

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170328003

http://www.yyqxjz.cn/

马骊, 葛倩倩, 许杨, 彭素晓, 李健. 脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 *TCTP* 克隆及自噬调控相关基因在卵巢发育期的表达. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 101-109

Ma L, Ge QQ, Xu Y, Peng SX, Li J. Cloning of the translationally controlled tumor protein gene (*TCTP*) and expression analysis of autophagy regulatory related genes during the development of ovary in *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 101-109

脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 *TCTP* 克隆及自噬调控相关基因在卵巢发育期的表达*

马 骊^{1,2} 葛倩倩² 许 杨^{1,2} 彭素晓^{1,2} 李 健^{2,3}①

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 为深入了解脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)卵巢发育和卵黄蛋白原发生的分子机制,本研究克隆得到脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 *TCTP*,并结合自噬调控基因 *TCTP*、*Hif-1α*、*Beclin1* 和 *Bcl-2* 在卵巢发育期的表达水平,阐释脊尾白虾卵黄蛋白原合成过程中的分子调控特征。研究显示,脊尾白虾 *TCTP* 基因 cDNA 全长为 732 bp,编码 168 个氨基酸,具有典型的 TCTP1 和 TCTP2 功能域以及 PKC 和 TK II 等 mTOR 信号通路相关的磷酸化位点。同时发现,甲壳动物 *TCTP* 普遍缺乏在其他动植物中高度保守的 C 末端的 cys 残基。进化分析显示,脊尾白虾 *TCTP* 与中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 亲缘关系最近。4 种自噬调控基因在脊尾白虾卵巢发育期的表达结果显示,肝胰腺 *TCTP* 基因从增殖期到产后恢复期呈递减趋势;肝胰腺 *Hif-1α*、*Beclin1* 和 *Bcl-2* 基因表达趋势相似,即从增殖期到小生长期高表达,大生长期极显著下降,表达量最低($P<0.01$),这与外源性卵黄蛋白原的合成趋势大致相反。这些自噬调控基因可能通过自噬作用共同调节外源性卵黄蛋白原的合成。卵巢 *TCTP* 基因在小生长期表达量最高;卵巢 *Hif-1α* 基因从增殖期到产后恢复期持续升高,这与内源性卵黄蛋白原表达趋势相似;卵巢 *Beclin1* 基因在大生长期表达量最高,与脊尾白虾卵巢 *EcR* 表达趋势相似,与卵巢 *Bcl-2* 基因表达趋势相反,这些自噬调控基因可能通过自噬作用共同促进内源性卵黄蛋白的合成。本研究表明,自噬调控基因 *TCTP*、*Hif-1α*、*Beclin1* 和 *Bcl-2* 在脊尾白虾卵巢发育时期相互协调共同作用,可能通过自噬作用调节脊尾白虾卵黄蛋白原的合成和卵巢发育。

关键词 脊尾白虾; *TCTP*; 细胞自噬; 卵黄蛋白; 表达分析

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-00101-09

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)因繁殖周期长、卵巢可连续多次发育并抱卵繁殖而为人们所关

* 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48)、泰山产业领军人才工程项目(LJNY2015002)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016009)和青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)共同资助[This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-48), Program of Shandong Leading Talent (LJNY2015002), Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016009), and the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology].马 骊, E-mail: malidj093@qq.com

① 通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-03-28, 收修改稿日期: 2017-04-20

注,是研究十足目真虾繁殖机制的潜在模式生物。卵黄蛋白原作为卵巢成熟和胚胎发育的营养物质,在卵黄合成期表达并积累,与脊尾白虾的繁殖力紧密相关(栗治国等,2014)。研究表明,脊尾白虾卵黄蛋白原(Vg)的合成受温度、激素等调控,主要在胰腺腺内合成(张美,2015;李志敏等,2016;梁俊平等,2015),这与日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)等相似,而与日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、短沟对虾(*Penaeus vannamei*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等卵黄蛋白原主要在卵巢内合成具有较大区别(Yano *et al.*, 1987; Fainzilber *et al.*, 1992)。组织学观察发现,甲壳动物卵母细胞的成熟伴随着细胞自噬的发生:卵黄发生过程中,卵母细胞内囊泡结构增加,溶酶体通过吞噬线粒体、内质网等细胞器,形成自噬溶酶体并产生卵黄颗粒(王玉凤等,1999;赵梦然等,2009)。Suwansa-ard 等(2016)研究发现,甲壳动物自噬标记蛋白含有其他动物自噬蛋白的保守基序,免疫组化分析显示,罗氏沼虾自噬标记蛋白 Beclin1、LC3 等在卵黄发生的卵母细胞质(阶段 3 和 4)检测呈阳性,而在卵原细胞中不明显。这说明自噬与甲壳动物卵黄发生关系密切,但自噬在甲壳动物卵巢发育中的分子调控尚不清楚。

细胞自噬在哺乳动物中的研究比较深入,可由氧气缺乏、营养缺乏及其他应激所引起,由溶酶体等细胞器介导,在维持细胞内环境稳定、组织发育、肿瘤发生、免疫调节等方面发挥重要作用。缺氧诱导因子(Hif-1)是含有 α 和 β 两种亚基的转录因子,可由缺氧环境诱导并激活上百个有利于细胞在低氧环境中生存的基因参与细胞自噬调控。翻译控制肿瘤蛋白(TCTP)可与 Hif-1 α 竞争结合于 VHL 的 β 结构域,保护 Hif-1 α 不被降解,从而促进自噬发生(Chen *et al.*, 2013)。Beclin1 是哺乳动物自噬体的诱导和成核过程的关键靶位点,可与 VPS34、VPS15 等形成 PI3K III 复合物正调控细胞自噬,是自噬形成的关键(Funderburk *et al.*, 2010)。凋亡蛋白 Bcl-2 可以与 Beclin1 结合抑制 PI3K III 复合物形成,从而负调控自噬的发生(He *et al.*, 2010)。

翻译控制肿瘤蛋白(Translationally controlled tumor protein, TCTP)是一种在真核细胞中广泛表达的高保守多功能蛋白,因在大多数癌症细胞中高表达而闻名,以促增殖、促发育和参与免疫调节等功能而为人们所熟知(Batisti *et al.*, 2012)。哺乳动物 TCTP 的多功能性早已得到证实,调节机制的研究也较多。TCTP 的 Ser46 残基磷酸化可调节细胞骨架稳定性(Yarm, 2002)。TCTP 通过与 Oct4 启动子的 SF1 位点结合调

节细胞分化(Cheng *et al.*, 2012)。TCTP 可通过与 mTOR 信号通路成员的相互作用来调节细胞的增殖、凋亡等(Bommer *et al.*, 2015; Chuang *et al.*, 2016)。另外,Chen 等(2013、2014)研究发现,TCTP 还在哺乳动物细胞自噬中具有重要的调节作用,通过 AMPK-ULK1 通路激活了 mTOR 下游表达起始细胞自噬,同时它还可通过 HIF-1 α 调节自噬活性。随着 Bangrak 等(2004)发现,TCTP 在对虾抗病毒中具有重要作用,TCTP 在甲壳动物中的免疫作用成为研究热点。Leu 等(2013)进一步研究证实,对虾 Pm-fortilin(TCTP 同源类似物)可被 WSSV 诱导表达,通过 Bax 抑制线粒体触发的细胞凋亡。近年来,越来越多的研究发现,许多甲壳动物 TCTP 在其卵巢成熟的早期阶段呈显著性高表达,普遍认为这与卵母细胞组装细胞骨架相关。Loongyai(2007)等还发现,TCTP 可与 EF-1 α 形成聚合物,通过细胞增殖促进卵巢发育。Makkapan 等(2011)研究表明,5-羟色胺可通过促进 TCTP 在墨吉对虾(*Penaeus merguensis*)卵巢中的表达促进卵巢发育,同时上调的还有甲基化尼脂。

本研究通过克隆脊尾白虾 TCTP 基因,并研究自噬调控基因 TCTP、Hif-1 α 、Beclin1 和 Bcl-2 等在脊尾白虾卵巢发育期胰腺腺和卵巢中的表达,阐释自噬在脊尾白虾卵巢发育中的作用,为理解脊尾白虾卵黄蛋白原合成的分子调控过程、提高脊尾白虾繁殖力提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验用脊尾白虾购自山东日照海辰水产有限公司。

1.2 实验试剂

Trizol 试剂购自美国 Ambion 公司;反转录试剂盒 Primescript RT Reagent Kit with gDNA Eraser、SmartTM RACE cDNA Amplification Kit、PMD18-T 载体、大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、定量试剂盒 SYBR[®] Premix Ex TaqTM 和 dNTP 购自大连 TaKaRa 公司;HiFi Taq 酶购自 TransGen Biotech 公司;DL2000 Marker 购自天根生物有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自康为世纪有限公司;其他试剂为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 脊尾白虾 TCTP 基因克隆 取健康活泼个体的组织,按照 Trizol 试剂说明书提取脊尾白虾总 RNA,检测其完整性及含量。按照 Primescript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 说明书合成 cDNA 第一

链。按照 SmartTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书合成 RACE-Ready-cDNA。

参照脊尾白虾转录组和 NCBI 上 Blast 的比对结果, 利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物, 对中间片段进行克隆, 以合成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为 Premix Ex *Taq*TM 5 μ l; 正反向引物各 0.4 μ l; 模板 0.5 μ l; 灭菌双蒸水 3.7 μ l。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 35 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物电泳检测, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 与转录组序列比对验证。

3'/5'RACE 以扩增出来的中间片段为参考, 设计 3'RACE 引物和 5'RACE 引物。以 RACE-Ready-cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为模板 0.5 μ l, dNTP 0.8 μ l, UPM 引物 2.5 μ l, 3'/5'RACE 引物 0.5 μ l, HiFi Buffer(10 \times)1 μ l, HiFi *Taq* 酶 0.1 μ l, 灭菌双蒸水 4.5 μ l。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 每循环降落 0.5 $^{\circ}$ C, 共 11 个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 24 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 根据胶回收试剂盒说明书对电泳的目的条带进行切胶回收。回收的 DNA 溶液与 pMD18-T 载体连接, 用热激法转入大肠杆菌感受态细胞, 用氨苄青霉素培养基筛选, 挑取阳性克隆单一菌落, 菌落 PCR 验证并测序。

将 3'/5'RACE 以及中间片段的测序结果利用 DNASTar 软件拼接, 获得脊尾白虾 *TCTP* cDNA 全长

并找到 ORF, 翻译为氨基酸序列, 将该序列与 NCBI 数据库中的同源序列进行比对验证。

1.3.2 脊尾白虾 *TCTP* 同源序列的多重比对和进化树分析 在 NCBI 数据库中查找不同物种 *TCTP* 的同源序列, 运用软件 ClustalX 2.0.11 和 DNAMAN 对不同动物 *TCTP* 的氨基酸序列进行多重比对分析。再根据比对信息, 利用 MEGA 5.0 软件的 Neighbor-joining 法构建系统进化树。

1.3.3 脊尾白虾 *TCTP* 蛋白的生物信息学分析 脊尾白虾 *TCTP* 蛋白理化性质分析, 用 ProtParam 软件预测脊尾白虾 *TCTP* 蛋白的氨基酸组成、等电点、分子量、分子式、脂溶指数和不稳定指数等; 通过 PredictProtein 软件从 PROSITE 数据库搜索模体, 预测该蛋白的潜在功能域等; 运用 NCBI 的 Conserved domain search 功能预测该蛋白的保守结构域。

1.3.4 脊尾白虾 *TCTP* 基因的 Real-time PCR 定量检测 根据栗治国等(2014)对卵巢发育的分期, 对健康脊尾白虾的肝胰腺和卵巢组织取样, 并进行荧光定量分析。参照脊尾白虾转录组, 通过在 NCBI 数据库比对, 找到自噬调控基因(*Beclin1*、*TCTP*、*Hif-1 α* 和 *Bcl-2*)的部分序列, 并利用 Primer 5.0 软件设计荧光定量引物(表 1)。以 18S 为内参, 按照荧光定量试剂盒的说明书加样, 使用 ABI 7500 Fast Real-time 仪器测定结果, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算脊尾白虾自噬调控基因在卵巢发育过程中的相对表达量, 用 SPSS17.0 软件进行显著性分析。

表 1 本研究所用引物序列
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'~3')	用途 Purpose
TCTP-F	TTCACCGACACCTACAAGCAT	中间片段的克隆 Cloning the internal fragments
TCTP-R	CAAGACACCAATAACGAAGGCTAA	
TCTP5-1	CCTGCTATCCAGAAACCT	5'和 3'末端的克隆 Cloning the 5' and the 3' end
TCTP3-1	TTCCGATGTTAATGGATGAC	
TCTP-realF	GCTTTGGCAGCAAGAAAGAC	荧光定量 PCR Real-time PCR
TCTP-realR	TTCGGCTAGAGGTTTCTGGA	
Beclin1-realF	AGCCTGAAGAACCAGCTGAA	荧光定量 PCR Real-time PCR
Beclin1-realR	GTTGTTGATCGTCCCGAAGT	
Alph-realF	AAGACCCCTCCTCCTTGT	荧光定量 PCR Real-time PCR
Alph-realR	ATTGGCAGGAGCATTGACTT	
Bcl2-realF	ATGTGGCCGGACTTATTGAC	荧光定量 PCR Real-time PCR
Bcl2-realR	TGATCTGCTTCTGGTGCTTG	
Actin-F	CCGAGACATCAAGGAGAAGC	荧光定量 PCR Real-time PCR
Actin-R	ATACCGCAAGATTCCATACCC	

2 结果与分析

2.1 脊尾白虾 *TCTP* 基因克隆及分析

本研究克隆得到脊尾白虾 *TCTP* 基因 cDNA 序列,命名为 *EcTCTP*,该基因全长为 732 bp (GenBank No. KY411921),包括 5'非编码区 76 bp、3'非编码区 149 bp 以及开放阅读框 507 bp,共编码 168 个氨基酸,理论等电点为 4.48,分子量约为 18.769 kDa (图 1)。具有 TCTP1 和 TCTP2 两个保守结构域。

```

1 CCTTCCCTGGTTCGCCCTCAGTCCGGAGAGCAAGAACCAATCTAGGCCAAATTTTTACCGT
61 CAATCATCCATCCATCATGAAGGTCTTCAAGGATCTTATCAGTGGTGATGAAATGTTTAC
1 M K V F K D L I S G D E M F T
121 CGACACCTACAAGCATGAGATTGTTGATGACGCTTTTTATATGGTGGTGGAAAGAACAC
16 D T Y K H E I V D D A F Y M V V G K N T
181 CACTGTAAGTGAAGGCGATATCCAGCTTGATGGTGCCAATCCTTCTGCGGAAGAAGCAGA
36 T V T E G D I Q L D G A N P S A E E A D
241 TGAAGGTACTGAAAGCAGCGCTGTATCCGGTATTGATGTCGTCTTGTATTATGCGCCTCCA
56 E G T E S S A V S G I D V V L F M R L Q
301 GGAAACTGGCTTTGGCAGCAAGAAAGACTACCTTACCTACATGAAGGAGTATATTAAGAG
76 E T G F G S K K D Y L T Y M K E Y I K S
361 TTTGAAGAGCAAGCTAGAGGGAACCCAGCAGCTGAAAAGCTTCCCTGCTATCCAGAAACC
96 L K S K L E G T P A A E K L P A I Q K P
421 TCTAGCCGAATTGCTTAAGAAGTTCAAGGACCTTCAATTCTTCCCGGTGAATCCATGAA
116 L A E L L K K F K D L Q F F T G E S M N
481 CCCTGATGGTATGTTGTAATTGGCGATTATAAGGAGGTTGATGGTGAAGAAAGACCAGT
136 P D G M V V I G D Y K E V D G E E R P V
541 ACTCTATTTCCCTCTGTTAGGTCTAGAAGAGGAAAAACTTTAGACAGCAATGTAACCTAA
156 L Y F P L L G L E E E K L *
601 GATCCAGTATCCAGTCATCCATTAACATCGGAACATCAATCTCATGTTGAATTAGCCTT
661 CGTTATTGGTGTCTTGTTTAATTTAATAAATTCCATCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
721 AAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 脊尾白虾 *TCTP* 基因序列和氨基酸序列

Fig.1 The full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *EcTCTP*

ATG 为起始密码子, TAG 为终止密码子, 下划线为蛋白激酶 C 磷酸化位点, 椭圆为酪氨酸激酶 II 磷酸化位点
ATG is the start codon, TAG is the stop codon, protein kinase C phosphorylation sites is underlined,
casein kinase II phosphorylation sites is indicated by ellipse

构建进化树如图 3, 哺乳动物聚为一支, 甲壳动物聚为一支; 甲壳动物中脊尾白虾与同为抱卵亚目的中华绒螯蟹进化关系最近, 置信度为 82; 产卵亚目的中国明对虾、印度明对虾、凡纳滨对虾和日本对虾聚为一支。

2.3 自噬调控基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的表达

2.3.1 *TCTP* 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的表达

TCTP 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的组织表达见图 4。如图 4 所示, 肝胰腺中的 *TCTP* 基因在卵巢发育增殖期表达量最高并显著高于其他时期 ($P < 0.05$), 然后持续下降, 在产后恢复期达到最低值。

2.2 *EcTCTP* 同源氨基酸序列多重比对和生物进化树分析

不同物种 *TCTP* 氨基酸序列进行多重比对结果见图 2。从图 2 可以看出, 不同物种 *TCTP* 既有高保守序列也有一定的差异序列。脊尾白虾 *TCTP* 与中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 序列一致性最高, 各种属之间的 *TCTP* 序列保守性较好, 但不同种属(如甲壳动物和哺乳动物)之间却有明显差异, 比如: 甲壳动物 *TCTP* 不含半胱氨酸残基(Cys)。

卵巢中 *TCTP* 基因在增殖期表达量最低, 在小生长期表达量达到最高值并显著高于成熟期和产后恢复期 ($P < 0.05$), 从小生长期到产后恢复期表达量持续下降。肝胰腺中 *TCTP* 的表达总量是卵巢中 *TCTP* 表达总量的 60 倍左右。

2.3.2 *Hif-1a* 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的表达

Hif-1a 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的组织表达见图 5。如图 5 所示, 肝胰腺中的 *Hif-1a* 在卵巢发育增殖期和小生长期表达量最高, 且无显著性差异, 在大生长期急剧下降到最低值并极显著低于前 2 期 ($P < 0.01$), 大生长期与成熟期无显著差异, 但显著低于产后恢复期 ($P < 0.05$)。卵巢中的 *Hif-1a* 基因在卵巢发育的增殖期表达量最低, 显著低于小生长期 ($P < 0.05$),

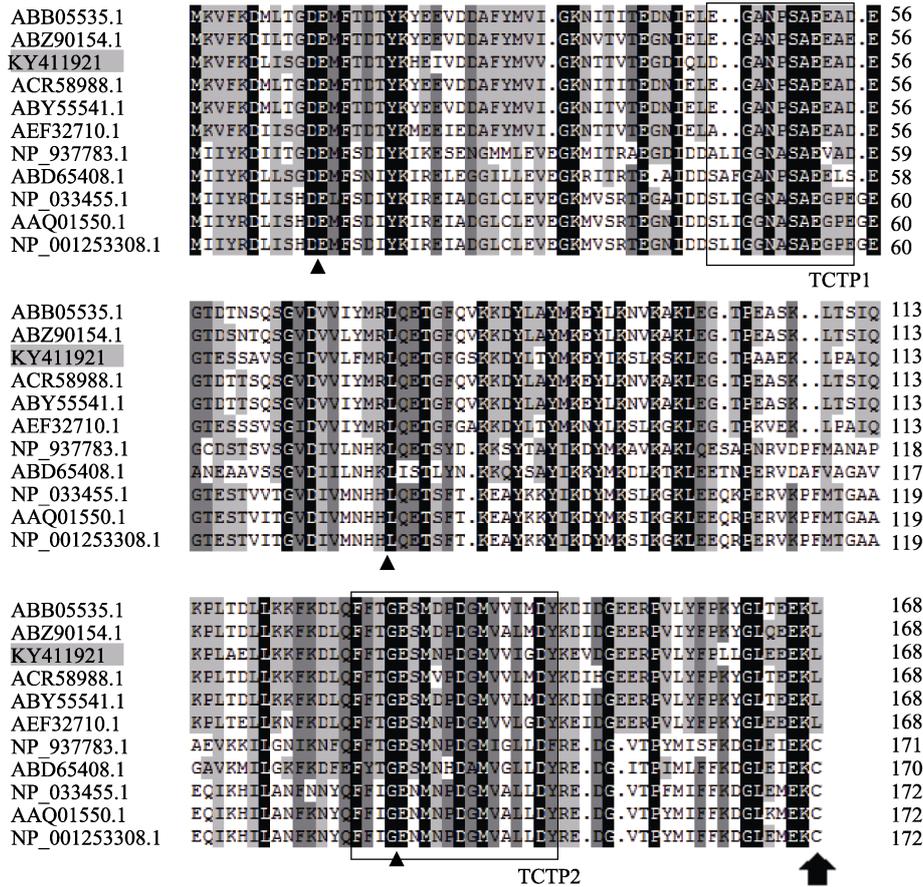


图 2 脊尾白虾 TCTP 与其他物种 TCTP 氨基酸序列多重比对
Fig.2 Multiple alignment of TCTP amino acids of *E. carinicauda* and other animals

ABB05535.1: 中国明对虾 *Fenneropenaeus chinensis*; ABZ90154.1: 日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus*; KY411921: 脊尾白虾 *Exopalaemon carinicauda*; ACR58988.1: 印度明对虾 *Fenneropenaeus indicus*; ABY55541.1: 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*; AEF32710.1: 中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis*; NP_937783.1: 斑马鱼 *Danio rerio*; ABD65408.1: 大菱鲆 *Scophthalmus maximus*; NP_033455.1: 小家鼠 *Mus musculus*; AAQ01550.1: 智人 *Homo sapiens*; NP_001253308.1: 猕猴 *Macaca mulatta*; ▲: GTPase 结合槽 GTPase binding groove; □: TCTP1 和 TCTP2 功能域 TCTP1 and TCTP2 functional domain; ↑: 甲壳动物 C 末端的亮氨酸(Leu)和其他物种 C 末端的半胱氨酸(Cys) Leucine at the end of C in crustacean and Cysteine at the end of C in other animals

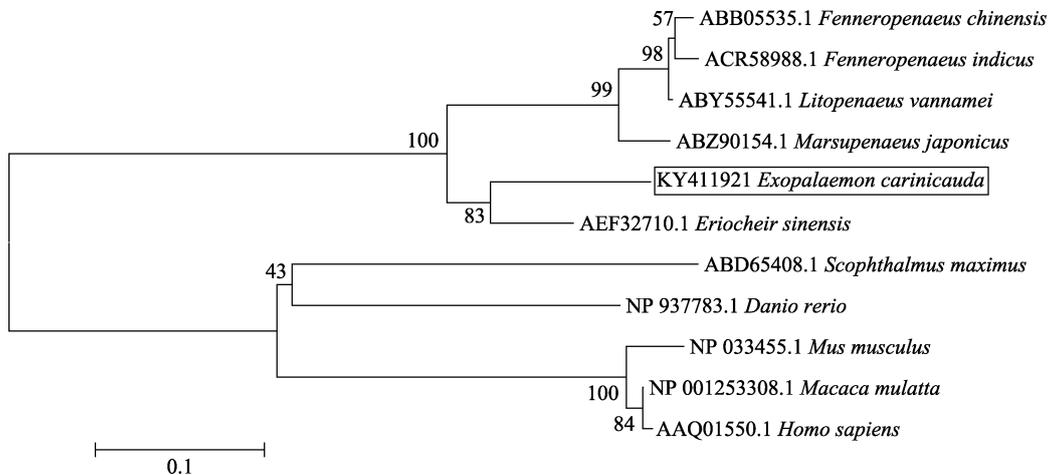


图 3 不同物种 TCTP 氨基酸序列进化树
Fig.3 Phylogenetic tree analysis of TCTP amino acid sequences

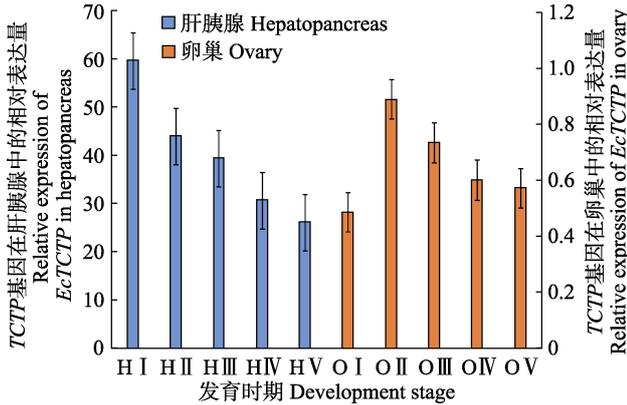


图 4 *EcTCTP* 在脊尾白虾卵巢各发育期的相对表达
Fig.4 Relative expression of *EcTCTP* in different development stages of ovary in *E. carinicauda*

H: 肝胰腺; O: 卵巢; I: 增殖期; II: 小生长期; III: 大生长期; IV: 成熟期; V: 产后恢复期。下同
H: Hepatopancreas; O: Ovary; I: Proliferative phase; II: Niche long term; III: Long term; IV: Maturity; V: Postpartum recovery period. The same as below

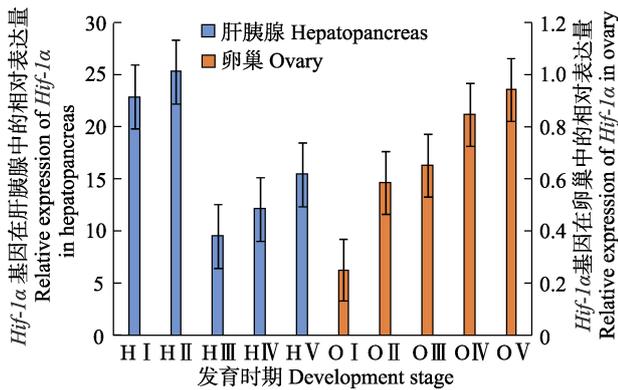


图 5 *Hif-1a* 基因在脊尾白虾卵巢各发育期的相对表达
Fig.5 Relative expression of *Hif-1a* in different development stages of ovary in *E. carinicauda*

从小生长期到产后恢复期持续升高,并在产后恢复期表达量达到最高,其中,小生长期和大生长期表达量无显著性差异。肝胰腺中 *Hif-1a* 的整体表达量约为卵巢中表达量的 26 倍。

2.3.3 *Ec-Beclin1* 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的表达 脊尾白虾 *Beclin1* 基因(*Ec-Beclin1*) 在卵巢发育过程中的组织表达如图 6 所示,肝胰腺中的 *Ec-Beclin1* 从增殖期到小生长期表达量上升,大生长期表达量极显著下降($P<0.01$)并达到最低,从大生长期到产后恢复期表达量回升($P<0.05$)。卵巢中的 *Ec-Beclin1* 从增殖期到小生长期表达量上升,大生长期表达量极显著上升并达到最高($P<0.01$),成熟期和产后恢复期的表达量极显著下降($P<0.01$)。

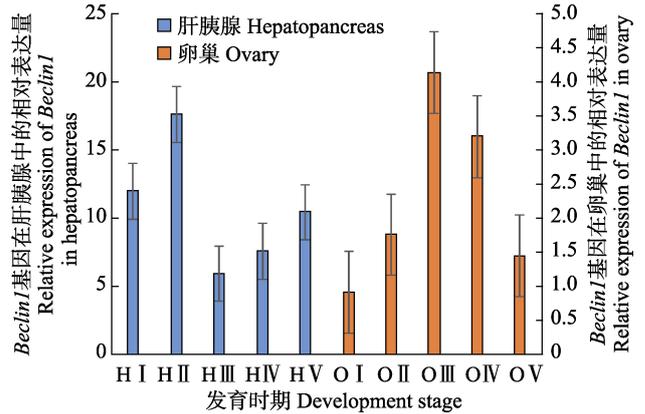


图 6 *Ec-Beclin1* 在脊尾白虾卵巢各发育期的相对表达
Fig.6 Relative expression of *Ec-Beclin1* in different development stages of ovary in *E. carinicauda*

2.3.4 *Bcl-2* 基因在脊尾白虾卵巢发育过程中的表达 *Bcl-2* 基因在脊尾白虾卵巢发育发育过程中的表达量如图 7 所示:肝胰腺中 *Bcl-2* 基因从增殖期到小生长期表达极显著上调($P<0.01$),大生长期极显著下降并达到最低值($P<0.01$),成熟期和产后恢复期表达量逐渐升高但差异不显著。卵巢中 *Bcl-2* 基因从增殖期到小生长期表达量上升,但差异不显著,大生长期表达极显著下降($P<0.01$)并达到最低,成熟期和产后恢复期表达量均发生极显著上升($P<0.01$),在大生长期表达量最低,产后恢复期表达量最高。

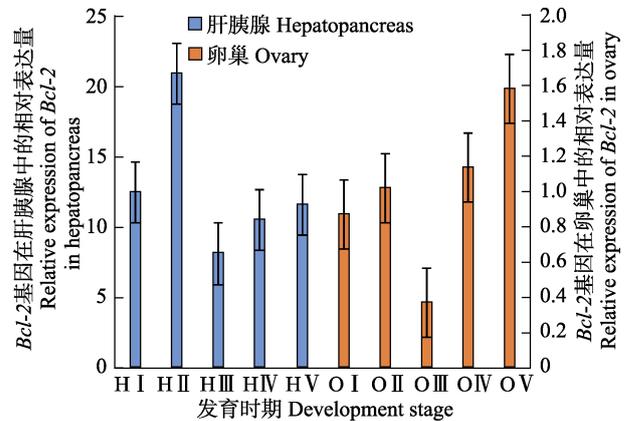


图 7 *Bcl-2* 基因在脊尾白虾卵巢各发育期的相对表达
Fig.7 Relative expression of *Bcl-2* in different development stages of ovary in *E. carinicauda*

3 讨论

通过序列多重比对发现,不同物种 TCTP 都具有保守功能域 TCTP1 和 TCTP2,而且发现 Glu12、Leu74、Glu132 等位点的保守性极高。Dong 等(2009)研究表明, Glu12 等构成了人类 TCTP 的 GTPase 结

合槽, 可通过与 Rheb 的 Lys45 形成盐桥, 交换鸟嘌呤激活 Rheb 的 GTPase 活性, 从而调控 mTOR 信号通路。功能域预测发现, 脊尾白虾 *TCTP* 蛋白含有蛋白激酶 C(PKC)磷酸化位点和酪氨酸激酶 II(KT II)磷酸化位点等, 而 PKC 和 KT II 都是 mTOR 信号通路成员, 可以通过该通路调节细胞的生长增殖和存活(Guertin *et al*, 2006)。所以, 脊尾白虾 *TCTP* 可能通过与免疫生长相关的 mTOR 信号通路参与生命活动的调节。

在卵巢各发育时期, 自噬相关基因在脊尾白虾卵黄蛋白原合成器官中发挥着不同的调控作用。卵巢发育期, 脊尾白虾肝胰腺 *TCTP* 基因在增殖期表达量最高, 之后表达量持续下降, 这与脊尾白虾肝胰腺甲基法尼脂转移酶的表达趋势具有相似性(李志敏等, 2016), 且与墨吉对虾 *TCTP* 基因在卵巢中的表达趋势具有一致性(Loongyai *et al*, 2007)。脊尾白虾 *TCTP* 在卵巢发育的小生长期表达量最高, 这与栗治国等(2014)发现的脊尾白虾卵巢小生长期开始出现内源性卵黄合成期卵母细胞相符。Makkapan 等(2011)用 5-羟色胺(5-HT)处理刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)卵巢, 发现 5-HT 可促进甲基法尼脂(MF)释放入血淋巴, 并促进卵巢发育至卵黄成熟期, 还可使卵巢外植体中的 *TCTP* 基因表达上调。

脊尾白虾 *Hif-1a* 基因在肝胰腺中的表达量远高于卵巢, 肝胰腺 *Hif-1a* 的表达趋势与外源性卵黄蛋白原的表达趋势大致相反, 即在外源性卵黄蛋白原表达量低的时期(增殖期和小生长期), 肝胰腺 *Hif-1a* 表达量高, 在外源性卵黄蛋白原表达量高的时期(大生长期和成熟期), 肝胰腺 *Hif-1a* 表达量低; 卵巢 *Hif-1a* 的表达趋势与内源性卵黄蛋白原的表达趋势基本一致, 均是从增殖期到产后恢复期持续增高(梁俊平等, 2015)。这说明, 适当的缺氧微环境可能是脊尾白虾卵巢发育所必需的。栗治国等(2014)发现, 脊尾白虾卵巢无隔室, 无血管和血窦, 并猜测这与脊尾白虾卵巢体积小、氧气便于运输相关, 本研究从一定程度上验证了该猜测。

脊尾白虾肝胰腺中的 *Beclin1* 基因与 *Hif-1a* 基因的表达趋势相一致。唐中园等(2015)研究上皮性卵巢癌时发现, 低氧下敲除 *Hif-1a* 后, *Beclin1* 表达下降, 并认为低氧可诱导 *Hif-1a* 表达, 促进卵巢自噬的发生。*Beclin1* 基因可介导其他自噬蛋白定位于前自噬小体, 是自噬发生的关键靶点(段振玲等, 2007)。因此, 脊尾白虾肝胰腺 *Beclin1* 基因可能在 *Hif-1a* 的调节下参与自噬的发生, 并与外源性卵黄蛋白原合成相关。卵

巢中 *Beclin1* 基因的表达从增殖期到大生长期表达量不断升高, 并在大生长期达到最高, 在成熟期和产后恢复期 *Beclin1* 基因的表达量又下降, 这与脊尾白虾蜕皮激素受体(*EcR*)在卵巢中的表达趋势相似(梁俊平等, 2015), 可能与蜕皮激素受体的表达具有相关性。梁俊平等(2015)认为, 脊尾白虾卵巢和肝胰腺中 *EcR* 均参与了卵黄蛋白原合成, 且可能对卵巢的多次成熟具有调节作用。因此, 脊尾白虾自噬相关基因 *Beclin1* 可能在肝胰腺和卵巢合成卵黄蛋白原的过程中发挥调节作用。

脊尾白虾肝胰腺 *Bcl-2* 基因小生长期表达量最高, 整个表达趋势与 *Beclin1* 基因一致。研究表明, 凋亡蛋白 *Bcl-2* 可通过 BH3 结构域与 *Beclin1* 蛋白相结合, 从而抑制细胞自噬作用, 可能对细胞最终走向自噬凋亡起着关键作用(Pattingre *et al*, 2005; He *et al*, 2010; 叶挺等, 2013)。这说明脊尾白虾肝胰腺 *Bcl-2* 可能通过与 *Beclin1* 结合抑制发育早期自噬的发生并促进大生长期和成熟期发生自噬。研究表明, 大生长期和成熟期是肝胰腺外源性卵黄蛋白原合成旺盛期(梁俊平等, 2015), 这说明肝胰腺 *Bcl-2* 可能通过对自噬的调节促进外源性卵黄蛋白原的合成。脊尾白虾卵巢 *Bcl-2* 基因在卵巢发育大生长期表达量最低, 整体表达趋势与脊尾白虾卵巢 *Beclin1* 基因的表达趋势相反。*Bcl-2* 蛋白可以通过抑制 *Beclin1* 与 VPS34 共结合发挥抑制自噬的作用, 说明脊尾白虾卵巢 *Bcl-2* 基因与 *Beclin1* 基因协同作用, 共同促进大生长期发生自噬, 而抑制其他时期的自噬。又由于小生长期和大生长期是内源性卵黄蛋白合成期卵母细胞主要存在的时期(栗治国等, 2014), 因此, *Bcl-2* 和 *Beclin1* 基因在卵巢中的表达共同促进自噬的发生可能与参与内源性卵黄蛋白原的合成相关。

综上所述, 卵巢发育时期脊尾白虾自噬调控基因 *TCTP*、*Hif-1a*、*Beclin1* 和 *Bcl-2* 相互协调, 可能通过自噬作用参与脊尾白虾卵黄蛋白原的调节促进卵巢发育。

4 小结

本研究克隆得到了脊尾白虾 *TCTP* 基因全长并对该蛋白的结构和功能进行了预测。另外, 通过研究卵巢发育期自噬相关基因在脊尾白虾肝胰腺和卵巢中的表达, 阐述了卵黄蛋白原合成过程中 4 种自噬相关基因的调控趋势。为阐明脊尾白虾卵黄蛋白原合成的分子调控过程、提高脊尾白虾繁殖力提供了理论基础, 也为环境测评和毒理学研究提供了基础数据。

参 考 文 献

- Bangrak P, Graidist P, Chotigeat W, *et al.* Molecular cloning and expression of a mammalian homologue of a translationally controlled tumor protein (TCTP) gene from *Penaeus monodon* shrimp. *Journal of Biotechnology*, 2004, 108(3): 219–226
- Batisti C, Ambrosio MR, Rocca BJ, *et al.* Translationally controlled tumour protein (TCTP) is present in human cornea and increases in herpetic keratitis. *Diagnostic Pathology*, 2012(7): 90
- Bommer UA, Iadevaia V, Chen JZ, *et al.* Growth-factor dependent expression of the translationally controlled tumour protein TCTP is regulated through the PI3-K/AKT/mTORC1 signalling pathway. *Cellular Signalling*, 2015, 27(8): 1557–1568
- Chen K, Chen SL, Huang CH, *et al.* TCTP increases stability of hypoxia-inducible factor 1 α by interaction with and degradation of the tumour suppressor VHL. *Biology of the Cell*, 2013, 105(5): 208–218
- Chen K, Huang CH, Yuan J, *et al.* Long-term artificial selection reveals a role of TCTP in autophagy in mammalian cells. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31(8): 2194–2211
- Cheng X, Li JH, Deng J, *et al.* Translationally controlled tumor protein (TCTP) downregulates Oct4 expression in mouse pluripotent cells. *BMB Reports*, 2012, 45(1): 20–25
- Chuang WL, Lin PY, Lin HC, *et al.* The apoptotic effect of ursolic acid on SK-Hep-1 cells is regulated by the PI3K/Akt, p38 and JNK MAPK signaling pathways. *Molecules*, 2016, 21(4): 460
- Dong XC, Yang B, Li YJ, *et al.* Molecular basis of the acceleration of the GDP-GTP exchange of human Ras homolog enriched in brain by human translationally controlled tumor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(35): 23754–23764
- Duan ZL, Peng ZL, Wang ZH. Expression and involved signal transduction pathway of autophagy gene beclin 1 in epithelial ovarian cancer. *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*, 2007, 38(2): 239–242 [段振玲, 彭芝兰, 王赞宏. 上皮性卵巢癌中自噬基因 Beclin 1 的表达及其调控相关信号传导途径的研究. *四川大学学报(医学版)*, 2007, 38(2): 239–242]
- Fainzilber M, Tom M, Shafir S, *et al.* Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in penaeid shrimp? *Biological Bulletin*, 1992, 183(2): 233–241
- Funderburk SF, Wang QJ, Yue ZY, *et al.* The beclin 1-VPS34 complex-at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in Cell Biology*, 2010, 20(6): 355–362
- Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, *et al.* Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC alpha but not S6K1. *Developmental Cell*, 2006, 11(6): 859–871
- He C, Levine B. The beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010, 22(2): 140–149
- Leu JH, Lin SJ, Huang JY, *et al.* A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(4): 1011–1017
- Li ZG, Zhang CS, Li FH, *et al.* Histological study on the gonadal development of *Exopalaemon carinicaudal* (Holthuis, 1950). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(3): 362–370 [栗治国, 张成松, 李富花, 等. 脊尾白虾的性腺发育及组织结构观察. *水产学报*, 2014, 38(3): 362–370]
- Li ZM, Li J, Li JT, *et al.* The expression analysis of farnesoic acid O-methyl transferase (*FAMEt*) gene during the ovarian development cycles of *Exopalaemon carinicaudal*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 46–51 [李志敏, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicaudal*) *FAMEt* 基因在卵巢发育周期中的表达分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 46–51]
- Liang JP, Wang Y, Duan YF, *et al.* Molecular cloning of ecdysteroid receptor and its expression during the ovarian development and embryogenesis of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(7): 942–952 [梁俊平, 王芸, 段亚飞, 等. 脊尾白虾 *EcR* 基因的克隆及其在卵巢和胚胎发育过程中的表达分析. *水产学报*, 2015, 39(7): 942–952]
- Loongyai W, Phongdara A, Chotigeat W, *et al.* Cloning and expression of a TCTP homolog from the ovaries of banana prawn. *Marine Biology*, 2007, 150(3): 455–462
- Makkapan W, Maikaeo L, Miyazaki T, *et al.* Molecular mechanism of serotonin via methyl farnesoate in ovarian development of white shrimp: *Fenneropenaeus merguensis* de Man. *Aquaculture*, 2011, 321(1–2): 101–107
- Pattingre S, Tassa A, Qu XP, *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005, 122(6): 927–939
- Suwansa-ard S, Kankuan W, Thongbuakaew T, *et al.* Transcriptomic analysis of the autophagy machinery in crustaceans. *BMC Genomics*, 2016, 17: 587
- Tang ZY, Zhang N, Di W, *et al.* Regulation of hypoxia-induced autophagy by hypoxia-inducible factor-1 α . *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, 2015, 35(12): 1804–1808 [唐中园, 张宁, 狄文, 等. 缺氧诱导因子-1 α 对低氧诱导自噬的调控作用. *上海交通大学学报(医学版)*, 2015, 35(12): 1804–1808]
- Wang YF, Du NS, Lai W. Studies on the relationship of organelles in oocyte with vitellogenesis of *Macrobrachium rosenbergii*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(1): 24–28 [王玉凤, 堵南山, 赖伟. 罗氏沼虾卵母细胞细胞器与卵黄发生的关系. *水生生物学报*, 1999, 23(1): 24–28]
- Yano I, Chinzei Y. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1987, 86(2): 213–218
- Yarm FR. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(17): 6209–6221
- Ye T, Shao ZW. The function of Bcl-2/Beclin-1 complex in autophagy regulation. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 29(6): 513–519 [叶挺, 邵增务. Bcl-2/Beclin-1 复合体在自噬中的调节作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29(6): 513–519]
- Zhang M. Cloning and expression analysis of hyperglycemic

hormone family gene from *Exopalaemon carinicauda* after function research. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2015 [张美. 脊尾白虾高血糖激素家族基因的克隆、表达及功能研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]

Zhao MR, Kang XJ, Mu SM, *et al.* Ultrastructure of the

vitellogenesis in the oocytes of *Neocaridina denticulata sinensis*. Journal of Hebei University(Natural Science Edition), 2009, 29(3): 318–323, 328 [赵梦然, 康现江, 穆淑梅, 等. 中华锯齿米虾卵母细胞卵黄发生的超微结构. 河北大学学报(自然科学版), 2009, 29(3): 318–323, 328]

(编辑 马瑾艳)

Cloning of the Translationally Controlled Tumor Protein Gene (*TCTP*) and Expression Analysis of Autophagy Regulatory Related Genes During the Development of Ovary in *Exopalaemon carinicauda*

MA Li^{1,2}, GE Qianqian², XU Yang^{1,2}, PENG Suxiao^{1,2}, LI Jian^{2,3}①

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

Abstract In order to understand the regulatory mechanism of ovarian development in *Exopalaemon carinicauda*, we used RACE (Rapid amplification of cDNA ends) technology to clone the translationally controlled tumor protein (*TCTP*) gene. The full-length cDNA of *TCTP* gene in *E. carinicauda* (*EcTCTP*) is 732 bp long with an intact open reading frame of 507 bp encoding a polypeptide of 168 amino acids. Six kinds of functional sites were identified in *EcTCTP*, including one N-glycosylation site, three protein kinase C phosphorylation sites, six casein kinase II phosphorylation sites, three N-myristoylation sites, *TCTP* domain signature 1, and *TCTP* domain signature 2. Multiple alignment analysis and phylogenetic tree revealed that *EcTCTP* has the highest similarity to *TCTP* from *Eriocheir sinensis*. The results demonstrated that the cysteine (Cys) residue at the C terminal is highly conserved in all the animals, except the crustaceans. The lack of Cys residue might affect the oxidation resistance and the formation of *TCTP* dimers in crustaceans. The expression profile of 4 kinds of autophagy-related genes during the ovarian development period showed that: (1) *EcTCTP* gene in the hepatopancreas from proliferative stage to postpartum recovery period decreased. (2) Expression of *EcTCTP* gene in the ovary was the highest during the minor growth phase. Furthermore, the expression profile of *Hif-1a*, *Beclin1*, and *Bcl-2* in hepatopancreas showed a similar trend, that is, high expression from proliferative period to minor growth phase, the lowest expression during the major growth phase with an increase during the mature period. The expression level of the gene *Hif-1* in the ovary was similar to that of the gene vitellogenin in the ovary, which increased from the proliferative phase to the postpartum recovery period. The expression level of the gene *Beclin1* in the ovarian cells increased from the proliferative stage to the major growth phase, and reached the highest level during the major growth phase, which was consistent with the synthesis of endogenous vitellogenin during the late development stage in prawn. The expression of the gene *Bcl-2* in the ovary was the lowest during the major growth phase. The results illustrated that the autophagy-related genes might function together in the ovarian development of *E. carinicauda* by regulating autophagy during the synthesis of vitellogenin.

Key words *Exopalaemon carinicauda*; *TCTP*; Autophagy; Vitellogenin; Expression analysis

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn