

中华绒螯蟹 Rheb 编码序列的克隆及表达分析

田志环, 焦传珍

韶关学院生物与农业学院, 广东 韶关 512005

摘要: Rheb (Ras homologue enriched in brain, 脑中富集的 Ras 同源物)是 mTOR (mammalian or mechanistic target of rapamycin, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)信号通路上游重要的调控因子。为探究 Rheb 通过 mTOR 信号通路调控中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)生长发育和营养代谢的作用, 本研究采用 RT-PCR 克隆了中华绒螯蟹 Rheb (EsRheb)的 cDNA 编码序列, 并用生物信息学方法分析了其序列和结构特征, 用反转录荧光定量 PCR 检测了 EsRheb mRNA 的组织分布及饥饿和摘除眼柄对 EsRheb 转录水平的影响。结果显示 EsRheb 含 182 个氨基酸, 其氨基酸序列、保守结构域、功能位点与其他不同生物的 Rheb 非常相似, 三维结构和人 Rheb 高度一致。EsRheb 的 mRNA 在中华绒螯蟹肝胰腺、胃、心肌、螯足肌肉和 Y 器中表达较高, 在眼柄中表达最低。饥饿处理显著降低螯足肌肉 EsRheb 的转录表达水平, 对肝胰腺 EsRheb 的转录表达影响不显著; 摘除眼柄显著提高 EsRheb 在 Y 器和螯足肌肉中的转录表达水平。该结果为进一步阐明 Rheb 参与中华绒螯蟹 mTOR 介导的生长发育和营养代谢调控奠定了基础。

关键词: 中华绒螯蟹; Rheb; mTOR; 饥饿; 眼柄

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)12-1432-09

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)又称河蟹、大闸蟹, 属节肢动物门(Arthropoda)甲壳纲(Crustacea)十足目(Decapoda), 因其营养丰富、味道鲜美而备受欢迎。中华绒螯蟹是我国重要的经济养殖品种, 也是研究甲壳动物的重要模式生物, 研究其生长发育和营养代谢的调控对于生产实践和理论研究都有重要意义。Rheb (Ras homologue enriched in brain)是一种小型的 GTP 酶, 属于 Ras 超家族, 它是 mTOR (mammalian or mechanistic target of rapamycin)信号通路上游重要的正调控因子^[1]。mTOR 是进化上非常保守的丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)激酶, 存在 mTORC1 (mTOR complex 1)和 mTORC2 (mTOR complex 2)两种复合物^[2-3], 其中 mTORC1 整合生长因子(如胰岛素)、营养物质(氨基酸)、环境胁迫等各种信号, 在调节细胞生

长、分化、自噬和营养代谢中起重要作用^[4]。Rheb 受生长因子或营养物质的刺激, 发挥分子开关的作用, 由 Rheb-GDP 转变为 Rheb-GTP, 激活 mTORC1 使其发挥蛋白质激酶作用, 磷酸化下游的 4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1)和 S6K (ribosomal protein S6 kinase), 从而启动蛋白质合成^[5]。哺乳动物中 *Rheb* 基因已有较多研究, 小鼠 *Rheb1* 可通过促进 mTORC1 信号通路和抑制 AMPK 信号通路促进胰腺组织 β 细胞的增殖^[6], 可通过 mTOR 信号通路调控巨核-红系多能性干细胞发育^[7], 还可以通过 mTORC1 调控 DRP1 蛋白的降解, 进而调节线粒体形态的周期性变化, 起到偶联昼夜节律和细胞代谢的“桥梁”作用^[8]。

甲壳动物的生长发育和蜕壳密切相关, 其蜕

收稿日期: 2024-06-24; 修订日期: 2024-09-10.

基金项目: 广东省驻镇帮扶农村科技特派员项目(KTP20210401); 韶关学院重点科研项目(432-99000440); 韶关学院博士引进项目(432-99000622).

作者简介: 田志环(1971-), 博士, 教授, 研究方向为甲壳动物生长发育. E-mail: tianzihuan@126.com

通信作者: 焦传珍, 博士, 教授, 研究方向为生物化学与分子生物学. E-mail: jcztsgu.edu.cn

壳激素的生物合成依赖 mTOR 信号通路^[9]。在黑背陆地蟹(*Gecarcinus lateralis*)蜕壳前的中晚期, mTOR 信号通路成员如 mTOR、Akt、EF2 和 S6K 表达显著上调以维持蜕皮激素的浓度^[10-11]。在调控生长和代谢方面, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肌肉组织中包括 *Rheb* 在内的 mTOR 信号通路成员 Akt、slc3a2、S6K 和 TOR 在亮氨酸刺激下其 mRNA 表达量显著增加^[12], 中华绒螯蟹 mTOR 信号通路下游的 *S6K1* mRNA 表达量在蜕壳诱导的肌肉生长中也显著增加^[13]。然而, 对甲壳动物 mTOR 信号通路上游调控因子 *Rheb* 的研究相对较少, 目前仅凡纳滨对虾这一物种有所报道^[14]。本研究克隆了中华绒螯蟹 *Rheb* 的编码序列, 将其编码的蛋白命名为 EsRheb, 对其保守结构域、功能位点、三维结构进行了生物信息学分析, 并检测了 EsRheb 转录产物的组织分布及饥饿和摘除眼柄对 EsRheb 在不同组织中转录表达的影响, 为进一步研究 *Rheb-mTOR* 信号通路参与调节甲壳动物的生长和营养代谢提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

中华绒螯蟹幼蟹购自江苏固城, 体重(10.95±2.25) g。暂养于实验室 30 cm×60 cm×45 cm 的玻璃水族箱内, 自然光照, 水温(25±1) °C。每天更换曝气 3 d 的自来水并投喂商品饲料。待螃蟹适应实验室条件 1 周后, 随机取 3 只中华绒螯蟹, 分别取其肝胰腺、胃、肠、眼柄、Y 器、心脏、鳃放于-80 °C 冰箱待测。剩余螃蟹分为两大组, 第 1 大组做饥饿处理, 分 3 个平行组饲养, 每个平行组每天只换水不投喂, 于第 7 天、14 天随机取 3 只螃蟹, 分别取其鳌足肌肉和肝胰腺组织放入-80 °C 冰箱待测; 第 2 大组做眼柄摘除处理, 具体方法如下: 用剪刀在右侧眼柄基部剪断, 用烧红的镊子灼烫伤口消毒后, 将螃蟹放回玻璃缸中, 同样分 3 个平行组饲养, 每个平行组和对照组同样正常换水、投喂。于摘除眼柄后的第 1 天、2 天、3 天、5 天、7 天, 随机取 3 只螃蟹, 分别取鳌足肌肉和 Y 器, 放入天-80 °C 度冰箱待测。(其中因为 Y 器较小, 3 只螃蟹的 Y 器为一组样本, 3 组样

本共 9 只螃蟹)。

1.2 编码中华绒螯蟹 *Rheb* 因子的 cDNA 克隆

取中华绒螯蟹肌肉组织, 采用 Trizol 法提取总 RNA; 采用 Fermentas 公司的反转录试剂盒合成 cDNA 第一链作为 PCR 的模板。根据 NCBI 公共数据库的中华绒螯蟹 TSA (transcriptome shotgun assembly) 序列(accession: GFBK01021924.1)设计引物(表 1), 进行 PCR 反应, 获得中华绒螯蟹 *Rheb* cDNA 序列。PCR 反应加样体系: cDNA 模板 5 μL, 上下游引物(10×)各 1.5 μL, Ex taq (Takara) 1.0 μL, dNTP Mix (10 mmol/L) 1.0 μL, 2×Ex tag Buffer (TaKaRa) 25 μL, 加入去离子水至总体积 50 μL。PCR 反应条件设置为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 40 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将含有目的基因的琼脂糖凝胶切下回收, 连接转化至 pMD-18 Vector 载体, 筛选阳性克隆后送上海生工生物工程有限公司测序。

表 1 中华绒螯蟹 *Rheb* cDNA 扩增引物

Tab. 1 The primers for *Eriocheir sinensis* *Rheb* cDNA amplification

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	应用 application
EsRheb-F1	CTTATGGACCAGTGAGCC	RT-PCR
EsRheb-R1	TCTGGCTATATCACAGAG	RT-PCR
EsRheb-F2	GTCATCTCTGCATCCAGTTT	qRT-PCR
EsRheb-R2	CCTCGCACCTTGAGTTCTT	qRT-PCR
27S-F	GGTCGATGACAATGGCAAGA	qRT-PCR
27S-R	CCACAGTACTGGCGGTCAA	qRT-PCR

1.3 中华绒螯蟹 *Rheb* 生物信息学分析

序列相似性搜索和分析使用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>); 开放阅读框预测及蛋白质序列转换使用 NCBI 网站的 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 和 Expas 的翻译工具(<http://web.expasy.org/translate/>); 结构域预测使用 NCBI 网站上的 CD-search^[15] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 蛋白质结构建模和分析利用同源建模工具 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive>) 和 Pymol 软件(<https://pymol.org/>)。

多序列比对和系统发育树构建使用 MEGA7.0 上的 Clustal 序列比对工具和邻接法发育树构建工具进行 1000 次自展检验(bootstrap)评估进化树分支可信度^[16]。

1.4 中华绒螯蟹 *Rheb* 的表达特征

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *EsRheb* mRNA 在不同组织的表达情况以及眼柄摘除和饥饿处理对其表达的影响。用于 qRT-PCR 的特异引物和内参引物分别根据中华绒螯蟹 *EsRheb* 编码序列和 27SRNA 序列设计(表 1)。利用 QuantStudio 3 (ABI) 荧光定量仪的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法检测中华绒螯蟹 *Rheb* mRNA 的相对表达量, 反应程序设置为 95 °C 3 min, 95 °C 5 s, 60 °C 15 s, 95 °C 15 s; 然后重复 95 °C 5 s, 60 °C 15 s, 共 40 个循环; 熔解曲线从 65 °C 上升至 99 °C, 梯度为 0.5 °C/read。实时定量 PCR 均进行 3 次技术重复。

1.5 数据分析

利用 SPSS 18.0 软件中的单因素方差分析, 差异显著性以 $P < 0.05$ 为标准, 数据结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 中华绒螯蟹 *Rheb* 序列分析

本研究克隆到的编码中华绒螯蟹 *Rheb* 的 cDNA 全长为 606 nt (图 1), 其中核苷酸 37~585 位开放阅读框(ORF)编码 182 个氨基酸。cDNA 序列的其余部分为 *EsRheb* mRNA 的非翻译区。以 *EsRheb* cDNA 编码的氨基酸序列作为查询项, 用 NCBI 网站上的 Smart BLAST 搜索得到的相似性分值最高的返回序列是果蝇(*Drosophila melanogaster*) *Rheb* 蛋白(查询号 NP_730950.2)。实验所得序列已提交到 GenBank, 核酸和编码蛋白的查询号分别为 PP860494.1 和 XBK48587。

利用 CD-search 工具在数据库 NCBI-Curated

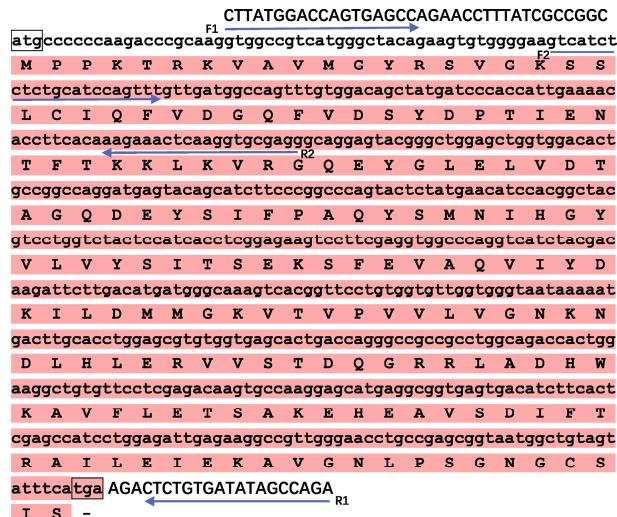


图 1 中华绒螯蟹 *Rheb* cDNA 序列及编码的氨基酸序列

atg 为起始密码子, tga 为终止密码子, 箭头标出的是 cDNA 克隆和 qRT-PCR 所用引物的位置和方向.

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequences of *EsRheb* of *Eriocheir sinensis*

atg is the start codon and tga is the stop codon, the arrows indicate the position and direction of the primers used for cloning and qRT-PCR.

进行保守域搜索(操作时间 2024.6.7), 结果如图 2 所示。中华绒螯蟹 *Rheb* 的 6~182 氨基酸区域是 *Rheb* 保守域家族(编号 cd04137), 其重要功能位点/保守基序包括 GTP/Mg²⁺结合位点(14~21, 30~31, 34, 37, 62, 118~119, 121~122, 148~149), 脂质修饰位点(179~182), GEFs (Guanine nucleotide exchange factors)互作位点(19~20, 34, 36, 42~43, 56, 57, 59, 61~62, 150), GDI (GDP dissociation inhibitors)互作位点(13~14, 61~62), 效应因子 RalGDS (Ral Guanine nucleotide dissociation stimulator)互作位点(35, 36, 40~43), Switch I 区(35~42), Switch II 区(61~79), G1 box (即 Walker A motif, 12~19), G2 box (37), G3 box (59~62), G4 box (118~121), G5 box (148~150)。

以 AlphaFold v2 方法预测的榄绿青蟹(*Scylla olivacea*) *Rheb* 结构坐标数据(alphafold database 编号

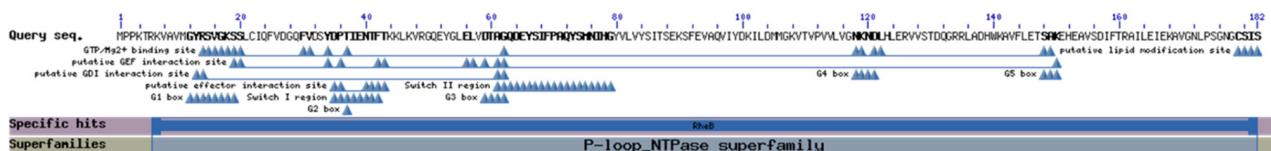


图 2 中华绒螯蟹 *Rheb* 蛋白保守域和功能位点

Fig. 2 Conserved domains and putative functional sites of *EsRheb* of *Eriocheir sinensis*

AOAOP4WH70.1.A)为模板,用 swiss-model 模拟工具得出中华绒螯蟹 Rheb 的结构模型如图 3a 所示。将 EsRheb 的结构模型与 X 射线衍射技术解析的人 Rheb-NR1 [4-bromo-6-(3,4-dichlorophenylthio)-1-(4-(dimethylcarbamoyl)benzyl)-1H-indole-2-carboxylic acid, PDB 编号 6bsx.1] 晶体结构进行叠加,二者几乎完全重叠(图 3b)。

2.2 不同生物的 Rheb 比较与系统发育树分析

选取演化地位各异的生物类群代表物种,以中华绒螯蟹 Rheb 作为查询项用 Blast 搜索同源序列,以获得的最为相似序列作为查询项搜索 SWISS-PROT 蛋白质数据库,鉴定是否为 Rheb 直系同源物,结果如表 2 所示。

表 2 基于 Blast 的中华绒螯蟹 Rheb 与不同生物 Rheb 的相似度
Tab. 2 Similarity comparison of EsRheb with Rheb from different taxa by Blast

物种名 species name	最大分值 max score	覆盖度/% query cover	E 值 E value	一致度/% Per. Ident	序列长度 Acc.Len	查询号 accession
智人 <i>Homo sapiens</i>	251	99	6.00E-85	65.03	184	NP_005605.1
菲律宾鼯猴 <i>Cynocephalus volans</i>	251	99	9.00E-86	65.03	184	XP_062956341.1
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	251	99	3.00E-85	65.03	184	NP_444305.2
大杜鹃 <i>Cuculus canorus</i>	254	99	5.00E-87	65.57	184	XP_009556600.1
撒丁雨蛙 <i>Hyla sarda</i>	246	99	6.00E-84	63.39	184	XP_056375601.1
原鳍鱼 <i>Protopterus annectens</i>	264	95	4.00E-91	72.00	184	XP_043939716.1
欧洲文昌鱼 <i>Branchiostoma lanceolatum</i>	255	98	1.00E-87	65.00	183	CAH1229605.1
灯泡海鞘 <i>Clavelina lepadiformis</i>	258	99	3.00E-89	64.64	183	CAK8687775.1
仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	230	91	3.00E-78	65.66	178	PIK43080.1
海星 <i>Sterias rubens</i>	229	91	1.00E-77	63.47	185	XP_033625362.1
欧文虫 <i>Owenia fusiformis</i>	272	100	2.00E-94	68.13	182	CAH1774143.1
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	362	100	1.00E-129	95.60	182	XP_063878927.1
小龙虾 <i>Procambarus clarkii</i>	337	100	9.00E-120	89.01	182	XP_045613414.1
双斑蟋 <i>Gryllus bimaculatus</i>	287	100	1.00E-100	72.53	182	GLH10476.1
长须罗蛉 <i>Lutzomyia longipalpis</i>	259	100	1.00E-89	67.03	182	XP_055695580.1
纹藤壶 <i>Amphibalanus amphitrite</i>	262	99	2.00E-90	64.09	182	XP_043247181.1
巨纵沟纽虫 <i>Lineus longissimus</i>	256	100	4.00E-88	64.84	181	XP_064644094.1
萼形柱珊瑚 <i>Stylophora pistillata</i>	243	98	6.00E-83	64.29	185	XP_022782693.1
栉水母 <i>Bolinopsis microptera</i>	181	93	2.00E-58	50.29	189	XP_063674023.1
丝盘虫 <i>Trichoplax</i> sp. H2	218	97	1.00E-73	56.50	185	RDD45281.1
面包屑海绵 <i>Halichondria panicea</i>	231	99	2.00E-78	59.67	181	XP_064397002.1
领鞭虫 <i>Salpingoeca rosetta</i>	137	95	3.00E-41	43.26	186	XP_004997693.1*
蟠丝球虫 <i>Capsaspora owczarzaki</i>	196	98	1.00E-64	52.17	186	XP_004343532.2
中黏菌 <i>Sphaeroforma arctica</i>	135	89	8.00E-41	42.94	185	XP_014148669.1*
肺孢子菌 <i>Pneumocystis wakefieldiae</i>	215	99	6.00E-69	56.28	185	QSL65239.1
变形虫 <i>Acystostelium subglobosum</i>	193	98	1.00E-62	49.72	184	XP_012757648.1

注: *标记的为 rap1B 同源物。

Note: * labels rap1B homologues.

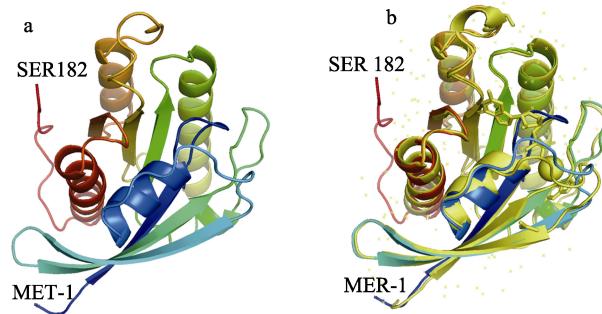


图 3 中华绒螯蟹 Rheb 三维结构及与

人 Rheb 晶体结构比较

- a. 中华绒螯蟹 Rheb 模拟结构; b. 中华绒螯蟹 Rheb 与人 Rheb 晶体结构(黄色链)叠加。

Fig. 3 The three-dimensional structure of *Eriocheir Sinensis*

EsRheb and its comparison with human Rheb crystal structure

- a. Simulation structure of EsRheb; b. Superposition of EsRheb and human Rheb crystal structure (yellow chain).

由表 2 可以看出, 在蟠丝球虫(*Capsaspora owczarzaki*)、肺孢子菌(*Pneumocystis wakefieldiae*)和变形虫(*Acytostelium subglobosum*)等单细胞生物中都有 Rheb 的存在。但在演化上最接近多细胞动物的领鞭毛虫(*Choanoflagellida*)及其姐妹群黏菌门(*Ichthyosporea*)生物中却没有发现 Rheb, 最

为相似的是 Rap1B (Ras-related protein Rap-1b)同源蛋白。另外, EsRheb 与栉水母动物(*Bolinopsis microptera*) Rheb 的相似性低于海绵动物(*Halichondria panicea*)、真菌、蟠丝球虫。选取 14 个代表性物种的 Rheb 序列与 EsRheb 进行系统发生树分析, 结果显示 EsRheb 与节肢动物的 Rheb 聚成一群(图 4)。

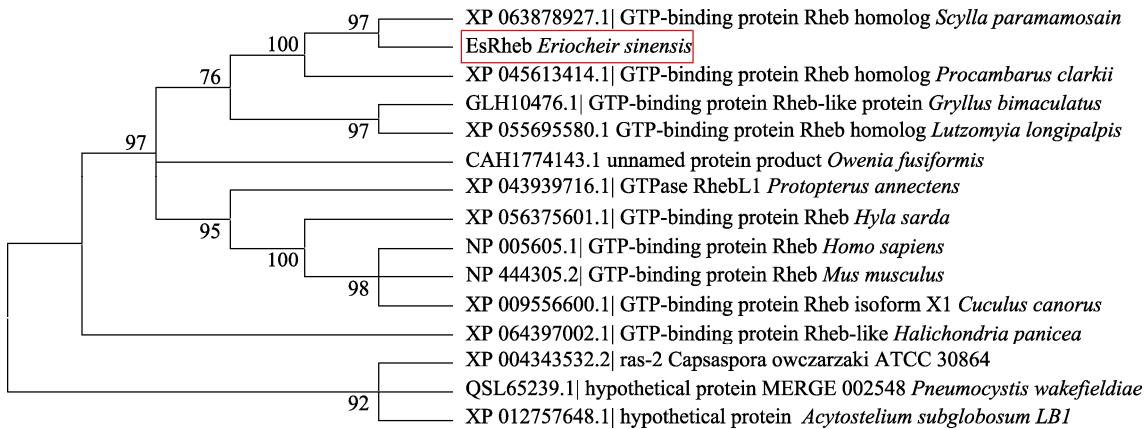


图 4 Rheb 系统发育分析

物种名称和序列参考表 2.

Fig. 4 Evolutionary relationships of Rheb

Animal names and sequences refer to Tab. 2.

2.3 中华绒螯蟹 *Rheb* mRNA 的组织表达及饥饿、摘除眼柄对其表达的影响

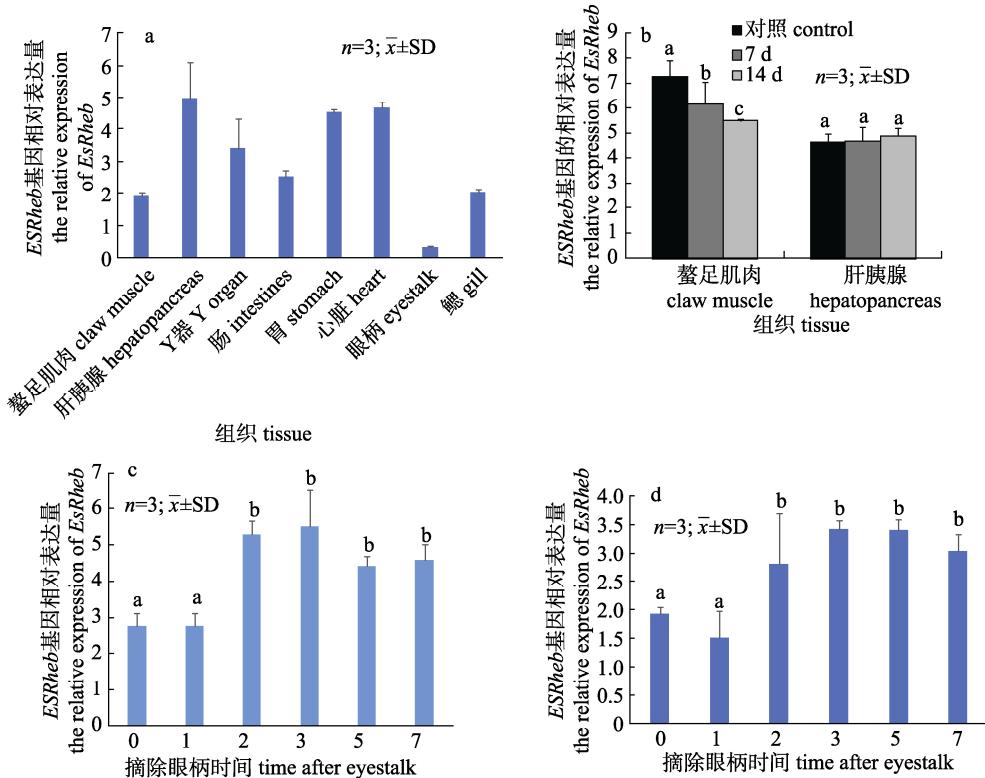
实时定量荧光 PCR 检测表明, 中华绒螯蟹 *Rheb* mRNA 表达较高的 3 种组织为肝胰腺、胃和心脏, 其次为 Y 器; 表达量最低的为眼柄(图 5a)。饥饿处理的第 7 天和 14 天, *Rheb* 基因在鳌足肌肉组织的表达量与对照组相比显著降低, 在肝胰腺中的表达量和对照组没有统计学差异(图 5b)。摘除单侧眼柄对中华绒螯蟹 *Rheb* 转录水平的影响如图 5c、5d 所示。Y 器中 *Rheb* mRNA 表达量在第 2 天显著升高, 第 5 天开始有所下降, 但仍显著高于对照组(图 5c)。鳌足肌肉组织中 *Rheb* mRNA 表达量从第 2 天显著升高, 一直持续到第 7 天实验结束(图 5d)。

3 讨论

鉴于 *Rheb* 介导的 mTOR 信号通路在调节生物的代谢、生长和发育过程中的重要性, 本研究克隆了中华绒螯蟹 *Rheb* 的编码 cDNA, 作为进一步研究其功能的基础。克隆得到的 cDNA 所编码

的氨基酸序列与 GenBank 中计算机自动注释的序列(XP_050735195.1)有 1 个氨基酸(170V/D)的差异, 与其他研究组提交的序列(WWE43162.1)有 5 个连续的氨基酸不同(170~174), 其原因是动物单核苷酸多态性还是可变剪接, 抑或是测序错误需要进一步证实。

对编码中华绒螯蟹 *Rheb* 的氨基酸序列进行保守域预测, 获得了其保守域和功能位点的丰富信息。*EsRheb* 的 6~182 氨基酸区域是 *Rheb* 保守域家族, 属于小型 GTP 酶。同时这部分区域也属于 P-loop_NTPase 保守域超家族(cl38936), 该家族的特点是含有核苷酸结合基序 Walker A 基序(GxxxxGK[S/T], x 是任何氨基酸)和 Walker B 基序(hhhh[D/E], h 是疏水氨基酸)。*EsRheb* 的 switch I (35~42)、Switch II 区(61~79)是高度保守序列, 是使 *Rheb* 与 TOR 的相互接触的主要区域, 具有依赖 GTP 的构象^[1]。另外, 中华绒螯蟹 *Rheb* 预测有 5 个保守的 G boxes 基序, 他们与 GTP 的结合及 GTPase 的活性有关^[17]。这些信息为实验室设计“湿”实验研究其功能提供了重要依据。将中华绒

图 5 中华绒螯蟹 *Rheb* mRNA 的表达特征

- a. 中华绒螯蟹 *Rheb* 在不同组织中的相对表达量; b. 饥饿处理, 蟹足肌肉和肝胰腺中华绒螯蟹 *Rheb* 的相对表达量; c. 摘除眼柄后 Y 器中华绒螯蟹 *Rheb* 的相对表达量; d. 摘除眼柄后蟹足肌肉中华绒螯蟹 *Rheb* 的相对表达量。不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 Expression profile of *EsRheb* mRNA of *Eriocheir sinensis*

a. The relative expression of *EsRheb* in different tissues; b. the relative expression of *EsRheb* respond to starvation in hepatopancreas and claw muscles; c. the relative expression of *EsRheb* respond to eyestalk ablation in Y organ; d. the relative expression of *EsRheb* respond to eyestalk ablation in claw muscles. The different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

螯蟹 *Rheb* 的三维结构与 X 射线晶体衍射技术获得的人 *Rheb-NR1* 抑制剂复合物结构^[18-20]进行比较, 从叠加图可以看出肽链骨架走向基本一致, 说明 *Rheb* 三维结构非常保守。这种物种间的序列和结构保守性为研究不同生物 *Rheb* 的功能及开发以 *Rheb* 为靶点的药物提供了非常有用的借鉴。

单细胞生物到多细胞真后生动物的演化是一个备受关注的科学问题^[21]。本研究用中华绒螯蟹 *Rheb* 查询项(query)和结果项(hit)进行双向 blast^[22], 从单细胞真核生物变形虫到现代人类, 在广泛的不同演化地位的生物类群的代表性物种中鉴定了对应的 *Rheb*。在演化地位较早的螺旋虫纲、真菌和管柄菌属生物中都发现有 *Rheb* 的存在, 说明 *Rheb* 在动物界演化的开始即存在。但在演化上最接近多细胞动物的领鞭毛虫类以及姐妹群中粘

菌门生物中却没有发现 *Rheb*, 最相近的是和 *Rheb* 同属于 Ras 超家族的 Rap1B 同源蛋白。*Rheb* 在领鞭毛虫和中黏菌门生物中的缺失是一个令人迷惑的问题, 值得进一步探究。另外, 中华绒螯蟹 *Rheb* 与栉水母动物 *Rheb* 的相似性低于海绵动物, 这和最近研究结论栉水母动物而不是海绵动物是真后生动物的姊妹群相一致^[23]。但令人意外的是, 中华绒螯蟹 *Rheb* 与栉水母动物 *Rheb* 的相似性也低于真菌、螺旋虫等单细胞生物, 其原因也需要进一步探究。总之, 对 *Rheb* 这种保守基因及相关信号通路的跨物种比较分析, 一方面可以深入理解演化背景下结构和功能的关系, 另一方面也为生物演化的研究提供线索。

脊椎动物中, *Rheb* 基因主要在骨骼肌、心肌、睾丸和卵巢中大量表达^[24]。本实验检测到 *Rheb*

在中华绒螯蟹幼蟹的消化器官(肝胰腺、胃)、心肌、骨骼肌(螯足肌肉)和 Y 器(内分泌器官)中表达量较高, 推测和幼体生长快, 有较强的新陈代谢水平有关。

甲壳动物生长过程中, 往往会因为蜕壳、环境变化等原因遭遇饥饿的情况。饥饿能够抑制 mTOR 信号通路, 显著下调罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)肌肉组织中 TOR 及其下游基因的转录表达^[25], 而亮氨酸则能显著上调包括 Rheb 在内的 mTOR 信号通路关键基因的转录表达^[12]。本实验观察到, 在饥饿处理的第 7 天和 14 天, 中华绒螯蟹螯足肌肉组织中 Rheb 在转录水平显著低于对照组。而肝胰腺是甲壳动物重要的消化器官, 储存了大量的脂类和糖元。在饥饿状态下, 这些储存的脂类和糖原可被分解利用, 以满足动物基本的生理需要^[26]。这或许可以解释饥饿处理后中华绒螯蟹 Rheb 在肝胰腺组织中的转录表达没有像肌肉组织中那样显著下调, 而是保持在稳定状态。

甲壳动物的生长发育由周期性的蜕壳完成。蜕壳由眼柄分泌的蜕皮抑制激素和 Y 器分泌的蜕皮激素调控。对黑背陆蟹的研究表明, Y 器的激活和蜕皮激素的生物合成依赖于 mTOR 信号通路, Y 器的转录组中 mTOR 信号通路基因有较高的表达^[27-28], 本实验检测到 Y 器中 Rheb 有较高的表达量与此一致。在蜕壳间期, Y 器被眼柄分泌的蜕壳抑制激素抑制, 处于不活跃状态。摘除眼柄解除了蜕壳抑制激素的抑制作用, Y 器被激活以合成较多的蜕壳激素。摘除眼柄不仅促进甲壳动物分泌蜕壳激素, 还能促进甲壳动物体内蛋白质、糖类、脂类的合成代谢^[29]。实践证明摘除眼柄能够促进甲壳动物的蜕壳生长和性腺发育^[30]。本实验中华绒螯蟹幼蟹摘除单侧眼柄后, 可观察到 Y 器和螯足肌肉组织中 *Rheb* 基因转录水平的表达均显著高于对照组。这种表达变化势必影响 mTOR 信号通路的强度, 提示中华绒螯蟹 Rheb 参与了摘除眼柄促进动物生长和发育的生理过程。

4 结论

本研究克隆得到编码 184 个氨基酸全长的中华绒螯蟹 Rheb 的 cDNA。Rheb 在中华绒螯蟹和

生物界广泛物种间高度保守, 中华绒螯蟹 Rheb 与人 Rheb 三维结构高度相似。Rheb 转录本在中华绒螯蟹幼蟹消化器官(肝胰腺、胃)、心肌、骨骼肌(螯足肌肉)和 Y 器(内分泌器官)有较高的表达, 并可能参与了中华绒螯蟹 mTOR 介导的生长发育和营养代谢调控。

参考文献:

- [1] Yang H J, Jiang X L, Li B R, et al. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40[J]. Nature, 2017, 552(7685): 368-373.
- [2] Huang J X, Manning B D. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes[J]. Biochemical Society Transactions, 2009, 37(Pt 1): 217-222.
- [3] Jewell J L, Russell R C, Guan K L. Amino acid signalling upstream of mTOR[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013, 14(3): 133-139.
- [4] Zhang S Z, Lin X Y, Hou Q L, et al. Regulation of mTORC1 by amino acids in mammalian cells: A general picture of recent advances[J]. Animal Nutrition, 2021, 7(4): 1009-1023.
- [5] Tabancay A P, Gau C L, Machado I M P, et al. Identification of dominant negative mutants of rheb GTPase and their use to implicate the involvement of human rheb in the activation of p70S6K[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(41): 39921-39930.
- [6] Pan Z H. Rheb1 regulates pancreatic function in humans and mice[D]. Changsha: Central South University, 2024. [潘珍宏. Rheb1 调控胰岛 β 细胞增殖功能的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2024.]
- [7] Gao J, Yang S, Wang Y X, et al. Effect of Rheb1 in the development of mouse megakaryocyte-erythroid progenitor cells[J]. Journal of Experimental Hematology, 2022, 30(1): 298-304. [高娟, 杨爽, 王玉霞, 等. Rheb1 在小鼠巨核-红系多能性干细胞发育中的作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2022, 30(1): 298-304.]
- [8] Yuan Q Y. Rheb regulates circadian rhythm of mTORC1 activity and mitochondrial dynamics in the liver[D]. Chengdu: Sichuan University, 2021. [袁秋芸. Rheb 通过 mTORC1 信号通路介导昼夜节律对肝脏线粒体形态的调控作用[D]. 成都: 四川大学, 2021.]
- [9] Mykles D L, Chang E S. Hormonal control of the crustacean molting gland: Insights from transcriptomics and proteomics [J]. General and Comparative Endocrinology, 2020, 294: 113493.
- [10] Abuhagr A M, MacLea K S, Chang E S, et al. Mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling genes in decapod crustaceans: Cloning and tissue expression of mTOR, Akt,

- rheb, and p70 S6 kinase in the green crab, *Carcinus maenas*, and blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2014, 168: 25-39.
- [11] Shyamal S, Das S, Guruacharya A, et al. Transcriptomic analysis of crustacean molting gland (Y-organ) regulation via the mTOR signaling pathway[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 7307.
- [12] Wei Z L, Zhuang Y T, Liu X T, et al. Leucine promotes protein synthesis of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* through TOR signaling pathway[J]. Aquaculture, 2023, 564: 739060.
- [13] Tian Z H, Lin G C, Jiao C Z. Identification of a S6 kinase transcript in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* and its molting-related expression in muscle tissues[J]. Fisheries Science, 2019, 85(4): 737-746.
- [14] Liu X W. Study on TOR Signaling pathway and functional analysis of two important factors in *Litopenaeus vannamei* [D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2018. [刘新伟. 凡纳滨对虾TOR信号通路及其2个重要成员的功能研究[D]. 青岛: 中国科学院大学 (中国科学院海洋研究所), 2018.]
- [15] Wang J Y, Chitsaz F, Derbyshire M K, et al. The conserved domain database in 2023[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D384-D388.
- [16] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [17] Colicelli J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases[J]. Science's STKE, 2004, 2004(250): RE13.
- [18] Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. Nature, 2021, 596(7873): 583-589.
- [19] Varadi M, Bertoni D, Magana P, et al. AlphaFold protein structure database in 2024: Providing structure coverage for over 214 million protein sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(D1): D368-D375.
- [20] Mahoney S J, Narayan S, Molz L, et al. A small molecule inhibitor of Rheb selectively targets mTORC1 signaling[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 548.
- [21] Suga H, Chen Z H, de Mendoza A, et al. The *Capsaspora* genome reveals a complex unicellular prehistory of animals [J]. Nature Communications, 2013, 4: 2325.
- [22] Hilman D, Gat U. The evolutionary history of YAP and the hippo/YAP pathway[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(8): 2403-2417.
- [23] Schultz D T, Haddock S H D, Bredeson J V, et al. Ancient gene linkages support ctenophores as sister to other animals [J]. Nature, 2023, 618(7963): 110-117.
- [24] Aspuria P J, Tamanoi F. The rheb family of GTP-binding proteins[J]. Cellular Signalling, 2004, 16(10): 1105-1112.
- [25] Dai X L, Li X N, Yin D H, et al. Identification and characterization of TOR in *Macrobrachium rosenbergii* and its role in muscle protein and lipid production[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 2082.
- [26] Sacristán H J, Rodríguez Y E, de Los Angeles Pereira N, et al. Energy reserves mobilization: Strategies of three decapod species[J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0184060.
- [27] Abuhagr A M, MacLea K S, Mudron M R, et al. Roles of mechanistic target of rapamycin and transforming growth factor- β signaling in the molting gland (Y-organ) of the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2016, 198: 15-21.
- [28] Das S, Vraspir L, Zhou W, et al. Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in the molting gland (Y-organ) of the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*, during molt-cycle stage transitions[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2018, 28: 37-53.
- [29] Murugesan R, Soundarapa P, Manivannan K. Effect of unilateral eyestalk ablation on the biochemical changes of edible portunid crab *Charybdis lucifera* (Fabricius)[J]. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 2007, 3(1): 82-86.
- [30] Stella V S, López Greco L S, Rodríguez E M. Effects of eyestalk ablation at different times of the year on molting and reproduction of the estuarine grapsid crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura)[J]. Journal of Crustacean Biology, 2000, 20(2): 239-244.

Cloning and expression analysis of sequence encoding Rheb in *Eriocheir sinensis*

TIAN Zhihuan, JIAO Chuanzhen

College of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China

Abstract: Ras homologue enriched in the brain (Rheb) is an important positive regulator on the upstream of the mammalian mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. The cDNA sequence encoding Rheb in *Eriocheir sinensis* (EsRheb) was cloned using RT-PCR in order to investigate the role of this gene in the regulation of growth, development, and nutrient metabolism of *Eriocheir sinensis* via the mTOR signaling pathway. The sequence and structural characteristics of EsRheb were analyzed using bioinformatics. The tissue distribution of EsRheb mRNA and the effects of animal starvation and eyestalk ablation on EsRheb transcription were detected using qRT-PCR. The results showed that EsRheb cDNA encoded 182 amino acids; its amino acid sequence, conserved domain, and functional sites were highly similar to the Rheb of a wide range of species; and its three-dimensional structure was highly consistent with that of human Rheb. EsRheb mRNA expression was high in the hepatopancreas, stomach, myocardium, skeletal muscles, and Y organ, but was much lower in the eye stalk. Starvation treatment of animals significantly decreased the transcriptional expression of EsRheb in the skeletal muscle but had no significant effect on its expression in the hepatopancreas. The removal of the eye stalk significantly increased the transcriptional expression of EsRheb in the Y organs and skeletal muscles. This study provides a basis for elucidating the function of EsRheb in regulating the mTOR-mediated growth and metabolism of *E. sinensis*.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Rheb; mTOR; starve; eyestalk

Corresponding author: JIAO Chuanzhen. E-mail: jcztsgu.edu.cn