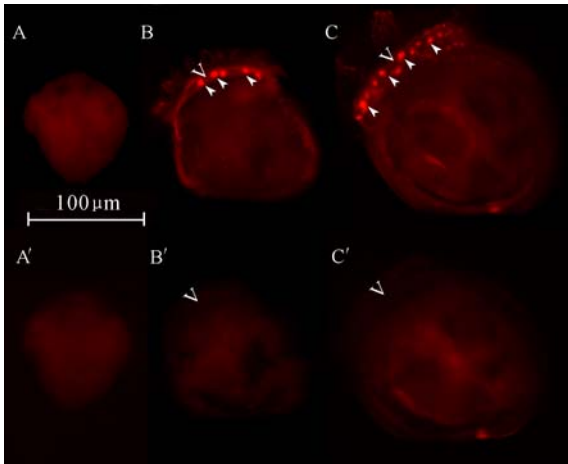


图 1 利用凋亡检测试剂盒在各个发育时期幼虫中检测凋亡细胞分布结果

Fig.1 Detection on the apoptosis in larvae in different developmental stages with apoptosis detection kit  
A: 担轮幼虫期(L1); B: D 形幼虫期(L2); C: 壳顶幼虫期(L3)。  
A'、B'、C'分别为 A、B、C 的对照。B、C 中的箭头指示信号部位, V: 幼虫面盘

## 2.2 活性 Caspase 在不同发育时期幼虫中的分布

结果显示, 在 L1 期, 有活性的 Caspase 分布在幼虫纤毛环的下方(封面图片 a); 在 L2 期, 在幼虫的胃部有两个信号, 在幼虫后侧背部有信号(封面图片 b); 在 L3 期, 在面盘下部有信号, 而且在幼虫后闭壳肌长成的部位有信号(封面图片 c)。

## 2.3 Caspase 抑制剂对变态幼虫的影响

利用 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 处理受精后 4 天的壳顶幼虫, 处理组的变态率( $74.67\% \pm 10.56\%$ )显著性低于 DMSO 对照组( $97.33\% \pm 2.50\%$ )(表 2) ( $P < 0.05$ ), 而 DMSO 对照组的幼虫变态率显著性高于空白对照组( $70.00\% \pm 6.22\%$ )( $P < 0.05$ )。Z-VAD-FMK 处理受精后 5 天浮游的壳顶幼虫, 结果与处理 4 天的结果相似, 处理组的变态率( $37.47\% \pm 6.06\%$ )仍然显

表 2 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 和 DMSO 处理受精后 4 天和 5 天壳顶幼虫的变态率

Tab.2 The metamorphosis rate of 4-day-old and 5-day-old larvae under treatment of caspase inhibitor Z-VAD-FMK and DMSO

幼虫发育时间	空白对照组	DMSO 对照组	Z-VAD-FMK 处理组
受精后 4 天	$70.00 \pm 6.22$	$97.33 \pm 2.50^*$	$74.67 \pm 10.56$
受精后 5 天	$51.84 \pm 3.23$	$68.21 \pm 16.90^*$	$37.47 \pm 6.06$

\*表示比同行其它各组有显著性差异( $P < 0.05$ )

著低于和 DMSO 对照组( $68.21\% \pm 16.90\%$ )( $P < 0.05$ ), DMSO 对照组的幼虫变态率显著性高于空白对照组( $51.84 \pm 3.23\%$ )。两次实验结果, 空白对照和处理组之间均没有显著性差异。

## 3 讨论

细胞凋亡的检测方法有很多种(Elmore, 2007), 本文中采用的是 TUNEL 法(Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling)(Kressel *et al*, 1994), 即利用凋亡细胞 DNA 产生缺刻, 在其末端加入标记, 从而可以观察到发生凋亡的细胞。这种方法主要用于检测处于细胞凋亡晚期的细胞(朱启星等, 2002)。凋亡检测的结果显示细胞凋亡的主要部位出现在变态前的 L3 期的幼虫面盘上, 说明幼虫变态时的面盘退化伴随着面盘上细胞凋亡。

目前哺乳动物中已知的 Caspase 主要可以分成三类。第一类是参与炎症反应, 第二类是在细胞凋亡中起启动的作用, 称为调控 Caspase, 第三类是细胞凋亡的直接执行者, 称为效应 Caspase, 主要进行蛋白质酶解作用。Caspase 的结构可以分成三部分, N-端前肽(prodomain)、大亚基(p20, 20kD)和小亚基(p10, 10kD), 在大亚基上均含有 QACXG 五肽保守序列(X 为任何氨基酸)。在低等生物中也对 Caspase 进行了研究, 如海鞘(Chambon *et al*, 2002)、水螅(Cikala *et al*, 1999)、海葵(Dunn *et al*, 2006)等。在贝类中, 主要是对免疫中细胞凋亡的作用和 Caspase 活性分析研究比较多(Terahara *et al*, 2003, 2005; Sokolova *et al*, 2004), 发育方面还未见相关报道。作者利用 CaspACE<sup>TM</sup> FITC- VAD-FMK *In Situ* Marker, 检测了有活性的 Caspase 在不同时期文蛤幼虫中的分布情况, 原理是利用带荧光标记的 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone), 其可以特异性结合到 Caspase 活性中心, 即可达到原位标记有活性的 Caspase 的目的, 而 Caspase 家族成员的活性中心一致, 所以该方法会检出所有类型的 Caspase。实验结果显示, 在不同的发育时期幼虫中都能检测到阳性信号, 但是有活性的 Caspase 的分布部位不在面盘上, 说明幼虫面盘上的细胞凋亡可能是通过非 Caspase 依赖性的途径(Lockshin *et al*, 2002)。但是, Caspase 不仅仅只在细胞凋亡中起作用, 其在发育过程中细胞生长和分化中也有重要作用(Wang *et al*, 2000)。在 L1 期就能检测到有活性的 Caspase(图 1A), 其可能与 L1 期到 L2 期的

形态变化有关。在 L2 期, 活性 Caspase 分布在胃部, 可能是参与了消化系统的发育(Ng *et al*, 2005)。L3 期表达部位在面盘下部, 与幼虫肌肉发育状况对比发现, 活性 Caspase 所在部位与面盘下部的肌肉束所在位置相近(王国栋, 2006)<sup>1)</sup>, 在变态时, 该肌肉束逐渐分解, Caspase 很有可能参与了这个过程; 同时, 在这个时期的另外一个信号点的位置接近后闭壳肌的形成部位, 文蛤幼虫发育的过程中开始只有前闭壳肌, 后闭壳肌是在受精后 4 天左右才出现的, 这一巧合提示 Caspase 可能参与后闭壳肌的生长。在非洲爪蟾中已发现, 抑制 Caspase-3 的活性会阻止幼体尾部的再生(Tseng *et al*, 2007), 说明 Caspase 不但可以分解不再需要的组织, 也会为新生组织的出现去除障碍。在文蛤幼虫中, Caspase 有可能清理将长出后闭壳肌部位周围多余的组织, 为后闭壳肌的生长提供空间。在实验中作者还注意到, L3 期面盘下部的信号点在部分幼虫中并不明显, 或者检测不到, 这与部分幼虫不能及时变态是否存在关联还需要进一步的研究才能确定。

Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK(Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK)是一种不可逆的 Caspase 广谱抑制剂(Cell permeable pan Caspase inhibitor), 分子式为 Z-Val-Ala-Asp-CH<sub>2</sub>F, 即 C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, 分子量为 453.5, 是一种最常用的细胞凋亡抑制剂, 可以穿透细胞膜抑制细胞内的 Caspase。用 Z-VAD-FMK 处理受精后 4 天和 5 天的幼虫, 处理组的幼虫变态率都显著低于 DMSO 对照组, 这与作者用组织蛋白酶 B 的特异性抑制剂 CA074Me 的研究结果不同, CA074Me 只对变态早期的幼虫有明显作用(王晓梅, 2008)<sup>2)</sup>, 说明抑制了文蛤幼虫变态早期和晚期发挥作用的 Caspase 都会对幼虫变态造成影响。

DMSO 在很多细胞系中具有诱导细胞凋亡的作用(Ginestier-Verne *et al*, 1996; Trubiani *et al*, 1996; Marthyn *et al*, 1998), 可用来作为细胞凋亡的诱导剂。在本实验中 DMSO 是 Caspase 抑制剂的溶剂, 用含有 DMSO 的海水做对照, 与空白对照幼虫变态情况对比时发现, DMSO 对文蛤幼虫变态有促进作用, 很可能是由于诱导细胞凋亡的作用, 在生产过程中可以尝试利用 DMSO 作为贝类幼虫变态的诱导剂。

## 参 考 文 献

- 王国栋, 刘保忠, 唐保军等, 2006. 文蛤(*Meretrix meretrix*)幼虫和稚贝时期中枢神经系统的初步观察. 海洋与湖沼, 37(增刊): 297—301
- 朱启星, 沈 彤, 2002. 细胞凋亡检测的研究进展. 安徽医科大学学报, 37(6): 411—414
- 沈怀舜, 朱建一, 丁亚平等, 2003. 我国沿海三个文蛤地理群的 RAPD 分析. 海洋学报, 25(5): 97—102
- Alnemri E S, Livingston D J, Nicholson D W *et al*, 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell, 87(2): 171—176
- Chambon J P, Soule J, Pomies P *et al*, 2002. Tail regression in *Ciona intestinalis* (Prochordate) involves a Caspase-dependent apoptosis event associated with ERK activation. Development, 129(13): 3105—3114
- Cikala M, Wilm B, Hobmayer E *et al*, 1999. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra*. Current Biology, 9(17): 959—962
- Domanski D, Helbing C C, 2007. Analysis of the *Rana catesbeiana* tadpole tail fin proteome and phosphoproteome during T<sub>3</sub>-induced apoptosis: identification of a novel type I keratin. BMC Developmental Biology, 7(1): 94
- Du Pasquier D, Rincheval V, Sinzelle L *et al*, 2006. Developmental cell death during *Xenopus* metamorphosis involves BID cleavage and caspase 2 and 8 activation. Developmental Dynamics, 235(8): 2083—2094
- Dunn S R, Phillips W S, Spatafora J W *et al*, 2006. Highly conserved caspase and Bcl-2 homologues from the sea anemone *Aiptasia pallida*: lower metazoans as models for the study of apoptosis evolution. Journal of Molecular Evolution, 63(1): 95—107
- Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic Pathology, 35(4): 495—516
- Gifondorwa D J, Leise E M, 2006. Programmed cell death in the apical ganglion during larval metamorphosis of the marine mollusc *Ilyanassa obsoleta*. Biological Bulletin, 210(2): 109—120
- Ginestier-Verne C, Château M T, Bureau J P, 1996. Implication of tyrosine kinases and protein kinase C in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis. Analytical Cellular Pathology, 11(2): 115—126
- Gros O, Darrasse A, Durand P *et al*, 1996. Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve *Codakia orbicularis*. Applied Environmental Microbiology, 62(7): 2324—2330
- Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R, 1972. Apoptosis: a basic

1) 王国栋, 2006. 调控文蛤幼虫变态的肾上腺素能受体类型确定及幼虫发育中神经和肌肉系统的变化. 中国科学院研究生院博士学位论文

2) 王晓梅, 2008. 文蛤(*Meretrix meretrix*)幼虫部分生长发育相关基因的克隆和功能分析. 中国科学院研究生院博士学位论文

- biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4): 239–257
- Kressel M, Groscurth P, 1994. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by *in situ* labeling of fragmented DNA. *Cell and Tissue Research*, 278(3): 549–556
- Kroemer G, Martin S J, 2005. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nature Medicine*, 11: 725–730
- Leise E M, Kempf S C, Durham N R *et al*, 2004. Induction of metamorphosis in the marine gastropod *Ilyanassa obsoleta*: 5HT, NO and programmed cell death. *Acta Biologica Hungarica*, 55(1–4): 293–300
- Lockshin R A, Zakeri Z, 2002. Caspase-independent cell deaths. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(6): 727–733
- Loosanoff V L, 1961. Partial metamorphosis in *Anomia simplex*. *Science*, 133: 2070–2071
- Marthyn P, Beuscart A, Coll J *et al*, 1998. DMSO reduces CSF-1 receptor levels and causes apoptosis in *v-myc* immortalized mouse macrophages. *Experimental Cell Research*, 243(1): 94–100
- Meier P, Finch A, Evan G, 2000. Apoptosis in development. *Nature*, 407(6805): 796–801
- Ng A N Y, de Jong-Curtain T A, Mawdsley D J *et al*, 2005. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Developmental Biology*, 286(1): 114–135
- Okusu A, 2002. Embryogenesis and development of *Epiménia babai* (Mollusca Neomeniomorpha). *Biological Bulletin*, 203(1): 87–103
- Ricci J E, Muñoz-Pinedo C, Fitzgerald P *et al*, 2004. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell*, 117(6): 773–786
- Rowe I, Le Blay K, Du Pasquier D *et al*, 2005. Apoptosis of tail muscle during amphibian metamorphosis involves a caspase 9-dependent mechanism. *Developmental Dynamics*, 233(1): 76–87
- Scheltema R S, 1962. Pelagic larvae of New England intertidal gastropods I. *Nassarius obsoletus* Say and *Nassarius vibex* Say. *Transactions of the American Microscopical Society*, 81(1): 1–11
- Sokolova I M, Evans S, Hughes F M, 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *Journal of Experimental Biology*, 207(19): 3369–3380
- Terahara K, Takahashi K G, Mori K, 2003. Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(6–7): 521–528
- Terahara K, Takahashi K G, Mori K, 2005. Pacific oyster hemocytes undergo apoptosis following cell-adhesion mediated by integrin-like molecules. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 141(2): 215–222
- Trubiani O, Ciancarelli M, Rapino M *et al*, 1996. Dimethyl sulfoxide induces programmed cell death and reversible G1 arrest in the cell cycle of human lymphoid pre-T cell line. *Immunology Letters*, 50(1–2): 51–57
- Tseng A S, Adams D S, Qiu D *et al*, 2007. Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 301(1): 62–69
- Vilaplana L, Pascual N, Perera N *et al*, 2007. Molecular characterization of an inhibitor of apoptosis in the Egyptian armyworm, *Spodoptera littoralis*, and midgut cell death during metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12): 1241–1248
- Wang G D, Liu B Z, Tang B J *et al*, 2006. Pharmacological and immunocytochemical investigation of the role of catecholamines on larval metamorphosis by  $\alpha$ -adrenergic-like receptor in the bivalve *Meretrix meretrix*. *Aquaculture*, 258(1–4): 611–618
- Wang J, Lenardo M J, 2000. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *Journal of Cell Science*, 113(5): 753–757

## APOPTOSIS AND ROLE OF CASPASE IN DEVELOPMENT OF *MERETRIX MERETRIX* LARVAE

WANG Xiao-Mei<sup>1,2</sup>, LIU Bao-Zhong<sup>1</sup>, XIANG Jian-Hai<sup>1</sup>

(1. *Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;*

2. *Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049*)

**Abstract** Apoptosis plays an important role in larval development of species. Taking clam *Meretrix meretrix* as an example, to the apoptosis and function of caspase in bivalve larvae development and metamorphosis were studied. Apoptosis was detected in larvae at different stages with TUNEL labeling (Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling). The distribution of activated caspase in larvae was examined with CaspACE<sup>TM</sup> FITC-VAD-FMK *In Situ* Marker. The pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) was used to analyze the function of caspase in 4-day-old and 5-day-old larvae post fertilization. Dimethyl sulfoxide (DMSO), the solvent of the inhibitor, was added to seawater as control. According to the effect on metamorphosis, the function of caspases in larvae was analyzed. The results reveal that the main apoptosis event occurred in the velum of pediveliger before metamorphosis, indicating that the degradation of velum might be the process of apoptosis. The activated caspases were observed in the larvae from trochophore to pediveliger, suggesting the caspases are involved in the whole developmental process. Having detected no signal in the velum, we proposed that the apoptosis in velum might be caspase-independent. The 4-day-old and 5-day-old larvae under treatment of caspase inhibitor showed significant lower metamorphosis rates than that in the DMSO control group ( $P < 0.05$ ). The results indicate that the caspases had functioned in early and later stages of metamorphosis, and also that DMSO could be an inducer in larvae metamorphosis.

**Key words** *Meretrix meretrix* larvae, Apoptosis, Caspase, Development, Metamorphosis