

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.16043

## 栉江珧 *wnt4* 基因 cDNA 的克隆表达及调控

王昌勃, 李琪, 于瑞海, 孔令锋, 于红

中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

**摘要:** 本研究运用同源克隆技术和 RACE 技术克隆了栉江珧(*Atrina pectinata*) *wnt4* 基因 cDNA 全长序列。该基因序列全长为 1493 bp, 其中开放阅读框 1074 bp, 编码由 357 个氨基酸组成的蛋白。氨基酸序列分析表明, 栉江珧 *wnt4* 基因具有 *wnt* 家族保守结构域, 与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、海胆(*Paracentrotus lividus*)等物种具有高度的同源性。荧光定量 PCR 分析表明, *wnt4* 基因表达具有广泛性和组织差异性, 且与性别和性腺繁殖周期相关。*wnt4* 基因表达量与性腺成熟度相关, 并且整个繁殖周期卵巢表达量均显著高于精巢, 说明 *wnt4* 基因参与了栉江珧两性性腺的发育, 并在卵巢中发挥更重要的作用。不同发育阶段胚胎荧光定量分析表明, *wnt4* 基因主要参与了栉江珧的早期胚胎发育。在胚胎发育早期(囊胚期和原肠期)*wnt4* 基因的表达水平最高, 是成体表达量的 500 倍; 在担轮幼虫和 D 形幼虫期迅速下降, 暗示 *wnt4* 基因可能在栉江珧早期发育阶段参与了某些器官的形成。17 $\beta$ -雌二醇诱导实验显示, 17 $\beta$ -雌二醇可能通过反馈调节抑制卵巢 *wnt4* 基因表达( $P < 0.05$ ); 短时间处理, 17 $\beta$ -雌二醇能诱导精巢 *wnt4* 基因显著表达( $P < 0.05$ )。

**关键词:** 栉江珧; *wnt4*; 基因克隆; qRT-PCR; 个体发育; 繁殖周期; 17 $\beta$ -雌二醇

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)05-1041-11

性腺发育是动物进行有性繁殖、遗传物质传递和种群延续的基础, 目前有关性腺发育的研究在脊椎动物中已有了较深入的阐述, 许多性腺发育相关的基因及作用得到广泛报道。*wnt* (wingless-type MMTV integration site family) 家族是一种分泌型糖蛋白, 在动物原肠胚的形成、体轴的形成、细胞极性形成、干细胞分化、器官发育等多种生命过程中发挥作用<sup>[1-6]</sup>。*wnt* 基因首先发现于小鼠(*Mus musculus*)<sup>[7-8]</sup>和果蝇(*Drosophila melanogaster*)<sup>[9]</sup>中, 是一类高度保守的信号分子家族<sup>[10]</sup>。*wnt* 基因比较保守, 从线虫到哺乳动物都发现该基因家族的存在<sup>[11]</sup>。

*wnt4* 是 *wnt* 家族重要成员之一, 在卵巢的分化和雌性特征的维持方面有十分重要的作用<sup>[12]</sup>。据报道, 该基因通过调节下游基因(*fst*)表达, 参

与小鼠卵巢发育调控<sup>[13]</sup>, 该基因的表达与黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)卵巢组织的分化具有相关性<sup>[14]</sup>; 其与日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)性别表型密切相关, 并在雌虫产卵过程中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。*wnt4* 基因也与精巢发育有关, 如其发生基因重复, 会导致人(*Homo sapiens*)雄性睾丸发育异常<sup>[16]</sup>; *wnt4* 基因缺失的雌性小鼠, 表现为缪勒氏小体缺失和雄性化<sup>[17-18]</sup>。除参与性别决定和性腺发育, *wnt4* 基因还具有其他生物功能。在果蝇和非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的视觉系统中, *wnt4* 蛋白是视网膜成像和眼睛发育所必需的<sup>[19-20]</sup>; *wnt4* 可能是生肌细胞转移和分化的刺激因子<sup>[21]</sup>。*wnt4* 基因表达特点和生理功能在多种生物中得到研究, 而关于 *wnt4* 上游调节因子的研究较少, 有关调控机制存在争议。雌激素能够通过雌激素受

收稿日期: 2016-01-30; 修订日期: 2016-03-25.

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201305005); 国家科技支撑计划项目(2011BAD13B01); 教育部博士点基金(20130132110009).

作者简介: 王昌勃(1988-), 男, 博士. E-mail: c-b-wang@163.com

通信作者: 李琪, 教授. E-mail: qili66@ouc.edu.cn

体介导的信号通路调节小鼠 *wnt4* 基因的表达<sup>[22-23]</sup>；在雌激素受体缺失的小鼠中，雌激素也可以快速上调 *wnt4* 基因的表达<sup>[24]</sup>。

然而，在无脊椎动物特别是海洋贝类中，有关性腺发育及调控机制的研究还非常有限。*wnt4* 作为一种重要的信号分子，在软体动物中的表达特点和功能机制至今还没有被揭示<sup>[25]</sup>。栉江珧 (*Atrina pectinata*) 是一种经济价值较高的海产贝类，随着栖息环境的破坏和野生资源的过度捕捞，人工育苗技术越来越受到人们的关注，但是多年未取得突破。对其性腺发育的研究，有助于人们了解栉江珧的繁殖特性，为其人工育苗提供基础生物学信息。本研究采用同源克隆和 RACE 技术获得了栉江珧 *wnt4* 基因全长的 cDNA 序列，并结合荧光定量 PCR 技术分析了该基因在不同组织、性腺不同发育时期和幼体发育不同时期的表达特点。通过体内注射技术，研究了 17 $\beta$ -雌二醇对生长期栉江珧 *wnt4* 基因的表达调控作用，旨在阐明 *wnt4* 基因在栉江珧发育过程中的作用，为进一步开展软体动物 *wnt* 家族研究和栉江珧繁殖生理学研究提供参考资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

栉江珧采自山东蓬莱海区(38°21'~38°33'N; 120°64'~120°71'E)。2013年5月至2014年4月，每月潜水采捕25个成体栉江珧，壳高(25±5) cm。解剖获取包括外套膜、闭壳肌、鳃、足、肝胰腺、神经节和性腺的各个组织，液氮中速冻后转移到-80℃冰箱中保存，用于总 RNA 提取。同时取部分性腺组织于波恩氏液中固定 24 h 后，存储于 70%乙醇中，用于组织切片观察，以确定性腺发育时期。

### 1.2 总 RNA 提取和第一链获得

采用 Trizol 法提取栉江珧成熟期卵巢的总 RNA，用 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)检测提取的 RNA 浓度，1.2%琼脂糖凝胶检测 RNA 完整性。按照 M-MLV 和 SMART<sup>TM</sup> Race cDNA 试剂盒(Clontech)说明书，分别反转录合成 cDNA 和 Race cDNA 第一链，于-20℃中保存。

### 1.3 全长 cDNA 获得

从 NCBI 数据库获得栉孔扇贝(*Chlamys farreri*, AFU35435.1)、海胆(*Paracentrotus lividus*, AHY22359.1)、青鳞(*Oryzias latipes*, ACM50932.1)和人(*H. sapiens*, BAC23080.1)等物种的 *wnt4* 基因的 cDNA 序列及氨基酸序列，在保守区域内设计简并引物 Wnt4-P1 和引物 Wnt4-P2(表 1)，以栉江珧成熟期性腺 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L，PCR 反应程序为：94℃预变性 3 min；94℃ 30 s，53℃ 30 s，72℃ 1 min，40 个循环；72℃再延伸 10 min。1.5%的琼脂糖电泳检测 PCR 扩增产物，利用 DNA 凝胶纯化试剂盒回收目的片段产物。回收产物连接到 pEASY-T1 载体上并转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中，涂板，37℃培养过夜，挑取抗氨苄青霉素的阳性克隆，经菌液 PCR 检测后测序。所得到的 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库中的序列进行 Blast 同源性分析。

根据得到的栉江珧 *wnt4* cDNA 的序列设计 3'RACE 外侧引物 Wnt4-3'Race-out 和内侧引物 Wnt4-3'Race-in，5'RACE 外侧引物 Wnt4-5'Race-out 和内侧引物 Wnt4-5'Race-in(表 1)。以 RACE cDNA 第一链为模板，用 *wnt4* 外侧引物和 UPM 引物进行第一轮 PCR。然后，以第一轮 PCR 产物稀释液为模板，用 *wnt4* 内侧引物和 NUP 进行第二轮 PCR。2 次 PCR 反应程序为：94℃预变性 3 min；94℃ 30 s，68℃ 30 s，72℃ 3 min，35 个循环；72℃再延伸 10 min。产物检测、胶回收、克隆和测序如上所述。

### 1.4 目的基因核酸序列分析和氨基酸同源性分析

用 Lasergene 软件包对得到的 3'和 5'cDNA 末端及中间序列进行全长拼接；理论分子量和等电点采用 ExPASycompute pI/Mw ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))进行预测。氨基酸的多重比对采用 Clustal X 和 DNAMAN 完成。信号肽区域采用 SignalP 4.1 软件预测。糖基化位点采用在线软件 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测；系统发生树由 Mega5.0 程序中的临近法(neighbor joining, NJ)进行构建。

### 1.5 荧光定量 PCR

根据前期组织切片观察, 使用 1.2 中的方法分别获取栉江珧增殖期(2014 年 4 月)不同组织和不同发育时期(发生期、增殖期、成熟期、排放期和休止期)性腺的 cDNA 模板, 每组实验提取雌雄各 3 个个体。根据已获得的 cDNA 全长序列设计荧光定量 PCR 特异性引物 Wnt4-RT-F 和 Wnt4-RT-R, 同时根据栉江珧  $\beta$ -actin 基因设计内参引物  $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R(表 1)。使用 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪进行 *wnt4* 基因在栉江珧成体不同组织和不同发育时期性腺组织中的定量表达分析, 每个样本做 3 个平行。荧光定量 PCR 反应条件: 98°C 5 s, 60°C 30 s, 45 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对基因的相对表达量进行分析。所得数据以 3 样本平均值 $\pm$ 标准误( $\bar{x}\pm SE$ )来表示, 使用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 使用 Turkey B 检验法对其进行两两差异比较, 以 0.05 作为显著性差异水平。

### 1.6 胚胎和幼体不同发育时期 *wnt4* 基因表达

解剖采集成熟期栉江珧精、卵混合授精, 将受精卵放置于水温 26°C 的 25 m<sup>3</sup> 水体中孵化、培

养。分别收集 10<sup>4</sup> 个左右的受精卵、多细胞期、桑椹期、囊胚期、原肠期、担轮幼虫、D 形幼虫和稚贝等不同发育时期样品, 置于液氮中速冻, 然后转移到-80°C 冰箱中保存, 用于总 RNA 提取。RNA 的提取、cDNA 第一链合成、荧光定量 PCR 和数据分析如 1.2 和 1.5 所述, 取不同时期胚胎和幼体, 混样法提取总 RNA, 每个样本做 3 个平行。

### 1.7 17 $\beta$ -雌二醇对 *wnt4* 基因表达的影响

2015 年 4 月, 在蓬莱海区采捕性腺生长期栉江珧成贝 50 个, 并随机分为实验组和对照组, 室内暂养 3 d。由于鲜有关于栉江珧体内注射 17  $\beta$ -雌二醇诱导的研究, 因此本研究根据 Qin 等<sup>[26]</sup>诱导栉孔扇贝的实验方法, 向实验组栉江珧性腺注射 100  $\mu$ L 3.0 nmol/L 的 17  $\beta$ -雌二醇溶液, 对照组注射 100  $\mu$ L 过滤海水。注射 48 h 后, 每组分别选取 4 个雌性和 4 个雄性个体, 解剖获取性腺组织, 液氮保存。其余个体继续培养, 13 d 后进行第二次注射, 再经 15 d 培养后进行第二次取样, 注射和取样方法同上。实验期间, 实验组和对照组在相同条件下培养。样品保存、总 RNA 提取、cDNA 第一链合成、荧光定量 PCR 和数据分析如 1.1、1.2 和 1.5 所述。

表 1 栉江珧 *wnt4* 基因序列扩增引物信息

Tab. 1 The information of the primers for *wnt4* amplification in *Atrina pectinata*

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	功能 application
Wnt4-P1	AGTGTCAAGTACCAGTTCAGAAACAGTG AMGNTGGAAY	简并引物 degenerate primers
Wnt4-P2	GGATCCGGAGACTCCGTGRCAYTTTRCA	
Wnt4-3'Race-out	GCAGCACAGTCAATCCTAAATCA	3'区克隆 3'region clone
Wnt4-3'Race-in	AAGAATACGGGCAAAAATACAGG	
Wnt4-5'Race-out	CTGGGTCCCCTTACAGTTTCG	5'区克隆 5'region clone
Wnt4-5'Race-in	CTGGGTCCCCTTACAGTTTCG	
Wnt4-RT-F	AACAGGAGACGAAATCTAATGG	<i>wnt4</i> 荧光定量 PCR <i>wnt4</i> qRT-PCR
Wnt4-RT-R	GTACAGAAGAAACCAACACGAAT	
$\beta$ -actin-F	AAGCGGAAGAGCCCCAGCAC	$\beta$ -actin 荧光定量 PCR $\beta$ -actin qRT-PCR
$\beta$ -actin-R	AGAGCGGTCGCCAGTAAA	
M13-47	CGCCAGGGTTTTCCAGTCAACGAC	菌液 PCR bacteria PCR
RV-M	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	
UPM (Long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG CAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 试剂盒引物 RACE kit primer
UPM (Short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	

## 2 结果与分析

### 2.1 栉江珧 *wnt4* 基因全长 cDNA 序列特征和系统进化分析

利用 Lasergene 软件包将测序结果进行拼接, 得到了栉江珧 *wnt4* 基因完整的 cDNA 序列。该序列全长 1493 bp, 起始密码子 ATG, 终止密码子 TGA, 开放阅读框为 1074 bp, 编码 357 个氨基酸, 其两翼分别存在 383 bp (5'端) 和 36 bp (3'端) 非编码区; 具有一段长为 26 个氨基酸残基的信号肽, 2 个位于 N-91 和 N-303 位置的 N-糖基化位点, 以及 *wnt* 家族特有保守片段“CKCHGVSGSC”(图 1A)。该蛋白的预测分子量为 39.54 kD, 理论等电点 8.94, 因此该蛋白呈弱碱性, 具体的氨基酸组成及含量见图 1B; 该氨基酸序列包含 34 个带负电荷的氨基酸(D, E), 58 个带正电荷的氨基酸(K, R), 105 个疏水性氨基酸(A, I, L, F, W, V), 102 个亲水性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y)。预测的 *wnt4* 蛋白三维结构与 *wnt* 家族显示出 39.46% 的一致性(图 1C)。

将栉江珧 *wnt4* 基因与已经报道的序列进行同源比较, 结果显示, 与栉孔扇贝、海胆、原鸡 (*Gallus gallus*)、非洲爪蟾和人的同源性分别为 76.3%、59.3%、59.5%、58.7% 和 58.1%(表 2)。*wnt* 结构域氨基酸序列在不同物种间具有高度的保守性, 而 N 端氨基酸序列保守性较低; *wnt4* 氨基酸序列含有 153 个保守位点, 包括 24 个高度保守的半胱氨酸残基(图 2)。使用 Mega 软件构建的 *wnt4* 氨基酸序列系统进化树显示, 栉江珧与栉孔扇贝紧密聚为一枝, 之后与头足类夏威夷四盘耳乌贼 (*Euprymna scolopes*) 聚为一枝, 最后与海胆和脊椎动物等聚类(图 3)。

### 2.2 *wnt4* 基因在栉江珧不同组织的定量表达分析

荧光定量 PCR 结果表明, 栉江珧 *wnt4* 基因在鳃、外套膜、闭壳肌、性腺、肝胰腺、神经节和足中均有表达, 但表达水平存在组织和性别差异(图 4)。外套膜和性腺中表达量最高, 并且雌性个体表达水平显著高于雄性个体 ( $P < 0.05$ ), 具有显著的性别二态性。鳃、闭壳肌、肝胰腺、神经节和足中, *wnt4* 基因表达量显著低于外套膜和性腺 ( $P < 0.05$ )。神经节中表达量也存在性别二态性, 雌

性神经节表达量显著高于雄性 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 *wnt4* 基因在栉江珧不同发育时期性腺中的定量表达分析

栉江珧不同发育时期性腺中 *wnt4* 基因表达量不同, 并且随着性腺发育呈规律变化(图 5)。卵巢中 *wnt4* 基因表达量随着性腺进入发生期, 表达量显著升高, 并在增殖期达到最大值, 显著高于其他时期 ( $P < 0.05$ ), 成熟期和排放期卵巢 *wnt4* 基因表达量迅速下降到最低值; 精巢 *wnt4* 基因表达量变化规律和卵巢相似, 增殖期表达量最高, 排放期最低。整个繁殖周期, 卵巢 *wnt4* 基因表达量比精巢高, 在发生期、增殖期和成熟期差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 *wnt4* 基因在栉江珧幼体不同发育阶段的定量表达分析

如图 6 所示, *wnt4* 基因在栉江珧幼体不同发育阶段表达有差异。受精卵和多细胞期中 *wnt4* 基因几乎没有表达, 桑椹期 *wnt4* 基因表达量开始升高, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 囊胚期和原肠期 *wnt4* 基因表达量显著升高, 达到最大值, 约为桑椹期表达量的 5 倍 ( $P < 0.05$ ); 担轮幼虫 *wnt4* 基因表达量显著下降, 到 D 形幼虫达到最低值, 仅为囊胚期表达量的 0.08% 左右; 稚贝 *wnt4* 基因表达量又开始升高。

### 2.5 $17\beta$ -雌二醇对栉江珧性腺中 *wnt4* 基因表达的影响

$17\beta$ -雌二醇对栉江珧性腺中 *wnt4* 基因的调控作用在雌雄个体间存在差异(图 7)。 $17\beta$ -雌二醇处理卵巢 2 d 后, 与对照组相比, 实验组 *wnt4* 基因表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 处理 30 d 后, 实验组 *wnt4* 基因表达量显著降低, 仅为对照组表达量的 16% 左右 ( $P < 0.05$ )。 $17\beta$ -雌二醇处理精巢 2 d, 实验组 *wnt4* 基因表达量显著提高, 约为对照组的 4 倍 ( $P < 0.05$ ); 而处理 30 d 后, 实验组 *wnt4* 基因表达量降低, 与对照组没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。然而培养 30 d 后, 卵巢 *wnt4* 基因表达量提高, 而精巢 *wnt4* 基因表达量显著下降, 仅为培养 2 d 后的 40% 左右。

## 3 讨论

氨基酸序列分析显示, 本研究由栉江珧克隆获得的 cDNA 序列具有 *wnt* 家族结构特征<sup>[27]</sup>: 24 个高度保守性半胱氨酸的信号序列, 超过 100 个



表 2 不同物种 wnt4 氨基酸序列同源性分析
Tab. 2 Percent identity of wnt4 proteins within different species

Table with 13 columns: 物种 (species), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Rows list species 1-12 and their corresponding identity percentages.

注: 1. 栉江珧; 2. 栉孔扇贝(AFU35435.1); 3. 夏威夷四盘耳乌贼(ABD16196.1); 4. 海胆(AHY22359.1); 5. 皱皮蛙(BAE16611.1); 6. 非洲爪蟾(NP\_001239014.1); 7. 金丝雀(XP\_009097627.1); 8. 原鸡(NP\_990114.1); 9. 小鼠(AAI01963.1); 10. 人(BAC23080.1); 11. 斑马鱼(AAA96518.1); 12. 青鳉(ACM50932).

Note: 1. Atrina pectinata; 2. Chlamys farreri (AFU35435.1); 3. Euprymna scolopes (ABD16196.1); 4. Paracentrotus lividus (AHY22359.1); 5. Rana rugosa (BAE16611.1); 6. Xenopus laevis (NP\_001239014.1); 7. Serinus canaria (XP\_009097627.1); 8. Gallus gallus (NP\_990114.1); 9. Mus musculus (AAI01963.1); 10. Homo sapiens (BAC23080.1); 11. Danio rerio (AAA96518.1); 12. Oryzias latipes (ACM50932).

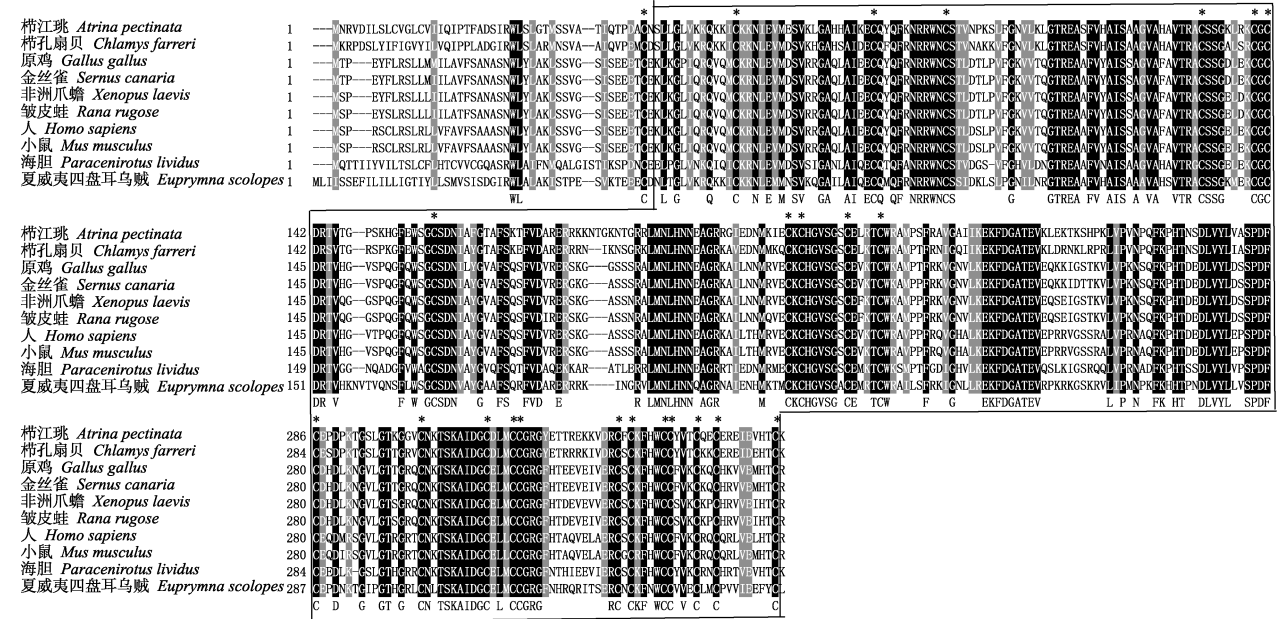


图 2 不同物种 wnt4 氨基酸序列多重比对分析

阴影区表示同源性氨基酸, 其中黑色区表示氨基酸同源性为 100%, 灰色区表示氨基酸的同源性在 75% 以上, 星号表示保守的半胱氨酸残基, 方框表示 wnt 保守结构域. GenBank 注册号同表 2.

Fig. 2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of wnt4 among different species. Shaded regions indicate residues sharing homology: Black regions indicate 100% homology, and gray regions indicate homology above 75%. Stars mean the well-conserved cysteine residues, and the conserved wnt domain sequence is boxed. GenBank accession number are the same as Table 2.



图 3 基于 *wnt4* 氨基酸序列绘制的系统发生树

GenBank 注册号同表 2.

Fig. 3 Phylogenetic tree of *wnt4* based on the homologous amino acids

GenBank accession numbers are the same as Tab. 2.

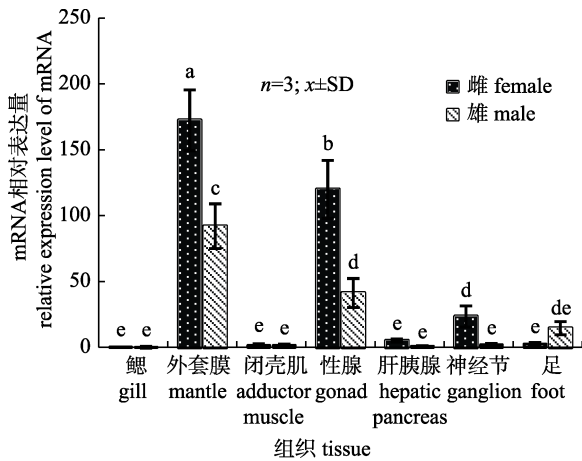


图 4 栉江珧 *wnt4* 基因在雌性和雄性成体不同组织中的表达情况

不同字母代表不同组织间差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 4 Relative expression of the *wnt4* gene in different tissues of the adult *Atrina pectinata* of different sexes. Different letters indicate significant differences between different tissues ( $P < 0.05$ ).

氨基酸保守位点, 2 个 N-糖基化位点和共用的 N 端信号肽序列。氨基酸序列同源比对显示, 栉江珧 *wnt4* 与同为双壳纲的栉孔扇贝同源性高达 76.3%, 与其他物种同源性也达到 50% 以上。预测的 *wnt4* 蛋白三维结构与 *wnt* 家族也具有高度的一致性, 因此确定本研究获得的序列为栉江珧 *wnt4* 基因 cDNA 序列。

*wnt4* 蛋白是一种分泌型糖蛋白, 在不同生物多种组织中均有表达, 广泛参与生物体多种功能调控。Choi 等<sup>[28]</sup>对小鼠不同组织原位杂交显示,

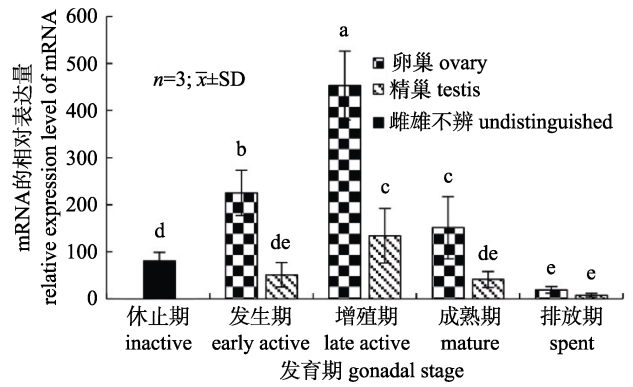


图 5 *wnt4* 基因在栉江珧不同发育时期性腺中的表达量

不同的字母代表不同发育期间差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 5 Relative expression of *wnt4* in *Atrina pectinata* gonad during different gonadal stages

Different letters indicate significant differences between different stages ( $P < 0.05$ ).

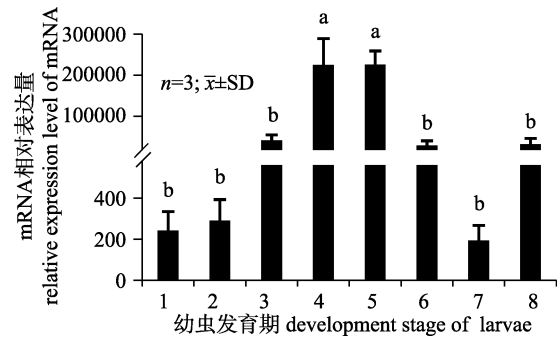


图 6 *wnt4* 基因在栉江珧幼虫不同发育阶段的表达情况

1: 受精卵; 2: 多细胞期; 3: 桑椹期; 4: 囊胚期; 5: 原肠期; 6: 担轮幼虫; 7: D 形幼虫; 8: 稚贝。不同的字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 6 Relative expression of the *wnt4* gene in different developmental stages of *Atrina pectinata* larvae

1: fertilized egg; 2: multicellular stage; 3: morula stage; 4: blastula stage; 5: gastrula stage; 6: trochophore stage; 7: D-shaped stage; 8: juvenile stage. Different letters indicate significant differences statistically ( $P < 0.05$ ).

*wnt4* 基因在卵巢、脑、肌肉和骨骼等组织中均有表达; *wnt4* 基因广泛表达于波纹唇鱼 (*Cheilinus undulatus*) 的性腺、鳃、垂体、脑、心脏、肝和肾等组织<sup>[29]</sup>。Takata 等<sup>[21]</sup>过表达鸡的骨骼肌前体细胞 *wnt4* 基因, 导致肌肉量显著增加, 认为 *wnt4* 基因是生肌细胞迁移和分化的刺激因子; 在果蝇的视觉系统中, *wnt4* 蛋白还具有调节视网膜成像的功能<sup>[20]</sup>。*wnt4* 基因在栉孔扇贝<sup>[25]</sup>和长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)<sup>[30]</sup> 的外套膜、闭壳肌、鳃、肝胰腺、精巢和卵巢中也均有表达, 但所行使的生理功能还不清楚。与已报

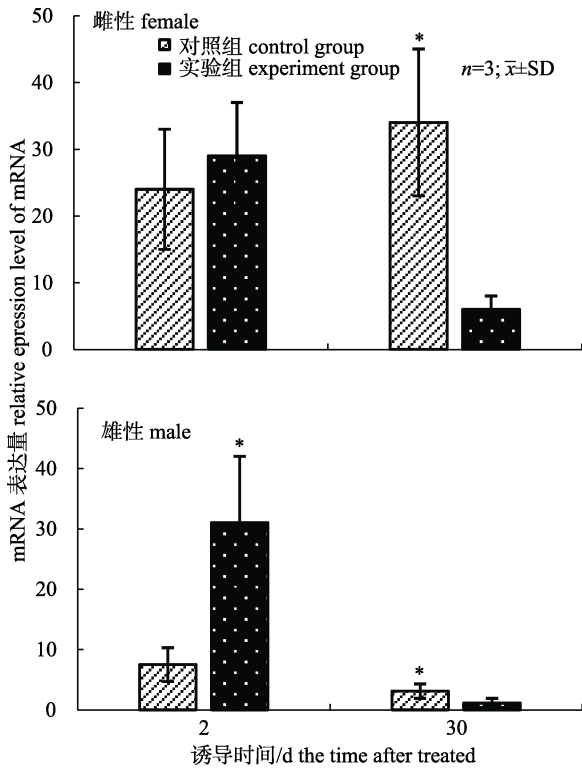


图 7 注射  $17\beta$ -雌二醇后栉江珧性腺中 *wnt4* 基因的表达情况

\*代表实验组和对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 7 Relative expression of *wnt4* in *Atrina pectinata* gonad after  $17\beta$ -estradiol injection

\*indicates significant difference between experiment and control groups ( $P < 0.05$ ).

道的结果类似, 本研究栉江珧 *wnt4* 基因也具有广泛的组织表达特点, 在所检测的组织(鳃、外套膜、闭壳肌、性腺、肝胰腺、神经节和足)中均有表达, 表明栉江珧 *wnt4* 基因可能参与了多种组织细胞的生命过程。在低等软体动物, 如栉孔扇贝、长牡蛎和夏威夷四盘耳乌贼等, 目前仅发现一种 *wnt4* 基因。研究发现, 许多鱼类具有 *wnt4a* 和 *wnt4b* 两种 *wnt4* 基因, 并且其表达具有组织特异性<sup>[12, 31]</sup>。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) *wnt4a* 在卵巢、精巢、脑、肌肉等组织中都有表达, 而 *wnt4b* 基因只在神经系统特异表达<sup>[12]</sup>。栉江珧 *wnt4* 基因除广泛的组织表达特点外, 还在雌神经组织显著表达, 这与虹鳟 *wnt4b* 基因的表达特点类似, 因此认为栉江珧 *wnt4* 基因可能行使虹鳟 *wnt4a* 和 *wnt4b* 两种基因的生物学功能。推测由于栉江珧神经系统在进化上更为原始, 结构和生物学功能较为简单,

可能不需要单独的 *wnt4* 基因参与特定功能的调控。

*wnt* 信号通路是哺乳动物骨的形成和生长的重要调节因子, *wnt* 信号通路的重要组件的基因突变都可能引起成骨发育异常和骨量的变化, 从而导致骨质疏松等骨骼疾病<sup>[32]</sup>。本研究发现 *wnt4* 基因在栉江珧外套膜中表达量最高, 暗示其参与了外套膜中某些生理功能。栉孔扇贝<sup>[25]</sup>和长牡蛎<sup>[30]</sup>外套膜 *wnt4* 基因都具有较高的表达量, 这进一步暗示了 *wnt4* 基因在外套膜中可能发挥重要作用。外套膜是双壳类重要器官, 它不仅在贝类摄食和呼吸等功能上具有重要作用, 而且是贝壳形成的主要器官。栉江珧外套膜 *wnt4* 基因的高表达, 表明和哺乳动物类似, *wnt4* 基因可能参与了双壳类贝壳的形成。同时外套膜中有大量的外套神经<sup>[33]</sup>, 结合 *wnt4* 基因在神经发生中的作用, 笔者推测 *wnt4* 基因在栉江珧神经系统发育和维持方面也具有一定作用。

大量研究表明, *wnt* 信号通路是哺乳动物性别决定的关键因子, *wnt4* 基因发生突变, 会导致性腺发育异常甚至性反转<sup>[13, 16-18]</sup>。在非哺乳类动物, *wnt4* 基因在雌雄个体性腺中差异表达, 并不具有保守性。在日本血吸虫<sup>[15]</sup>、黑鲷<sup>[14]</sup>和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[34]</sup>等种类, *wnt4* 基因在卵巢中的表达量显著高于精巢; 在鸡<sup>[35]</sup>、皱皮蛙(*R. rugosa*)<sup>[36]</sup>和长牡蛎<sup>[30]</sup>的两性性腺中表达无显著差异; 而在虹鳟<sup>[12]</sup>和栉孔扇贝<sup>[25]</sup>精巢, 表达量显著高于卵巢。这种表达差异被认为是 *wnt4* 基因功能多样性和种间差异造成的<sup>[14]</sup>。*wnt4* 基因在栉江珧不同发育时期的性腺中都有表达, 并且在增殖期表达量最高, 这一表达特点与牙鲆性腺中 *wnt4* 基因的表达类似<sup>[34]</sup>, 暗示该基因可能在栉江珧两性性腺的生长过程中发挥重要作用。与栉孔扇贝<sup>[25]</sup>精巢显著表达不同, 在栉江珧整个繁殖周期卵巢 *wnt4* 基因的表达量都显著高于精巢, 表明 *wnt4* 基因在栉江珧卵巢发育过程中发挥了更重要的作用。

*wnt4* 基因在哺乳动物<sup>[37-38]</sup>早期发育过程中参与了肾脏和生殖系统的形成<sup>[16]</sup>。在软体动物, 有关 *wnt4* 基因在早期胚胎发育中的表达研究仅在长牡蛎中被报道。*wnt4* 基因长牡蛎胚胎发育阶



段的高表达主要集中在在囊胚期和原肠期<sup>[30]</sup>, 这与栉江珧 *wnt4* 基因的表达特点类似。早期胚胎发育是个体形成不可逾越的初始阶段, 又是组织器官形成的基础<sup>[30]</sup>。wnt 蛋白是生物体早期胚胎发育的重要调节因子, 包括原肠胚的形成、轴的形成和器官发育等生理过程<sup>[39]</sup>。因此 *wnt4* 基因参与的 wnt 信号通路, 可能参与了栉江珧的早期胚胎发育。

*wnt4* 蛋白通过改变 wnt 信号通路下游基因 *star* 等的表达, 调控哺乳动物固醇类激素的合成<sup>[35]</sup>。该通路具有反馈调节机制, 这种机制对维持机体平衡具有重要作用<sup>[6, 40]</sup>。普遍认为, 当体内雌二醇含量高于正常生理水平时, 反馈调节机制会抑制 *wnt4* 基因的表达。雌二醇处理后, 雌性特异性基因在精巢中显著表达的现象, 在许多双壳类卵黄蛋白原基因研究中都有报道<sup>[41]</sup>, 这可能是因为机体雌激素含量的突变, 引起雄性个体内分泌紊乱, 导致基因的非正常表达。精巢 *wnt4* 基因的显著表达表明栉江珧 *wnt4* 基因还可能参与了机体内稳态的调节<sup>[9]</sup>。处理 30 d 后, 当机体内稳态恢复正常时, *wnt4* 基因表达水平也下降到正常水平。然而人工培育 30 d 后, 栉江珧卵巢 *wnt4* 基因表达量提高, 而精巢表达量显著下降, 仅为培养前的 40% 左右。亲贝培育是栉江珧人工育苗的瓶颈之一, 虽然有大量的研究, 但迄今没有找到合适的培育方式(包括水温、饵料等), 培育过程中精巢出现亲贝性腺发育差、性腺退化、人工催产困难等问题<sup>[42]</sup>。性腺发育是在繁殖相关基因的调节下完成, 基因表达水平的变化反映了性腺发育不同的生理变化。大量研究表明, *wnt4* 蛋白是哺乳动物、鱼类和海洋贝类等动物性腺发育的必须因子<sup>[13-14, 30]</sup>。而本研究中, 栉江珧精巢 *wnt4* 基因在培养 30 d 后表达量下降, 暗示精巢的发育可能受到了抑制——传统的人工促熟方法抑制栉江珧精巢的发育, 但这还需要后续组织学观察进行验证。如果能将 *wnt4* 基因表达水平作为栉江珧精巢发育的指标, 从基因表达水平判断培养条件变化对性腺发育的影响, 这将为研究栉江珧人工促熟提供一个新的思路。

综上所述, 本研究首次克隆了栉江珧 *wnt4* 基

因, 阐明 *wnt4* 基因在栉江珧的时空表达特点及 17 $\beta$ -雌二醇的调控作用。研究显示, 栉江珧 *wnt4* 基因表达具有广泛性和组织差异性, 并且主要在外套膜和性腺中表达, 表明 *wnt4* 基因可能参与了多种组织的生物学过程, 尤其是性腺发育和外套膜形成贝壳的过程; 性腺发育时期, *wnt4* 基因主要在增殖期卵巢中表达, 说明 *wnt4* 基因在卵巢发育过程中发挥更重要的作用; 胚胎发育过程中 *wnt4* 基因的高表达主要集中在囊胚期和原肠胚期, 说明该基因可能参与了栉江珧早期胚胎器官分化和形成。研究结果为进一步开展软体动物 *wnt* 基因家族研究和栉江珧性腺发育机制提供了重要参考。

#### 参考文献:

- [1] Logan C Y, Nusse R. The *wnt* signaling pathway in development and disease[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20(1): 781-810.
- [2] Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, et al. *Fgf9* and *wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination[J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(6): 1000-1009.
- [3] Yu H, Pask A J, Shaw G, et al. Comparative analysis of the mammalian *wnt4* promoter[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 416.
- [4] Johnson M L, Rajamannan N. Diseases of *wnt* signaling[J]. *Rev Endocr Metab Dis*, 2006, 7(1-2): 41-49.
- [5] Nusse R. *Wnt* signaling in disease and in development[J]. *Cell Res*, 2005, 15(1): 28-32.
- [6] MacDonald B T, Tamai K, He X. *Wnt*/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases[J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9-26.
- [7] Nusse R, Varmus H E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome[J]. *Cell*, 1982, 31(1): 99-109.
- [8] Ooyen A V, Nusse R. Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene *int-1*: proviral insertions leave the protein-encoding domain intact[J]. *Cell*, 1984, 39(1): 233-240.
- [9] Cabrera C V, Alonso M C, Johnston P, et al. Phenocopies induced with antisense RNA identify the *wingless* gene[J]. *Cell*, 1987, 50(4): 659-663.
- [10] Wang X B, Li H F, Qi X Y, et al. Characterization and expression of a novel *Frizzled 9* gene in *Schistosoma japonicum*[J]. *Gene Expr Patterns*, 2011, 11(3): 263-270.
- [11] Tian Q, Jin H, Cui Y Z, et al. Regulation of *wnt* gene expression[J]. *Dev Growth Differ*, 2005, 47(5): 273-281.
- [12] Nicol B, Guerin A, Fostier A, et al. Ovary-predominant *wnt4*

- expression during gonadal differentiation is not conserved in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(1): 51–63.
- [13] Yao H H, Matzuk M M, Jorgez C J, et al. Follistatin operates downstream of *wnt4* in mammalian ovary organogenesis[J]. *Dev Dynam*, 2004, 230(2): 210–215.
- [14] Wu G C, Chang C F. *Wnt4* is associated with the development of ovarian tissue in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(6): 1073–1082.
- [15] Tao L H, Yao L X, Fu Z Q, et al. Cloning, expression and characterization of a gene encoding signal transduction protein *wnt4* *Schistosoma japonicum*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23(3): 392–397. [陶丽红, 姚利晓, 傅志强, 等. 日本血吸虫信号转导蛋白 *Sjwnt-4* 基因的克隆、表达及功能分析[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(3): 392–397.]
- [16] Bernard P, Harley V R. *Wnt4* action in gonadal development and sex determination[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1): 31–43.
- [17] Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, et al. Female development in mammals is regulated by *wnt-4* signalling[J]. *Nature*, 1999, 397(6718): 405–409.
- [18] Jeays-Ward K, Dandonneau M, Swain A. *Wnt4* is required for proper male as well as female sexual development[J]. *Dev Biol*, 2004, 276(2): 431–440.
- [19] Maurus D, Héligon C, Bürger-Schwärzler A, et al. Noncanonical *wnt-4* signaling and EAF2 are required for eye development in *Xenopus laevis*[J]. *EMBO J*, 2005, 24(6): 1181–1191.
- [20] Sato M, Umetsu D, Murakami S, et al. *Dwnt4* regulates the dorsoventral specificity of retinal projections in the *Drosophila melanogaster* visual system[J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(1): 67–75.
- [21] Takata H, Terada K, Oka H, et al. Involvement of *wnt4* signaling during myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle[J]. *Dev Dynam*, 2007, 236(10): 2800–2807.
- [22] Katayama S, Ashizawa K, Fukuhara T, et al. Differential expression patterns of *wnt* and  $\beta$ -Catenin/TCF target genes in the uterus of immature female rats exposed to 17 $\alpha$ -Ethinyl estradiol[J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91(2): 419–430.
- [23] Miyakoshi T, Kajiya H, Miyajima K, et al. The expression of *wnt4* is regulated by estrogen via an estrogen receptor alpha-dependent pathway in rat pituitary growth hormone-producing cells[J]. *Acta Histochem Cytoc*, 2009, 42(6): 205–213.
- [24] Hou X N, Tan Y, Li M L, et al. Canonical *wnt* signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth[J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(12): 3035–3049.
- [25] Li H L, Liu J G, Liu X L, et al. Molecular cloning and expression analysis of *wnt4* cDNA from the Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(2): 260–268. [李海龙, 刘建国, 刘晓玲, 等. 栉孔扇贝 *wnt4* 基因 cDNA 克隆及表达分析[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(2): 260–268.]
- [26] Qin Z K, Li Y, Sun D P, et al. Cloning and expression analysis of the *vitellogenin* gene in the scallop *Chlamys farreri* and the effects of estradiol-17 $\beta$  on its synthesis[J]. *Invertebr Biol*, 2012, 131(4): 312–321.
- [27] Nusse R, Varmus H E. *Wnt* genes[J]. *Cell*, 1992, 69(7): 1073–1087.
- [28] Choi Y, Ballow D J, Xin Y, et al. Lim homeobox gene, *Lhx8*, is essential for mouse oocyte differentiation and survival[J]. *Biol Reprod*, 2008, 79(3): 442–449.
- [29] Huang F. Cloning and expression analysis of genes which related to sex development of *Cheilinus undulatus*[D]. Hainan University, 2014: 25–27. [黄飞. 波纹唇鱼性别发育候选基因的克隆与表达研究[D]. 海口: 海南大学, 2014: 25–27.]
- [30] Yang M, Xu F, Liu J, et al. Molecular cloning and expression of *wnt4* gene in Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(1): 35–42. [杨梅, 许飞, 刘俊, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*) *wnt4* 基因 cDNA 克隆与表达分析[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(1): 35–42.]
- [31] Li J Z, Liu Q, Wang D S, et al. Molecular cloning and identification of two *wnt4* genes from the medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(5): 983–986. [李建中, 刘琼, 王德寿, 等. 日本青鳉 2 种 *wnt4* 基因的克隆及鉴定[J]. *水生生物学报*, 2012, 36(5): 983–986.]
- [32] Lu C. The role of *wnt* signaling in cartilage development[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2013: 9–37. [陆诚. *Wnt* 信号通路在软骨发育中的功能研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2013: 9–37.]
- [33] Wang R C, Wang Z P. Science of Marine Shellfish Culture[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2008. [王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008.]
- [34] Wang S D. Molecular cloning and expression patterns of sex-related genes in *Paralichthys olivaceus*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013: 25–54. [翁申达. 牙鲆性别相关基因的克隆与表达分析[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2013: 25–54.]
- [35] Oréal E, Mazaud-Guittot S, Picard J Y, et al. Different patterns of anti-Müllerian hormone expression, as related to *DMRT1*, *SF-1*, *WT1*, *GATA-4*, *Wnt-4*, and *Lhx9* expression, in the chick differentiating gonads[J]. *Dev Dynam*, 2002, 225(3): 221–232.
- [36] Oshima Y, Hayashi T, Tokunaga S, et al. *Wnt4* expression in the differentiating gonad of the frog *Rana rugose*[J]. *Zool Sci*, 2005, 22(6): 689–693.
- [37] Stark K, Vainio S, Vassileva G, et al. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regu-

- lated by *wnt-4*[J]. Nature, 1994, 372(6507): 679–683.
- [38] Kispert A, Vainio S, McMahon A P. *Wnt-4* is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney[J]. Development, 1998, 125(21): 4225–4234.
- [39] Couse J F, Hewitt S C, Bunch D O, et al. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ [J]. Science, 1999, 286(5448): 2328–2331.
- [40] Yin D Z, Song H Y. Regulation of *wnt* signaling: Mechanisms and biological significance[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2011, 33(2): 103–111. [尹定子, 宋海云. *Wnt* 信号通路: 调控机理和生物学意义[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(2): 103–111.]
- [41] Ni J, Zeng Z, Kong D, et al. Vitellogenin of Fujian oyster, *Crassostrea angulata*: synthesized in the ovary and controlled by Estradiol-17 $\beta$ [J]. Gen Comp Endocr, 2014, 202(1): 35–43.
- [42] Zhang H Y. Research on reproductive biology and artificial breeding technology of *Atrina pectinata* Linnaeus[D]. Xiamen: Jimei University, 2010: 1–8. [张红云. 栉江珧繁殖生物学及人工苗种繁育技术研究[D]. 厦门: 集美大学, 2010: 1–8.]

## Molecular cloning and expression analysis of *wnt4* from *Atrina pectinata* and effects of estradiol-17 $\beta$ on its expression

WANG Changbo, LI Qi, YU Ruihai, KONG Lingfeng, YU Hong

Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

**Abstract:** The pen shell *Atrina pectinata* is a large, fan-shaped bivalve that is widely distributed in the Indian and western Pacific oceans. However, little is known about the molecular regulation of its gonad development. The *wnt4* (wingless-type MMTV integration site family, member 4) gene, a member of the *wnt* family, encodes a growth factor that plays an important role in gonad differentiation and development. In this study, the complete cDNA sequence of *wnt4* was cloned from the *A. pectinata* ovary by homology-based cloning and rapid amplification of cDNA ends techniques. The full-length cDNA sequence of *wnt4* was 1493 bp long and included an open reading frame of 1074 bp encoding a 357-amino acid protein with a predicted molecular weight of 39.5 kD and a theoretical isoelectric point of 8.94. Multiple alignment and phylogenetic analysis of *wnt* proteins showed that the *A. pectinata* *wnt4* sequence contained conserved domains of the *wnt* family. In the phylogenetic analysis, the *A. pectinata* *wnt4* showed high similarity to the *wnt* of *Chlamys farreri* and lower similarity to the *wnts* of echinoderms, amphibians, and mammals. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis revealed that *wnt4* transcripts were present at higher levels in the female mantle and gonad of *A. pectinata*, and at lower levels in other tissues. Accumulation of *wnt4* transcripts was related to gonad maturity, and the transcription of *wnt4* in *A. pectinata* was significantly ovary-predominant during the entire reproductive cycle. These patterns of transcription suggested that *wnt4* is involved in gonad development, especially the ovary, in *A. pectinata*. During the early larval development stage of *A. pectinata*, the highest transcript level of *wnt4* was detected in early embryogenesis (morula stage and gastrula stage), when it was 500 times that in adults, and then the transcript level fell sharply during the trochophore and D-shaped stages. Therefore, *wnt4* may be involved in the formation of certain organs in the stages of early larval development. When the sex steroid estradiol-17 $\beta$  was injected into the ovary, it inhibited the transcription of *wnt4* through feedback regulation ( $P < 0.05$ ). However, a short estradiol-17 $\beta$  treatment significantly induced transcription of *wnt4* in the testis ( $P < 0.05$ ). These results showed that *wnt4*, regulated by estradiol-17 $\beta$ , is involved in a variety of biological processes in different tissues, especially during early embryogenesis and gonad development. Further research is required to verify whether the transcript level of *wnt4* can be used as an index of testis development.

**Key words:** *Atrina pectinata*; *wnt4*; gene clone; qRT-PCR; ontogenesis; reproductive stages; estradiol-17 $\beta$

**Corresponding author:** LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn