

DOI: 10.12264/JFSC2021-0239

曼氏无针乌贼维甲酸 X 受体(RXR)cDNA 的克隆与表达

董震宇^{1,2}, 杨槐^{1,2}, 郭宝英^{1,2}, 叶莹莹^{1,2}, 祁鹏志^{1,2}, 迟长凤^{1,2}, 徐开达^{3,4}

1. 浙江海洋大学, 浙江 舟山 316022;

2. 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022;

3. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316021;

4. 农业农村部重点渔场渔业资源科学观测实验站, 浙江省海洋渔业资源可持续利用技术研究重点实验室, 浙江 舟山 316021

摘要: 维甲酸 X 受体(retinoid X receptor, RXR)属于配体激活的核受体家族。本研究采用 RT-qPCR 技术克隆了曼氏无针乌贼 *RXR* (*SjRXR*)基因的 CDS 区核酸序列, 推导出其氨基酸序列, 并对 *RXR* 基因 CDS 区核苷酸序列与蛋白质结构进行了生物信息学分析, 结果如下: *SjRXR* 的 CDS 区核苷酸序列全长 1239 bp, 编码 1 个由 412 个氨基酸组成的蛋白质; 序列分析表明, 曼氏无针乌贼 *RXR* 的 CDS 区基因编码的蛋白质不含有信号肽, 无跨膜结构, 推测 *RXR* 编码蛋白属于非分泌型、非跨膜蛋白; 对蛋白进行疏水性分析, 发现亲水性部分大于疏水性部分, 预测 *RXR* 编码蛋白为亲水性蛋白, 包含 1 个 HOLL 家族的结构域; 利用 MEGA 6.0 软件以 ML 法构建了系统进化树, 结果表明, 曼氏无针乌贼与双斑蛸亲缘关系最近, 同属于软体动物门头足纲, 最先聚为一支, 曼氏无针乌贼 *RXR* 基因的分子进化地位与其生物学分类地位大体保持一致。采用 RT-qPCR 技术分析了该基因在乌贼 4 个时期 11 个组织中的表达规律, 结果如下: *SjRXR* 基因在各组织中均有表达, 且在肝、胰、脑、视叶和视腺中表达量较高; *SjRXR* 基因表达在不同生长周期存在明显变化, 在肝、胰中呈一直上升趋势, 在脑、视叶、视腺中呈先上升后下降趋势。*SjRXR* 是曼氏无针乌贼神经发育、生殖调节和衰老凋亡的重要调控因子之一, 本研究结果可为进一步深入研究头足类动物 *RXR* 基因提供重要参考依据。

关键词: 曼氏无针乌贼; *RXR*; 生殖; 表达分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)06-0814-11

曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)隶属软体动物门(Mollusca), 头足纲(Cephalopoda), 十腕目(Decapoda), 乌贼科(Sepiidae), 无针乌贼属^[1], 分布于中国沿海。曼氏无针乌贼是我国“四大海产”之一, 不仅肉质鲜美, 而且其内壳(海螵蛸)可以作为中药材, 其墨囊也可作为止血的药物, 具有较高的经济、食用和药用价值, 因此成为我国最具开发潜力的渔业资源之一^[2]。然而, 自 20 世纪 70 年代中期以来, 过度捕捞、生态环境以及产卵场的破坏, 致使曼氏无针乌贼资源遭到了严重破

坏, 其野生资源几近枯竭^[3]。为修复曼氏无针乌贼资源, 我国学者于 20 世纪 80 年代对其开展了驯化培养和种苗繁育。

曼氏无针乌贼为一年生, 生长速度快, 养殖周期短, 人工养殖条件下仅需半年即可达到商品化规格。曼氏无针乌贼怀卵量比较少, 仅为 1500 颗左右, 并且产卵后的雌乌贼个体不久便死亡, 死亡时卵巢中尚残留有大量的未成熟卵子^[2], 致使实际产卵量仅为怀卵量的 40%^[4], 这严重制约了曼氏无针乌贼养殖规模的发展, 对乌贼资源的

收稿日期: 2021-05-26; 修订日期: 2021-10-23.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0901204); 国家自然科学基金项目(31872547); 浙江省自然科学基金项目(LY20C190007).

作者简介: 董震宇(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学. E-mail: dongzhenyu2021@163.com

通信作者: 郭宝英, 教授, 研究方向为海洋生物学. E-mail: guobaobao2000@126.com

繁衍造成了严重的阻碍,也使乌贼群体不能得到有效的补充,致使对这一几近濒危的宝贵资源的修复收效甚微。由此认为,如果延缓曼氏无针乌贼的衰老使其尽可能地产出更多的卵,则有望提高乌贼养殖产量以及修复乌贼资源,这将不失为发展其人工增养殖产业及修复的有效措施。

衰老和死亡是十分复杂的生物学现象,有研究者从细胞水平和分子水平进行了衰老机理的探讨^[2]。有关动物的衰老相关蛋白基因的研究很多,无脊椎动物由于取材方便,易于在实验室内饲养繁殖,生殖周期短,寿命短,常被选作衰老相关研究的理想实验材料。

核受体超家族具有调控胚胎的健康发育、内环境稳定以及保持生理稳态的作用^[3]。维甲酸 X 受体具有典型的核受体结构,至少由 4 个功能结构域组成: A/B, C, D, E, 其中以 C 区和 E 区最为保守。A/B 区,能够通过增强 E 区中 AF-2 的作用,而将靶基因的表达上调。C 区是 DNA 结合区(DNA-binding domain, DBD),含有高度保守的 DNA 结合结构域^[4],能够介导核受体与位于靶基因启动子区域的反应元件结合。D 区连接 C 区与 E 区,E 区高度保守,是配体结合区(ligand binding domain, LBD),含一个配体依赖性的转录激活域(AF2)。在 E 区的 C 端外还有高度可变 F 区,结构与功能尚不清楚^[5-6]。研究表明,几乎所有的动物门类都存在 RXR。除哺乳动物 RXR 的研究之外,多集中于昆虫和甲壳类^[7-8]。Asazuma 等^[9]在对日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的研究中发现,RXR 参与了蜕皮的调控过程,它是先与 EcR 形成二聚体,然后共同调节甲壳动物的生长和蜕皮,在脊尾白虾和其他甲壳类动物中,RXR 在蜕皮、渗透压调控、酶活性调控中发挥着重要的作用^[10]。在三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)中,RXR 在卵巢参与了卵黄发生的调控^[11]。有机锡如三丁基锡(tributyltin, TBT)(RXR 激动剂)可选择性增加 TH 受体基因的表达量,诱导非洲爪蟾变态^[12]。在海湾扇贝(*Argopecten irradians*) RXR 基因研究中发现,*AiRXR* 基因在性腺发育各时期均有表达,增殖期表达量最高^[13]。也有研究表明 RXR 参与了有

机锡(TBT)诱导的腹足类性畸变,在疣荔枝螺(*Thais clavigera*)^[14]、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)^[15]、狗岩螺(*Nucella lapillus*)^[16]、泥螺(*Ilyanassa obsoleta*)^[17]和静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)^[18]中均有发现。当三丁基锡(tributyltin, TBT)结合 RXR 后,性腺和消化腺中编码类视黄素和类固醇代谢组件的基因可能受到影响,从而导致这些激素水平失衡,进而调控雌雄个体中枢神经系统(CNS)和雄性生殖器的 RXR 信号通路。RXR 参与某些海洋腹足类性畸变过程,如性别决定以及分化过程^[19-20]。这些腹足动物的 RXRs 可能通过形成具有自身亚型的同源或异质二聚体复合物来控制不同的基因转录。这些发现将有助于理解软体动物内分泌系统的基本原理,特别是 RXR 信号通路^[21]。

本研究选取了曼氏无针乌贼生长周期的 4 个不同时期——性成熟前时期、性成熟后产卵前时期、产卵中时期、产卵后濒死时期,采用 PCR 扩增技术克隆获得了 *SjRXR* 基因的 CDS 区核酸序列,采用 RT-qPCR 技术分析了 *SjRXR* 基因在各个时期各个组织中的表达情况,旨在探究 *SjRXR* 基因在乌贼发育、生殖、衰老中的调控作用,为进一步开展头足类 RXR 基因功能研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用乌贼于 2017 年 10 月中旬采自福建省福鼎市沙埕镇曼氏无针乌贼苗种繁育和养成示范基地,分别在曼氏无针乌贼生长的 4 个阶段(即性成熟前、性成熟后产卵前、产卵中、产卵后)选取体型大小相近的健康乌贼各 30 头,根据养殖时间、形态观察及解剖观测^[22]准确区分乌贼处于何种生长阶段。解剖分别取其肌肉、鳃、胃、心脏、胰脏、表皮、肠、肝脏、脑、视叶和视腺组织样品,保存于-80℃超低温冰箱中备用。

实验试剂 Trizol、荧光定量 PCR 试剂 SYBR® Premix ExTaq™、pMD18-T Vector、E. coli DH5 均购自大连宝生物工程有限公司; Transcriptor FirstStrand cDNA Synthesis Kit 试剂盒购自 Roche

公司; SMARTerTMRACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version2.0 购自 Gibco BRL 公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的反转录

将乌贼活体解剖, 分别取出所需的各个组织(肠、胰脏、鳃、皮肤、肌肉、肝脏、脑、胃、视叶、视腺、心脏), 放入含有 RNA 保存液的冻存管中, 置于液氮中速冻, 随后放入 -80°C 超低温冰箱中保存, 用于 RNA 的提取。本实验采用试剂盒法提取 RNA, 使用 Omega 公司的试剂盒 Total RNA Kit II (货号: R6934)。

取无菌离心管并做好标记, 每个离心管取 50~100 mg 组织, 依次放入研磨器中, 加入 1 mL Trizol 充分匀浆, 室温静置 5 min。加入 200 μL 氯仿, 4°C , 12000 r/min, 离心 15 min。吸取上清液, 加入异丙醇上下颠倒混匀, 置于冰上, 静置 10 min, 4°C , 12000 r/min, 离心 10 min。弃去上清, 加入 1 mL 75%乙醇洗涤。 4°C 、7500 r/min, 离心 10 min, 保留沉淀, 室温下干燥 5 min, 加入 25 μL DEPC 水溶解。用紫外分光光度计和 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和完整度。将提取的 RNA 放置于 -80°C 超低温冰箱中保存备用。之后使用 Roche 公司的反转录试剂盒(Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit)将提取的 RNA 反转录为 cDNA, 操作方法按试剂盒说明书进行。

1.3 PCR 扩增曼氏无针乌贼 RXR 基因全 CDS 序列

根据本实验室获得的曼氏无针乌贼转录组测序及注释信息(未发表), 初步获得曼氏无针乌贼 RXR 基因的部分 cDNA 片段, 按照 2 $\times$ Es Taq Master Mix 试剂盒使用说明书建立 20 μL 反应体系: 2 $\times$ Es Taq Master Mix 10 μL , 上下游引物各 0.8 μL , cDNA 200 ng, ddH₂O 补足至 20 μL 。反应条件: 94°C 2 min; 94°C 30 s, 65°C 30 s, 72°C 40 s, 30 个循环; 72°C 2 min。1%琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物, 割胶回收 DNA, 送至华大基因进行双向测序。

1.4 生物信息学分析

将得到的测序结果用 SeqMan 软件进行校正和拼接, 获得曼氏无针乌贼 RXR 基因 CDS 区核酸序列, 利用 EditSeq 软件将得到的核苷酸序列翻译成氨基酸序列。

使用 NCBI 的 Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastx>)进行同源性比对; DNAMAN 进行多序列比对; 使用 MEGA 6.0 软件构建曼氏无针乌贼 RXR 氨基酸序列与其他物种氨基酸序列的系统进化树。利用 ExPasy 的 ProtParam tool 对其氨基酸序列的物理参数进行分析; 使用 SignalP4.1 server 预测信号肽; TMHMM 在线软件进行跨膜结构的分析; 利用 SMART 数据库分析结构域; 使用 SWISS-MODEL 对 RXR 编码的氨基酸序列进行三维结构预测。

1.5 曼氏无针乌贼各组织 RXR 基因的表达

以曼氏无针乌贼 RXR cDNA 的保守区设计荧光定量 PCR 引物, 先以各组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 再对 PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 若观察结果条带单一, 则该引物能用于后续实验。以 β -actin 基因作为内参基因, 以曼氏无针乌贼 4 个时期不同组织的 cDNA 作为模板, 使用 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 进行实时 RT-qPCR 分析。每个样本做 3 个平行检测。通过荧光定量 PCR 仪器收集各组织的目的基因表达水平数据, 采用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 法对基因的相对表达量进行分析。利用 SPSS17.0 软件进行单因素显著性差异分析, 最后利用 Origin 软件对得到的数据进行处理, 绘制柱状图并导出。

2 结果与分析

2.1 曼氏无针乌贼 RXR 基因的 CDS 区的核酸序列分析

将测序结果拼接获得完整的曼氏无针乌贼 RXR (*SjRXR*)基因的 CDS 区核酸序列, 推导出其氨基酸序列, 全长 1239 bp, GenBank 数据库登录号为 MK041210.1, 编码一个由 412 个氨基酸组成的蛋白质, 分子式为 $\text{C}_{2022}\text{H}_{3199}\text{N}_{549}\text{O}_{622}\text{S}_{27}$ (图 1)。

ProtParam tool 分析表明, 分子量为 46.01 kD, 理论等电点为 5.63, 带有负电的氨基酸残基为 49

```

1  ATGAAACTGAACCTGTTGAGAACAAATATAGCCAATGGCGTGCAACCGAGTGCAGTCATG
1  M K T E P V E N N I A N G V Q P S A V M
61  GATGGCATAGGAGTGGGTAACATGATGGCACCAAATGGTATTTCAAATGGTATCATTGCC
21  D G I G V G N M M A P N G I S N G I I A
121 AATGGTATTGCTAGCAGTGGTGTTCAGCAGTGCAGCTGATATCATCCAGCAAATATG
41  N G I A S S G V V S S A A D I I P A N M
181 GTCAACACAACCTGCCAATGGGCTCCCAAATGGAATCCACGAAGGCTGTACTGAAAGGATC
61  V N T T A N G L P N G I H E G C T E R I
241 TCTACTGGCACAATAGCAACAAGGACACAAGCCCCTCGTCCTTTGTAATGCCTGAGACG
81  S T G T N S N K D T S P S S F V M P E T
301 CCTAATTCACCTCATCTGCAGCCCCTACTCCCAGACACCATCACATTTTGATGAATCA
101 P N S T S S A A P T P Q T P S H F D E S
361 CAGTCAGTCATCAAAGCTGAGCCCAAGTTTTCCCTTGTCAAATTGGAAGTCAGAGTATA
121 Q S V I K A E P K F S P C Q I G S Q S I
421 CCTAAGTTCTTAATTGATAAAATCATCGAGGAAGGACGACAGGAGCCATCAGAACCTCGA
141 P K F L I D K I I E E G R Q E P S E P R
481 AAAAAGCTGATTGAGCAAGTCACTGTAACATTTGTTGAGGCTCATATGATGACATGTCGG
161 K K L I E Q V T V T I V E A H M M T C R
541 GTGACACATGATGCAGTCTTGGAGGCCTACCAGAGGTGGGAAGAGAATAAGAGTAAAATC
181 V T H D A V L E A Y Q R W E E N K S K I
601 ACTGCGTCTTTACAGACTCAAGAGAGTGCCTCTGAACATATGTGGGGCAGTTCCTCTCT
201 T A S L Q T Q E S A S E H M W G Q F L S
661 AATATGGTGCCTGAAATCACAATGTTGTCAAATTTTGTAAACGTCTCCAGGTTTTTCA
221 N M V P E I T N V V K F C K R L P G F S
721 GAGATTGATCAAGAGGACCAAAATCAAATTAATCAAGCAAGGGACGTTTGAAGTCATGCTG
241 E I D Q E D Q I K L I K Q G T F E V M L
781 GCAAGTTCTGCATGTTGGTCAACCATGACAACATACACCATGTTTGATCCAGATGAAA
261 A R F C M L V N H D N Y T M F D P D M K
841 ATGCAATGCCCAAGAGAAAATAATCCGAGCCATGCCACTGGGGAAGTTCCTTGAGGAGTTC
281 M Q C P R E I I R A M P L G K F L E E F
901 TTTTCAATGGCAGAAACCTTCAACCCCTTTGAAGCTTACAGATGGCGAAATTGGGCTCTTT
301 F S M A E T F N P L K L T D G E I G L F
961 ACATCAGTCTTGATTATATGTCCAGATCGTCAAAATCTTTCTGGAGTAAAAGCTATATCT
321 T S V L I I C P D R Q N L S G V K A I S
1021 AAAATACAAGGACTCTTTTACAAGCCTTGATAATAAAATAAAACACACTCATGAGGAT
341 K I Q G L F L Q A L Y N K I K H T H E D
1081 TATGACACATTGTTTGAAGCCTTATCCGAACAATTCCAATGTTCCGTGAATTCAACCAT
361 Y D T L F E S L I R T I P M F R E F N H
1141 CAGCACTCAGTGTCACTCAACAACATCCGATGAAGTCAACAAAGAGTCGATTTGATTTT
381 Q H S V S L N N I R M K S T K S R F D F
1201 CCTGATCTGCACAAAGAAGTGTGTTGATTTTCAAGATGTA
401 P D L H K E V F D F R M *

```

图 1 曼氏无针乌贼 RXR 基因 CDS 区及推导的氨基酸序列

黑体字为起始密码子与终止密码子; 灰色阴影为 Holi 家族结构域。

Fig. 1 The CDS of *Sepiella japonica* RXR gene and the deduced amino acid sequence
The bold letters are the start codon and the stop codon. Gray shadows are Holi family domains.

个(Asp, Glu), 带有正电的氨基酸残基为 39 个(Arg, Lys), 不稳定系数为 43.26, 亲水性平均数为 -0.303, 脂溶指数为 76.43, 使用 Signal P 4.1 server 预测信号肽, 结果显示, 曼氏无针乌贼 RXR 基因的 CDS 区核酸序列编码的蛋白不含有信号肽, 因此推测 RXR 编码蛋白属于非分泌型蛋白。使用 TMHMM 在线软件分析, *SjRXR* 基因的 CDS 区核酸序列翻译的蛋白质结构中无跨膜结构, 属于非跨膜蛋白。利用 SMART 数据库对结构域检测分析显示, *SjRXR* 基因的 CDS 区核酸序列编码的蛋白质包含 1 个 Holi 结构域以及一个低成分复杂

度区域(图 2); 使用 SWISS-MODEL 对 RXR 基因的 CDS 区编码的氨基酸序列进行三维结构预测。结果显示, *SjRXR* 基因的 CDS 区基因编码的蛋白三级结构由较多的 α 螺旋、少量 β 折叠和无规卷曲折叠而成, 利用 ExPASy 的 ProtScale 程序对蛋白进行疏水性分析(图 3), 亲水性部分大于疏水性部分, 可以预测蛋白为亲水性蛋白, 这也和核受体蛋白性质相一致。

2.2 曼氏无针乌贼 RXR 的 CDS 区基因的同源性分析

将曼氏无针乌贼 RXR 的 CDS 区核酸序列编

福寿螺(*Pomacea canaliculata*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、和加州海兔(*Aplysia californica*)的相似性分别为 56%、52%、43%、47%。

基于曼氏无针乌贼 RXR 的 CDS 区核酸序列编码的氨基酸序列, 利用 MEGA6 软件以 NJ 法构建了系统进化树(图 5)。可以看出, 曼氏无针乌贼

与加州双斑蛸亲缘关系最近, 它们同属于软体动物门头足纲, 最先聚为一支, 然后与盘扇贝属的虾夷盘扇贝聚在一起, 再与软体动物门双壳纲的紫贻贝、牡蛎科的美洲牡蛎聚在一起, 最后与长牡蛎聚为一支。该结果显示了曼氏无针乌贼 RXR 基因的分子进化地位与其生物学分类地位大体保持一致。

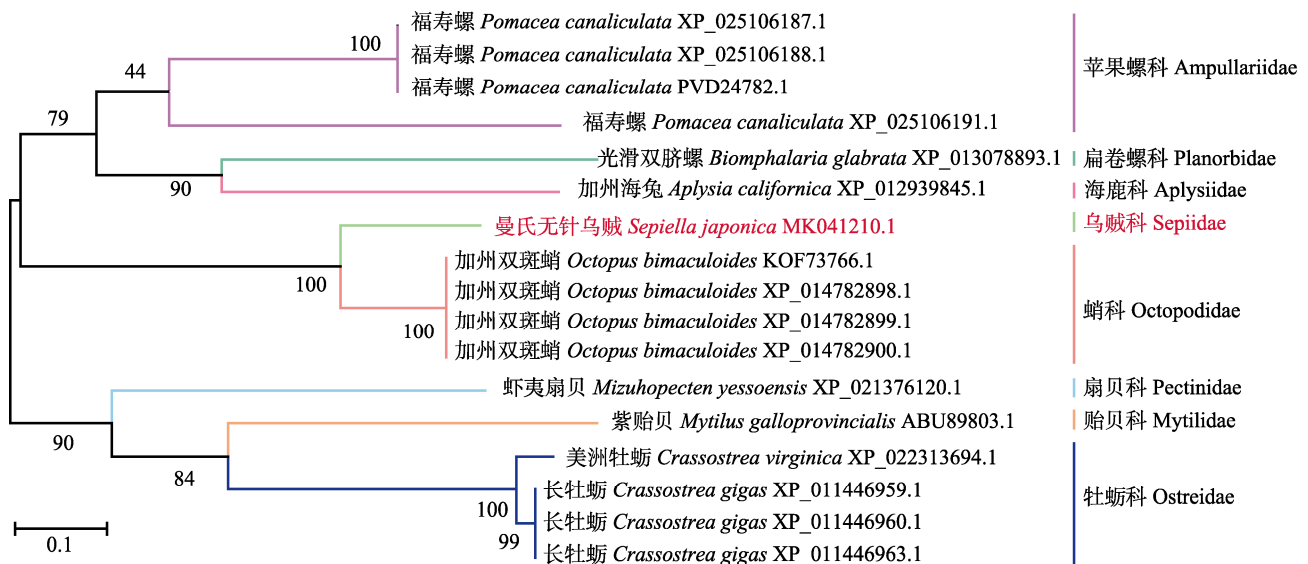


图 5 基于 RXR CDS 氨基酸序列构建的 ML 系统进化树

分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度; 标尺长度表示每个位点发生 0.1 次置换。

Fig. 5 NJ phylogenetic tree based on the RXR CDS sequences of different species

The bifurcation value represents the confidence obtained by repeating the sampling of 1000 times;

The ruler length represents 0.1 substitutions per site.

2.3 曼氏无针乌贼 RXR 基因在 4 个时期不同组织中的表达

荧光定量 PCR 检测 RXR 基因在曼氏无针乌贼的 4 个生长时期的表达情况, 结果表明, *SjRXR* 基因在各时期各组织中均有表达, 但在产卵中期视腺组织中表达量最高。如图 6 所示, 曼氏无针乌贼 RXR 在肌肉、胃和心脏中表达量较低, 在肠、表皮、鳃中表达量中等, 在脑、胰、肝、视叶和视腺中表达量较高。与性成熟前乌贼时期相比, *SjRXR* 基因表达量在性成熟后产卵前时期的鳃、胰、肝、脑出现了显著性差异($P<0.05$), 在视叶、视腺中出现了极显著性差异($P<0.01$)。在性成熟后产卵前时期到产卵中时期, 在脑中的表达量出现了下降($P<0.01$), 在胃($P<0.01$)、胰($P<0.05$)、视腺

($P<0.01$)中出现了上升趋势。在产卵中时期到产卵后濒死时期, 肌($P<0.05$)、肠($P<0.05$)、心($P<0.01$)、胰($P<0.01$)中表达量上升, 视叶($P<0.01$)和视腺($P<0.05$)中表达量降低($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 RXR 基因的 CDS 区核酸序列分析

核受体超家族具有调控胚胎的健康发育、内环境稳定以及保持生理稳态的作用^[3]。迄今为止, RXR 已经在大多数现存后生动物的基因组中被发现^[23-24], 一些代表性物种的 RXRs 的功能特性, 以及它们对有机锡(TBT)的内分泌干扰的敏感性受到了较多的关注^[25]。在软体动物中, RXR 的研究尚未得到关注, 本研究采用 RT-qPCR 技术克隆

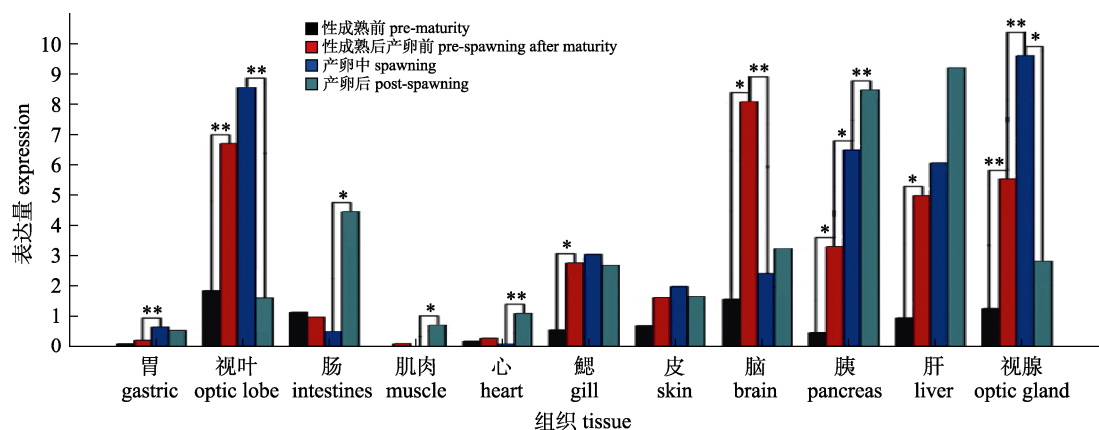


图 6 曼氏无针乌贼 *RXR* 基因在 4 个时期 11 个组织中的表达

*和**分别表示显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)差异。

Fig. 6 Expression of *SjRXR* gene in 11 tissues of *Sepiella Japonica* at four stages

* and ** indicate significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively.

了曼氏无针乌贼 *RXR* (*SjRXR*)基因的 CDS 区核酸序列, 推导出其氨基酸序列, 首次在头足类生物中克隆到 *RXR* 基因的 cDNA 序列。利用生物信息学技术和基因克隆技术对 *SjRXR* 基因的 CDS 区核酸序列编码的氨基酸序列进行分析, 采用多种参数和多种方法联合预测, 以提高预测的准确性。通过生物信息学分析、序列对比及构建系统进化树, 可以看出, 与曼氏无针乌贼亲缘关系最近的是加州双斑蛸(*O. bimaculoides*)。 *SjRXR* 基因的 CDS 核酸序列长为 1239 bp, 编码一个由 412 个氨基酸组成的蛋白质, 为亲水蛋白, 不存在信号肽, 为非分泌蛋白; 无跨膜结构, 为非跨膜蛋白。该研究为曼氏无针乌贼乃至其他头足类维甲酸 X 受体的进一步研究提供了重要的资料和参考依据。

3.2 *RXR* 的生物功能

RXR 在胃、视叶、肠、肌肉、心、鳃、表皮、脑、胰、肝和视腺各个组织中均有表达, 组织分布的广泛性表明这些组织都可能存在着 *RXR* 的目标基因, *RXR* 基因参与多种生理功能^[26]。在甲壳类动物中, *RXR* 在蜕皮, 渗透压调控, 酶活性调控中发挥着重要作用^[10]。*RXR* 具有促进细胞分化的功能^[27], 在曼氏无针乌贼性成熟前时期发育到性成熟时期的各组织中, *RXR* 基因普遍呈现出表达量上升的趋势, 说明 *RXR* 基因参与了曼氏无针乌贼生长发育的调控, 起正调控的作用。

在哺乳动物中, *RXR* 在心脏中参与心肌的生

长, 在胚胎期被敲除 *RXR* 基因的小鼠会由于心肌发育不完全而死亡^[28], 并且, 维甲酸 X 受体介导的氧化应激通路在大鼠肺细胞损伤中起到了调控作用, 增强抗氧化水平, 减轻氧化应激反应, 对肺组织有一定的保护作用^[29-30]。但在曼氏无针乌贼中, *RXR* 在心脏表达水平低, 这与水生动物鲈^[31]、中华绒螯蟹^[32]等表达情况相近。在脊椎动物中, 肝脏中 *RXR* 下游通路包括氧化还原、脂肪酸代谢和脂质转运等^[33]。在介导维甲酸调控脂代谢通路过程中, 肝脏 *RXR* 作为猪肝脏中的重要因子, 可影响脂肪前体细胞的分化^[34]。在曼氏无针乌贼的肝脏与胰中, *RXR* 基因在各个时期的表达量呈现递增的趋势, 这与日本沼虾、三疣梭子蟹等甲壳类动物中所观察到的有所差异, 在甲壳类动物中, 肝胰腺中 *RXR* 基因在蜕皮周期中有一个显著的表达变化, 在蜕皮的前中期呈现高表达与上升趋势, 蜕皮后期降低^[9]。

在曼氏无针乌贼脑中, *RXR* 基因从性成熟前时期到性成熟后产卵前时期表达量显著增加, 这可能是因为 *RXR* 会与 *RAR*、*LXR* 形成异源二聚体, 影响神经发育^[35], 从性成熟前时期到性成熟后产卵前时期是脑神经的主要发育时期, 所以表达量很高。

在产卵中时期, 性成熟的曼氏无针乌贼 *RXR* 基因在视腺中表达量最高, 说明视腺是起主导作用的调控器官。与脊椎动物中生殖调控轴(下丘

脑-垂体-性腺)类似,头足类中也存在着嗅叶-视腺-性腺轴^[36]。头足类的视腺组织类似于脊椎动物的垂体,控制性腺发育成熟,促进性腺细胞的分裂、卵黄的形成^[37]。促性腺激素释放激素(GnRH)是一种十肽结构的神经激素,被证明可刺激垂体释放促性腺激素等激素,控制着脊椎动物的繁育^[38]。有研究发现 GnRH 的启动子中存在着 RXR 的结合位点^[39],可以推测 RXR 与 GnRH 结合作用于动物的生殖功能。GnRH 在真蛸、商乌贼、枪乌贼等头足类中均有发现, GnRH 存在于曼氏无针乌贼食道神经团的垂直叶和亚垂直叶之间的神经纤维以及视腺和精巢中^[40],在产卵前与产卵中视腺、视叶组织 RXR 基因高表达,说明其很可能与 GnRH 共同作用,刺激视腺释放促性腺激素、卵泡刺激素、黄体生成素调控其性发育成熟和产卵行为。在软体动物海湾扇贝、杂色鲍中, RXR 在性腺发育的各个时期均有表达,并且在性腺发育增殖期表达量最高,说明软体动物 RXR 参与了性腺细胞增殖与分化,与脊椎动物类似,参与调节性腺的发育过程^[13]。当产卵后,视叶、视腺中的 RXR 基因显著降低,这可能与曼氏无针乌贼产卵后即死亡有所联系。

3.3 RXR 与细胞凋亡关系的推测

1972 年“细胞凋亡”首次被命名,是一种细胞死亡方式^[40],细胞凋亡是发生在多细胞生物体中的遗传受控的自主程序性死亡,异常的细胞凋亡对个体的生存不利。已有研究表明, RXR 基因与细胞衰亡相关,在哺乳动物中,诱导上调 RXR 基因可以保护小鼠脑细胞的凋亡^[41],对猪前体脂肪细胞具有抑制凋亡的作用^[42]。诱导 RXR 上调后, RXR 基因通过保护线粒体,保护 H/R 损伤的 H9c2 心肌细胞^[43],并介导抗氧化作用^[44],保护肝脏细胞,抑制其产生纤维化的肝脏^[45]。而在 LNCaP 细胞中, TR3 和 RXR 通过 TPA 和 3-CI-AHPC 的诱导作用,能够协同转达到线粒体,再通过 TR3 的诱导产生细胞凋亡^[46]。视腺、视叶是乌贼重要的调控器官,在产卵后视腺、视叶中 RXR 基因的表达显著降低,可能与细胞异常凋亡有关系,是乌贼产卵后快速死亡的一个重要影响因素。

参考文献:

- [1] Laptikhovsky V V, Arkhipkin A I, Hoving H J T. Reproductive biology in two species of deep-sea squids[J]. Marine Biology, 2007, 152(4): 981-990.
- [2] Chen K J. Aging China: Problems and countermeasures[M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2000: 129-149. [陈可冀. 老龄化中国: 问题与对策[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2000: 129-149.]
- [3] Vogeler S, Galloway T S, Lyons B P, et al. The nuclear receptor gene family in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* contains a novel subfamily group[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 1-15.
- [4] Li W, Wang S H, Wang Y L, et al. Research progress of retinoic acid X receptor in mollusks[J]. Chinese Journal of Zoology, 2013, 48(4): 655-664. [李维, 王淑红, 王艺磊, 等. 软体动物维甲酸 X 受体研究进展[J]. 动物学杂志, 2013, 48(4): 655-664.]
- [5] Mangelsdorf D J, Borgmeyer U, Heyman R A, et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid[J]. Genes & Development, 1992, 6(3): 329-344
- [6] Zhang Y, Qin Q, Zhou D J, et al. Advances in nuclear receptor superfamily and its coregulators[J]. Journal of Local Soluble Surgery, 2007, 16(1): 58-59. [张艳, 秦琴, 周度金, 等. 核受体超家族及其辅调节子的研究进展[J]. 局解手术学杂志, 2007, 16(1): 58-59.]
- [7] Durica D S, Wu X, Anilkumar G, et al. Characterization of crab EcR and RXR homologs and expression during limb regeneration and oocyte maturation[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2002, 189(1): 59-766.
- [8] Hopkins P M, Durica D, Washington T, et al. RXR isoforms and endogenous retinoids in the fiddler crab, *Uca pugilator*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 151(4): 602-614.
- [9] Asazuma H, Nagata S, Kono M, et al. Molecular cloning and expression analysis of ecdysone receptor and retinoid X receptor from the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 148(2): 139-150.
- [10] Liu F, Li J, Li J T, et al. Cloning and expression analysis of retinoic acid X receptor gene in *Exopalaemon carinicauda*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(4): 828-837. [柳飞, 李建, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)维甲酸 X 受体基因克隆及其在温盐胁迫和蜕皮周期中的表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(4): 828-837.]
- [11] Shang J. Expression analysis of RXR gene during ecdysis

- and ovary development in *Portunus trituberculatus*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2014. [汤洁. 三疣梭子蟹 RXR 基因在蜕皮和卵巢发育过程中的表达分析[D]. 宁波: 宁波大学, 2014.]
- [12] Mengeling B J, Murk A J, Furlow J D. Trialkyltin rexinoid-X receptor agonists selectively potentiate thyroid hormone induced programs of *Xenopus laevis* metamorphosis[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(7): 10-62.
- [13] Zhang R, Que H Y, Cong R H, et al. Cloning and expression analysis of retinoic acid receptor (RXR) cDNA in scallop (*Oryzoe alba*)[J]. *Marine Science*, 2016, 40(09): 1-8. [张瑞, 阙华勇, 丛日浩, 等. 海湾扇贝维甲酸受体(RXR) cDNA 克隆与表达分析[J]. *海洋科学*, 2016, 40(09): 1-8.]
- [14] Nishikawa J, Mamiya S, Kanayama T, et al. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods[J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(23): 6271-6276.
- [15] Bouton D, Escriva H, De Mendonca R, et al. A conserved retinoid X receptor (RXR) from the mollusk *Biomphalaria glabrata* transactivates transcription in the presence of retinoids[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005, 34(2): 567-582.
- [16] Castro L F C, Lima D, Machado A, et al. Imposex induction is mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod (*Nucella lapillus*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 85(1): 57-66.
- [17] Sternberg R M, Hotchkiss A K, Leblanc G A, et al. Synchronized expression of retinoid X receptor mRNA with reproductive tract recrudescence in an imposex-susceptible mollusc[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(4): 1345-1351.
- [18] Carter C J, Farrar N, Carlone R L, et al. Developmental expression of a molluscan RXR and evidence for its novel, nongenomic role in growth cone guidance[J]. *Developmental Biology*, 2010, 343(1/2): 124-137.
- [19] Xiao L P, Wang S H, Zou Z H, et al. Research progress on molecular mechanism of organotin-induced imposex in marine gastropods[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(3): 315-323.
- [20] Horiguchi T, Nishikawa T, Ohta Y, et al. Time course of expression of the retinoid X receptor gene and induction of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, exposed to triphenyltin chloride[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396(2): 597-607.
- [21] Urushitani H, Katsu Y, Kagechika H, et al. Characterization and comparison of transcriptional activities of the retinoid x receptors by various organotin compounds in three Prosobranch gastropods, *Thais clavigera*, *Nucella lapillus* and *Babylonia japonica*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 199(6): 103-115.
- [22] Wu Y T, Guo B Y, Qi P Z, et al. Cloning and expression analysis of Phb2 gene in Cuttlefish (*Cuttlefish*) mansonii at different growth stages[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(1): 9-17. [毋玉婷, 郭宝英, 祁鹏志, 等. 曼氏无针乌贼 Phb2 基因的克隆和其在不同生长阶段的表达分析[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(1): 9-17.]
- [23] Bridgham J T, Eick G N, Larroux C, et al. Protein evolution by molecular tinkering: Diversification of the nuclear receptor superfamily from a ligand-dependent ancestor[J]. *PLoS Boil*, 2010, 8, e1000497.
- [24] Novotny P, Chughtai A A, Kostrouchová M, et al. *Trichoplax adhaerens* reveals a network of nuclear receptors sensitive to 9-cis-retinoic acid at the base of metazoan evolution[J]. *PeerJ*, 2017, 5, 37-89.
- [25] Fonseca, E, Ruivo, R, Débora B, et al. Of retinoids and organotins: the evolution of the retinoid x receptor in metazoa[J]. *Biomolecules*, 2020, 594, 10(4).
- [26] Jones B B, Ohno C K, Allenby G, et al. A new retinoid X receptor subtypes in zebra fish (*Danio rerio*) differentially modulate transcription and do not bind 9-cis retinoic acid[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(10): 5226-5234.
- [27] Chai D J, Xu C S, Ning R B, et al. RXR agonists inhibit PKC activation against hyperglycemic rat vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2013, 29(02): 266-271. [柴大军, 许昌声, 宁若冰, 等. RXR 激动剂通过抑制 PKC 激活对抗高糖诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(02): 266-271.]
- [28] Sucov H M, Dyson E, Gumeringer C L, et al. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis[J]. *Genes & Development*, 1994, 8(9): 1007-1018.
- [29] Lou G Q, Gao H, Zhou Z L, et al. The effect of retinoic acid X receptor on oxidative stress response of rat alveolar II type epithelial cells induced by hypoxia/reoxygenation[C]//2019 Chinese Physiological Society Annual meeting and Zhang Xijun's research abstract of the 13 national young physiological workers' research conference. Chinese Physiological Society, 2019: 1. [楼国强, 高慧, 周卓琳, 等. 维甲酸 X 受体对缺氧/复氧诱导的大鼠肺泡 II 型上皮细胞氧化应激反应的调控作用[C]//2019 中国生理学会学术年会暨张锡钧基金第十五届全国青年优秀生理学学术论文交流会及第十三届全国青年生理学工作者学术会议论文摘要. 中国生理学会, 2019: 1.]

- [30] Xiang B Q, Yan W X, Lou G Q, et al. Regulating role of retinoic acid X receptor mediated oxidative stress pathway in rat lung ischemia/reperfusion injury[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2019, 71(2): 121-130. [项冰倩, 颜王鑫, 楼国强, 等. 维甲酸 X 受体介导的氧化应激通路在大鼠肺缺血/再灌注损伤中的调控作用[J]. *生理学报*, 2019, 71(2): 121-130.]
- [31] Tong C H, Qian Y X, Zheng W X, et al. Cloning and tissue expression of three retinol X receptor gene cDNA in perch[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(12): 1761-1769. [童彩环, 钱云霞, 郑伟贤, 等. 鲈三种视黄醇类 X 受体基因 cDNA 的克隆和组织表达[J]. *水产学报*, 2011, 35(12): 1761-1769.]
- [32] Wang Y, Yang Z G, Guo Z H, et al. Cloning and expression analysis of full-length cDNA of RXR gene in *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(12): 1761-1769. [王瑶, 杨志刚, 郭子好, 等. 中华绒螯蟹 RXR 基因全长 cDNA 克隆及表达分析[J]. *水产学报*, 2013, 37(12): 1761-1769.]
- [33] Zhan Q, Nie Y Q, Li Y Y, et al. Genomic target analysis of hepatic isotretinoin receptor α regulating lipid metabolism pathway[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2015, 36(2): 178-181. [詹琪, 聂玉强, 李瑜元, 等. 肝脏异维甲酸受体 α 调控脂代谢通路的基因组靶点分析[J]. *广东医学*, 2015, 36(2): 178-181.]
- [34] Lin Y Q, Zhuang H L, Yang G S, et al. Retinoic acid X receptor α promotes differentiation of porcine precursor adipocytes Chinese[J]. *China Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 25(3): 264-269. [林亚秋, 庄和林, 杨公社, 等. 视黄酸 X 受体 α 促进猪前体脂肪细胞分化[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(3): 264-269.]
- [35] Simandi Z, Horvath A, Cuaranta-Monroy I, et al. RXR heterodimers orchestrate transcriptional control of neurogenesis and cell fate specification[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017: 471.
- [36] Minakata H, Shigeno S, Kano N, et al. Octopus gonadotrophin-releasing hormone: a multifunctional peptide in the endocrine and nervous systems of the Cephalopod[J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2009, 21: 322-326.
- [37] Wells M J, Odor R K, Buckley S K L, et al. An in vitro bioassay for a molluscan gonadotropin[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1975, 62: 433-446
- [38] Krieger D T, Perlow M J, Gibson M J, et al. Braing rafts reverse hypogona dismod gonadotropin releasing hormone efficiency[J]. *Nature*, 1982, 298: 468-471.
- [39] Zhou X S, Wang X B, Song H Y, et al. Molecular cloning and bioinformatics analysis of three gonadotropin-releasing hormone genes in *Scorpena huxii*[J]. *Journal of Ocean University of China (Natural Science Edition)*, 2012, 42(10): 58-64. [周晓苏, 王旭波, 宋华玉, 等. 许氏平鲈三种促性腺激素释放激素基因的启动子克隆及生物信息学分析[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2012, 42(10): 58-64.]
- [40] Yu X X. Brain structure and immunohistochemical localization of gonadotropin-releasing hormone in *Sepiella maindroni*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2011. [于新秀. 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)脑结构及促性腺激素释放激素免疫组织化学定位研究[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2011.]
- [41] Liu J, Dong Z. Effects of curcumin on the expression of apolipoprotein E, retinoid X receptor and hepatic X receptor in focal cerebral ischemia reperfusion rats[J]. *Pharmacology and Clinics of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 30(5): 29-32. [刘洁, 董志. 姜黄素对大鼠局灶性脑缺血再灌注载脂蛋白 E 及类视黄醇 X 受体、肝 X 受体表达的影响[J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(5): 29-32.]
- [42] Lin Y Q, Zhuang H L, Yang G S, et al. Effects of retinoic acid X receptor α (RXR α) on apoptosis of porcine adipocytes[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2009, 17(3): 419-425. [林亚秋, 庄和林, 杨公社, 等. 维甲酸 X 受体 α (RXR α)对猪前体脂肪细胞凋亡的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(3): 419-425.]
- [43] Shan P R, Xu W W, Huang Z Q, et al. Protective role of retinoid X receptor in H9c2 cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury in rats[J]. *World Journal of Emergency Medicine*, 2014, 5(2): 122.
- [44] Lin X Y, Lin Q P, Xu C S, et al. Atorvastatin inhibits the formation of atherosclerosis in diabetic ApoE mice fed with high fat by RXR α -mediated antioxidant stress[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2014, 30(09): 1537-1545. [林晓燕, 林秋平, 许昌声, 等. 阿托伐他汀通过 RXR α 介导的抗氧化应激效应抑制高脂喂养糖尿病 ApoE 小鼠动脉粥样硬化的形成[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(09): 1537-1545.]
- [45] Xu J P, Wang Z, Wu Z Y, et al. Effects of RXR- α gene transfection on liver fibrosis in rats[J]. *Gastroenterol*, 2010, 15(07): 390-394. [徐嘉鹏, 王争, 吴志勇, 等. 体内转染 RXR- α 基因对大鼠肝纤维化的影响[J]. *胃肠病学*, 2010, 15(07): 390-394.]
- [46] Li H, Kolluri S K, Gu J, et al. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3[J]. *Science*, 2000, 289: 1159-1164.

Cloning of the *sjRXR* gene and analysis of its distribution in developmental stages of *Sepiella japonica*

DONG Zhenyu^{1,2}, YANG Huai^{1,2}, GUO Baoying^{1,2}, YE Yingying^{1,2}, QI Pengzhi^{1,2}, CHI Changfeng^{1,2}, XU Kaida^{3,4}

1. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhoushan 316022, China;

3. Marine Fishery Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China;

4. Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources for Key Fishing Grounds, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Sustainable Utilization of Technology Research for Fisheries Resources of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China

Abstract: Retinoid X receptor (RXR) belongs to the family of nuclear receptors activated by ligands. In this study, the cDNA sequence of the *Sepiella japonica* *RXR* gene was cloned using RT-qPCR; bioinformatics analysis was conducted on the sequence of nucleotide and protein structure in the CDS region of the *RXR* gene. The results showed that the CDS-domain nucleotide sequence of *SjRXR* was 1239 bp, encoding a protein composed of 412 amino acids. Moreover, the sequence analysis showed that the CDS region of the *S. japonica* *RXR* gene did not contain a signal peptide, possibly indicating that the *RXR* encoding protein was a non-secretory protein. There is no transmembrane structure in the protein structure, making it a non-transmembrane protein. Hydrophobicity analysis shows that the protein is more hydrophilic than hydrophobic. It also contains a domain of the HOL1 family. The phylogenetic tree was constructed using the MEGA6 software employing the ML method. *S. japonica* is closely related to *Octopus bimaculatus*, which belongs to the phylum Cephalopoda, gathered into one branch. Thus the molecular evolutionary status of the *RXR* gene of *S. japonica* is consistent with its biological classification status. RT-qPCR was also used to analyze the expression characteristics of this gene in eleven tissues of *S. japonica* during four growth periods. The *sjRXR* gene was expressed in all tissues, and it was highly expressed in the liver, pancreas, brain, visual lobe, and visual gland. The *sjRXR* expression changed significantly during the four growth stages, increased in the liver, pancreas, brain, optic lobe, and optic gland, but was followed by a decreasing trend in the brain, optic lobe, and optic gland. These results speculate that *SjRXR* regulates *S. japonica* neurodevelopment, reproduction, and aging as an essential factor and provide a vital reference base for in-depth study of the *RXR* gene in cephalopods.

Key words: *Sepiella japonica*; RXR; reproduction; expression analysis

Corresponding author: GUO Baoying. E-mail: guobaobao2000@126.com