

# 香鱼(*Plecoglossus altivelis*) *JNK1* 基因克隆及其在成熟卵过熟进程中的表达变化\*

杜静雅 苗亮 李星云 汤先念 李双 王昆

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211)

**摘要** c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinases, JNKs)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)蛋白超家族成员之一,参与细胞骨架构建、细胞凋亡等多种细胞活动。本研究克隆了香鱼(*Plecoglossus altivelis*)*JNK1* 基因 cDNA 序列,并检测了其成熟卵在排入体腔保存不同时间(0—96h)的过熟过程中 *JNK1* 基因的表达变化。结果显示,香鱼 *JNK1* 基因 cDNA 序列全长 1670bp,含一个长度 1155bp 的开放读码框,编码 384 个氨基酸,预测蛋白分子质量约 44.2kDa、理论等电点 6.61。氨基酸序列多重比对显示硬骨鱼类中 *JNK1* 氨基酸序列高度保守,香鱼与黄鳝的 *JNK1* 序列相似性最高(97.6%)。系统进化树分析显示各种脊椎动物的 *JNK1*、*JNK2*、*JNK3* 分别聚为一簇;本研究获得的香鱼 *JNK1* 位于 *JNK1* 大簇中并与黄鳝 *JNK1* 优先相聚,表明二者进化关系较近。RT-PCR 检测结果显示健康香鱼 *JNK1* 基因在脑和性腺中高表达,肝和鳃中无表达。实时荧光定量 PCR 检测显示香鱼成熟卵 *JNK1* 基因的表达变化与卵的受精率、孵化率随保存时间延长而降低之间存在相关性:成熟卵随保存时间的延长 *JNK1* 表达量逐渐升高、在 48h 时达到峰值(24h、48h 时的表达量分别为 0h 时的 1.49 倍和 2.55 倍),在此期间卵有较高的受精率和孵化率(48h 时分别为 88.99%和 67.32%);保存时间继续延长时卵内 *JNK1* 基因都处于高表达水平,72h 和 96h 时的表达量分别为 0h 时的 2.32 倍和 1.53 倍,而卵的质量也在保存超过 48h 后急剧下降(72h 时受精率和孵化率分别为 50.2%和 25.54%)直至基本失去受精、孵化能力(96h 时受精率和孵化率分别为 10.83%和 0.54%)。综上,香鱼 *JNK1* 基因表达上调与香鱼成熟卵的过熟凋亡过程密切相关,为深入研究香鱼 *JNK1* 基因的功能及卵过熟机制提供了基础资料。

**关键词** 香鱼; 卵过熟; *JNK1* 基因; 表达变化

中图分类号 Q786; S917 doi: 10.11693/hyhz20190100024

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)为一年生小型洄游性鱼类,分布在东亚的中国、朝鲜半岛、日本等地沿海溪流中,是一种名贵经济鱼类(闫松松等,2014)。卵的质量是影响鱼类繁殖和育苗生产的关键因素之一(Bobe *et al.*, 2010),香鱼为裸卵巢型,其适当成熟卵排入到腹腔中,过熟进程较慢,具有较长时效的受精能力(李星云等,2012),在香鱼的人工繁育中正是利用这一特点大批量获取适当成熟卵(李星云等,2009)。

目前已有一些关于香鱼性腺发育和性别相关基因的研究(Wang *et al.*, 2014a, b, c),但在香鱼卵的凋亡和长时效受精能力机制方面研究较少。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)是另一种卵具有长时效受精能力的鱼类,其卵巢排出的成熟卵可以在体腔内保留 5—7d 而受精能力没有明显降低(Aegerter *et al.*, 2004),Aegerter 等(2005)认为虹鳟卵的过熟过程与细胞结构的保持、细胞分裂、细胞凋亡等相关的蛋白变化有关,

\* 国家自然科学基金项目,41406154 号;宁波市自然科学基金项目,2015A610271 号;浙江省教育厅(理)科研计划,Y201430860 号;浙江省“水产”重中之重学科开放基金,xkzsc1514 号。杜静雅,硕士研究生,E-mail: 2548252250@qq.com

通信作者:苗亮,硕士生导师,E-mail: miaoliang@nbu.edu.cn

收稿日期:2019-01-25,收修改稿日期:2019-03-20

而这些蛋白的变化则是相关基因表达变化的结果。

c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 又被称为应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK), 是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)蛋白超家族的重要成员之一, JNK 信号通路可被多种细胞因子、某些 G 蛋白偶联受体及各种应激因素所激活, 参与细胞增殖与分化、细胞骨架构建、细胞凋亡、细胞迁徙等多种细胞活动(黎增辉, 2010)。在对大鼠嗜铬细胞瘤 PC-12 细胞的研究中首先发现了 JNK 具有促凋亡作用(Xie *et al.*, 1995); 后来的研究显示通过活化 NF- $\kappa$ B 而抑制 JNK 的级联反应信号可以达到抑制凋亡的目的(Nakano *et al.*, 2006); 通过 TNF- $\alpha$ 诱导抑制了肾小管近端小管上皮细胞中 NF- $\kappa$ B 信号转导后, 引起 JNK 信号通路被激活并导致了细胞凋亡(Benedetti *et al.*, 2013)。除参与细胞凋亡外, JNK 在自噬、坏死等其他形式细胞死亡中也有着重要作用(Weston *et al.*, 2007), 例如在大鼠中的研究显示 JNK 信号通路是肝脏、心脏缺血损伤中的主要调控因子, JNK 抑制剂可减少缺血所致的肝细胞和心肌细胞死亡(Ferrandi *et al.*, 2004; Uehara *et al.*, 2005)。对 3 种 JNK 蛋白的研究表明, JNK1 是促进细胞凋亡的主要因素之一, JNK2 则对细胞凋亡起负向调控作用, JNK3 具有组织特异性、只在脑高水平表达(Chang *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002; Santen *et al.*, 2002)。现有研究显示 *JNK1* 基因与鱼类性别分化、性腺发育及生殖功能有关: Xiao 等(2013)发现 *JNK1* 基因参与斑马鱼(*Danio rerio*)的胚胎发育和器官形成, 经 JNK 抑制剂 SP600125 处理后卵巢分化及性别决定进程均受到了抑制; 黄鳝(*Monopterus albus*)性逆转前卵巢中 *JNK1* 高表达, 而在逆转期间的兼性性腺及逆转后的精巢中其表达量显著降低(Xiao *et al.*, 2010); 在成熟卵具有长时效受精能力的虹鳟中发现未受精的成熟卵在随着时间的延长而出现卵质量下降、孵化率降低的过程中 *JNK1* 基因的表达量显著升高(Aegerter *et al.*, 2005)。

为探究香鱼排入腹腔中成熟卵的受精、孵化能力随时间延长而逐渐降低过程中卵内的分子变化, 本研究克隆了香鱼 *JNK1* 基因 cDNA 序列, 并检测其在香鱼卵过熟中的表达变化以及与受精率、孵化率的关系, 以期研究香鱼卵细胞凋亡和长时效受精机制提供参考资料, 并可为今后阐明香鱼中该基因的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验用鱼为购自宁海鳧溪清泉香鱼养殖专业合作社的“浙闽 1 号”香鱼。取健康成鱼雌、雄各 3 尾, 用丁香酚麻醉后立即冰上解剖, 取皮肤、心、肝、脾、肾、胃、肠、肌肉、鳃、脑、精巢、卵巢等组织, 用于 *JNK1* 基因克隆和组织表达检测。选取性腺发育程度基本一致的待排卵雌鱼 25 尾和雄鱼 5 尾带回实验室暂养于塑料箱中, 每天观察鱼腹部变化; 3 天后共获得腹部膨大、轻压鱼腹有成熟卵自然流出且排卵时间基本一致的雌鱼 16 尾, 随机取 9 尾鱼并分为 3 组, 对每尾雌鱼均从排卵开始(记为 0h)进行挤卵采样, 之后每隔 24h 挤卵一次, 直到 96h, 取样时轻压鱼腹收集流出的卵。将收集的卵分为 2 份: 1 份用于提取总 RNA 后检测 *JNK1* 基因表达变化; 另 1 份用于检测受精率和孵化率以判定卵的过熟状态。

### 1.2 香鱼 *JNK1* 基因 cDNA 序列克隆

根据 GenBank 中已发布的鱼类 JNK1 蛋白的保守区域, 用 CodeHop 在线引物设计软件(<http://blocks.fhcrc.org/blocks/codehop.html>)设计用于扩增香鱼 *JNK1* 基因 cDNA 部分序列的简并引物 *JNK1*(+)、*JNK1*(-)(表 1)。用 Trizol 试剂(生工生物工程(上海)股份有限公司)提取香鱼卵细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA 第一链作为模板, 用 *JNK1*(+)、*JNK1*(-)引物扩增香鱼 *JNK1* 基因部分序列, 50 $\mu$ L 扩增体系包括: 5U/ $\mu$ L 的 *Ex Taq* 酶(TaKaRa 公司)0.25 $\mu$ L, 10 $\times$ *Ex Taq* Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus) 5 $\mu$ L, dNTP Mixture (各 2.5mmol/L) 4 $\mu$ L, 正、反向引物各 0.5 $\mu$ L, cDNA 模板 1 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 38.75 $\mu$ L; PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, (94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 合成 30s)  $\times$  30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后切取目的条带, 用 Gel Extraction Kit (OMEGA 公司)纯化回收后连接入 pMD-19T 载体, 转化入感受态大肠杆菌, 挑选阳性克隆菌落送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

根据测得的香鱼 *JNK1* 基因部分序列设计引物, 用 SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司)进行 3'RACE 与 5'RACE 扩增。扩增体系及反应程序均按照说明书进行, 具体为: (1) 使用试剂盒中的引物 3'-CDS Primer A 或 5'-CDS Primer A 将提取的香鱼卵细胞总 RNA 反转录合成用于 3'RACE 或 5'RACE 扩增的 cDNA; (2) 进行 5'RACE (或 3'RACE)的 50 $\mu$ L 反应体系包括: 2.5 $\mu$ L 上一步制备

的 5'-RACE-Ready cDNA (或 3'-RACE-Ready cDNA)、5 $\mu$ L 10 $\times$ 的 UPM 引物、1 $\mu$ L 10 $\mu$ mol/L 的 *P.a.-JNK1-GSP1* 引物(或 *P.a.-JNK1-GSP2* 引物)、5 $\mu$ L 10 $\times$ 的 Advantage 2 PCR Buffer、1 $\mu$ L dNTP Mix、1 $\mu$ L 50 $\times$  的 Advantage 2 Polymerase Mix、34.5 $\mu$ L PCR-Grade Water, 其中引物 *P.a.-JNK1-GSP1* 和 *P.a.-JNK1-GSP2* 为根据获取的香鱼 *JNK1* 基因部分序

列自行设计(序列见表 1), 其余组分均为试剂盒提供; 反应程序为(94 $^{\circ}$ C 30s, 68 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 3min) $\times$ 25 个循环。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后切取目的条带, 纯化回收后连接入 pMD-19T 载体, 转化入感受态大肠杆菌, 挑选阳性克隆菌落测序。对测得序列用 DNASTar Lasergene7 软件进行分析和拼接, 获得的香鱼 *JNK1* 基因 cDNA 全长序列。

表 1 引物信息  
Tab.1 Information of the primers

用途	引物名称	引物序列(5'→3')
扩增香鱼 <i>JNK1</i> 核心序列	<i>JNK1</i> (+)	CGAGACTGGTGCTGATGAARTGYGT
	<i>JNK1</i> (-)	TGCTCGATCACCTTGTTCATGRTC
用于 5'RACE 的基因特异性引物	<i>P.a.-JNK1-GSP1</i>	GCTTGGTAGCCCATACCGAGGATG
用于 3'RACE 的基因特异性引物	<i>P.a.-JNK1-GSP2</i>	GCTGATGGATGCCAAGTGTGCC
表达检测	q- <i>P.a.-JNK1-F</i>	CTATAGCCTGGATGTCGGAG
	q- <i>P.a.-JNK1-R</i>	TGGGTTTGGTTCTGGAAAGG
	$\beta$ - <i>actin</i> (+)	TCGTGCGTGACATCAAGGAG
表达检测内参	$\beta$ - <i>actin</i> (-)	CGCACTCATGATGCTGTTG

### 1.3 序列分析

对获得的香鱼 *JNK1* 基因 cDNA 序列, 利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orf.cgi>) 检测开放阅读框(open reading frame, ORF)并翻译所编码的氨基酸序列; 对预测的编码蛋白用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)进行信号肽预测, 用 PredictProtein (<http://www.predictprotein.org>),

NCBI Conserved domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 Prosite (<http://prosite.expasy.org>)进行酶活性位点、基序及功能域分析; 用 Bioedit 7.0 软件将香鱼 *JNK1* 氨基酸序列与 GenBank 中的其他物种的 *JNK1* 序列进行多重序列对比与同源性分析, 并用 MEGA5.0 软件构建系统进化树。所用序列信息见表 2。

表 2 多重序列比对和系统进化树构建所用序列  
Tab.2 Sequences used for multiple sequence alignment and phylogenetic tree construction

物种			基因名	登录号
中文名	英文名	种名		
香鱼	ayu (sweetfish)	<i>Plecoglossus altivelis</i>	<i>JNK1</i>	KC768782
黄鳝	swamp eel	<i>Monopterus albus</i>	<i>JNK1</i>	EF661977
斑马鱼	zebrafish	<i>Danio rerio</i>	<i>JNK1</i>	AB030900
金鱼	goldfish	<i>Carassius auratus</i>	<i>JNK1</i>	EU374209
鲤	common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>JNK1</i>	JN542470
人	human	<i>Homo sapiens</i>	<i>JNK1</i>	L26318
小鼠	house mouse	<i>Mus musculus</i>	<i>JNK1</i>	AB005663
鸡	chicken	<i>Gallus gallus</i>	<i>JNK2-<math>\alpha</math>1</i>	AB000807
人	human	<i>Homo sapiens</i>	<i>JNK2</i>	L31951
金鱼	goldfish	<i>Carassius auratus</i>	<i>JNK3</i>	FJ183484
大鼠	Norway rat	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>JNK3</i>	DQ377224
小鼠	house mouse	<i>Mus musculus</i>	<i>JNK3</i>	AB005665
玻璃海鞘	vase tunicate	<i>Ciona intestinalis</i>	<i>JNK</i>	NM_001078282

1.4 组织表达的半定量 PCR 检测

通过半定量 RT-PCR 检测香鱼 JNK1 基因在成鱼各组织中的表达情况, 并以 beta-actin 作为内参。20μL 反应体系包括: cDNA 模板为 1μL, 10μmol/L 的引物 q-P.a.-JNK1-F 和 q-P.a.-JNK1-R 各 1μL, 2×Taq Master Mix(宁波博奥生物工程有限公司)10μL, ddH2O 3μL。反应程序为: 95 °C 预变性 3min; (95 °C 变性 20s, 56°C 退火 20s, 72°C 延伸 20s)×35 个循环; 72°C 延伸 5min, 4°C 保存。表达检测引物 q-P.a.-JNK1-F、q-P.a.-JNK1-R 及内参引物 beta-actin-F、beta-actin-R 的序列信息见表 1。PCR 产物于含有 4S Green Plus 核酸染料(生工生物工程(上海)股份有限公司)的 1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 用 GenoSens 1880 型凝胶成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司)获取图像, 分别测定各组织中 JNK1 条带与 beta-actin 条带的光密度值, 以二者光密度的比值作为该组织中 JNK1 基因的表达量。

1.5 受精率、孵化率检测

向收集的卵中加入过量精液, 经人工干法受精后将受精卵平铺于玻璃板上, 放入水中孵化, 孵化水温 19±1°C。经常检测胚胎发育情况, 统计受精率和孵化率:

受精率=原肠期卵数/总卵数×100%

孵化率=出膜仔鱼数/受精卵数×100%

1.6 成熟卵母细胞过熟进程中 JNK1 表达变化的 qRT-PCR 检测

通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time

PCR, qRT-PCR)技术检测香鱼成熟卵母细胞过熟进程中 JNK1 基因的表达变化, 反应在 Mastercycler ep realplex 型实时定量 PCR 仪(Eppendorf 公司)上进行, 25μL 反应体系包括: 2×SYBR® Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) 12.5μL, 10μmol/L 的引物 q-P.a.-JNK1-F 和 q-P.a.-JNK1-R 各 1μL, cDNA 模板 2μL, ddH2O 8.5μL。反应程序为: 95°C 预变性 30s, (95°C 变性 5s, 56°C 退火 30s)×循环 40 次。以 beta-actin 为内参基因, 根据目的基因和内参基因的 Ct 值, 用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法(Livak et al, 2001)计算各时间点 JNK1 基因的相对表达量。引物信息见表 1。

所得数据用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 对各个采样点的表达量进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 以 P<0.05 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 香鱼 JNK1 基因 cDNA 序列特征

经测序、拼接获得香鱼 JNK1 基因 cDNA 序列全长 1670bp (GenBank 登录号: KC768782), 包括 45bp 的 5' 非编码区、469bp 的 3' 非编码区和 1 个长度 1155bp 的开放阅读框(ORF), 3' 端非编码区含有一个多腺苷酸化信号序列(AATAAA), 预测编码 384 个氨基酸, 编码蛋白的分子量大小约为 44.2kDa、理论等电点 6.61, 分析显示该蛋白 N 端无信号肽、含有 1 个依赖 cAMP/cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点“KKLS”、1 个 MAPK 锚定位点“VKSDC”和 1 个双磷酸化位点的三肽基“TPY”(图 1)。

Table with 2 columns: Nucleotide sequence (lines 1-1631) and deduced amino acid sequence (lines 1-384). The table shows the alignment between the cDNA sequence and the predicted protein sequence, with the start and stop codons highlighted in bold and the poly-A tail underlined.

图 1 香鱼 JNK1 基因 cDNA 核苷酸序列和预测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequences of JNK1 cDNA in P. altivelis and deduced amino acid sequence

注: 阴影部分表示结构域和催化位点; 黑体序列表示起始和终止密码子; 下划线示末端多腺苷酸化信号序列

2.2 序列比对与系统进化分析

多重序列比对显示(图 2), JNK1 氨基酸序列高度保守, 香鱼等几种鱼类和哺乳类(人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*))JNK1 序列相似性都在 80%以上, 各物种 JNK1 中与该蛋白功能相关的 3 个位点(依赖 cAMP/cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点“KKLS”、

MAPK 锚定位点“VKSDC”、双磷酸化位点的三肽基“TPY”)均完全保守; 香鱼、黄鳍(*Monopterus albus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、金鱼(*Carassius auratus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)等硬骨鱼类之间 JNK1 的序列相似性均>90%, 其中香鱼与黄鳍 JNK1 序列相似性最高(97.6%)。

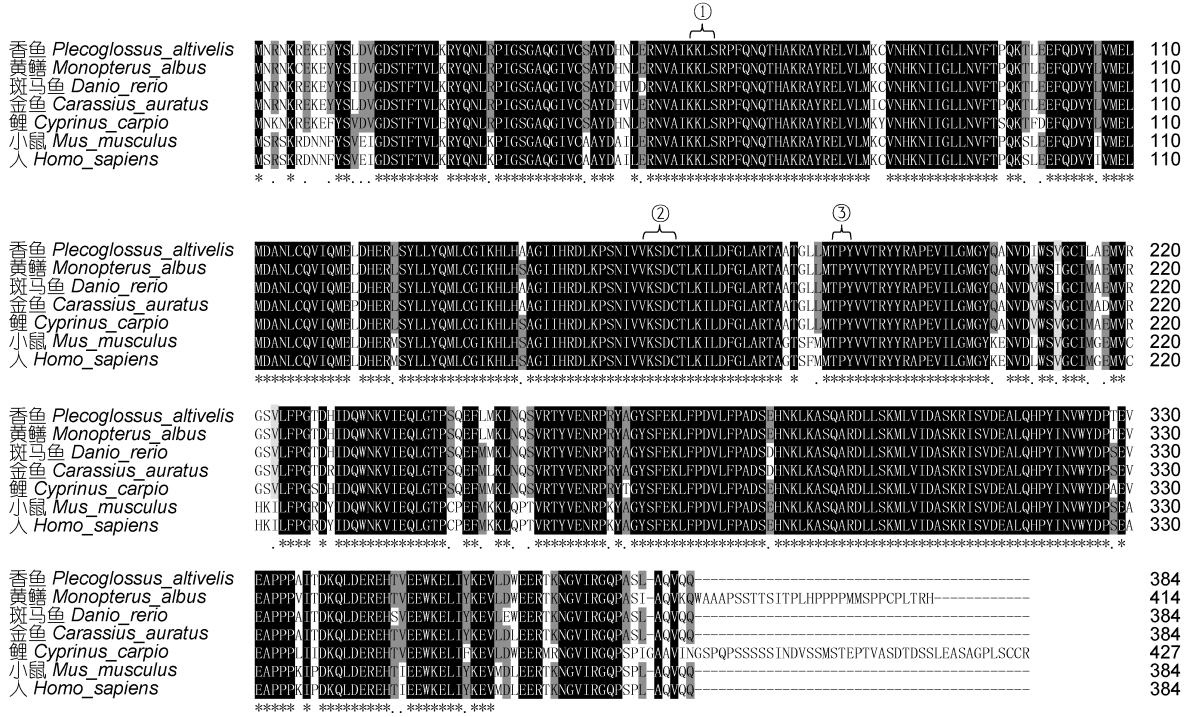


图 2 香鱼及其他动物 JNK1 氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple alignment of JNK1 amino acid among *P. altivelis* and other vertebrates

注: ①: 依赖 cAMP/cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点“KKLS”; ②: MAPK 锚定位点“VKSDC”; ③: 双磷酸化位点的三肽基“TPY”

构建的系统进化树(图 3)显示: 各种脊椎动物的 JNK1、JNK2、JNK3 分别聚为一簇; 本研究获得的香鱼 JNK1 位于 JNK1 大簇中, 与其他鱼类 JNK1 相聚

后再和人、小鼠等非鱼类脊椎动物相聚; 香鱼 JNK1 优先与黄鳍(*M. albus*)JNK1 聚为一枝、表明二者的系统进化关系较近。

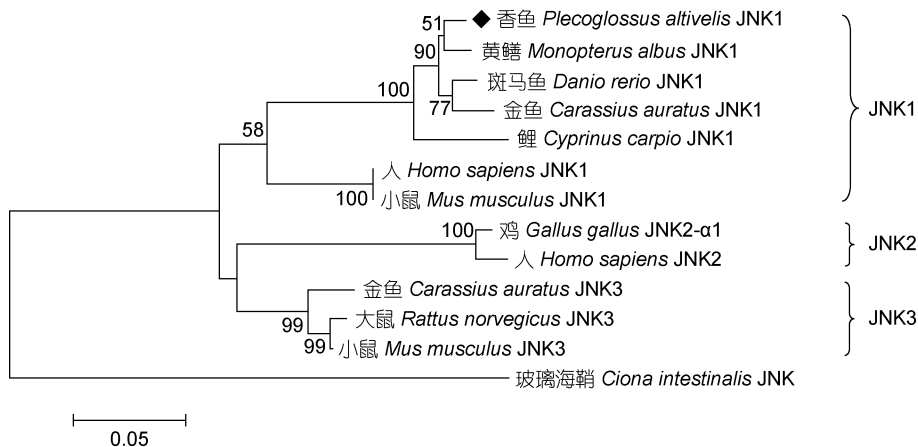


图 3 基于 JNK1 氨基酸序列构建的系统进化树(NJ 法, bootstraps=1000)

Fig.3 The phylogenetic tree based on the amino acid sequence of JNK1 (neighbor-joining method, bootstraps=1000)

### 2.3 香鱼各组织中 *JNK1* 基因的表达

RT-PCR 检测结果(图 4a, b)显示, 雌、雄两性香鱼的皮肤、心、脾、肾、胃、肠、脑和性腺中均有 *JNK1* 基因表达, 雌鱼肌肉中 *JNK1* 基因微弱表达、雄鱼肌肉中则未检测到表达, 雌、雄鱼的肝和鳃中

未检测到 *JNK1* 基因表达。雌、雄鱼均是脑中 *JNK1* 基因表达量最高、其次为性腺。半定量分析显示雌鱼皮肤、心、胃、肠、脑中 *JNK1* 基因表达量明显高于雄鱼, 雄鱼肾中 *JNK1* 基因表达量则明显高于雌鱼。

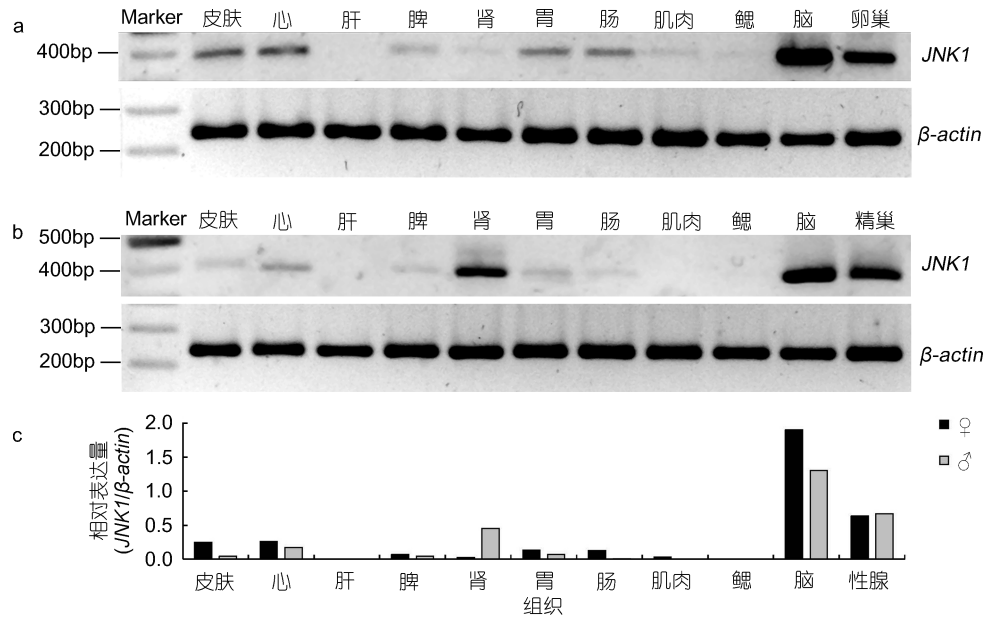


图 4 *JNK1* 基因在香鱼各组织中的表达

Fig.4 The expression of *JNK1* gene in different tissues of *P. altivelis*

注: a. 雌鱼各组织 *JNK1* 和  $\beta$ -actin 基因 PCR 产物凝胶电泳图; b. 雄鱼各组织 *JNK1* 和  $\beta$ -actin 基因 PCR 产物凝胶电泳图; c. 雌、雄鱼各组织 *JNK1* 基因相对表达量

### 2.4 香鱼卵过熟过程中 *JNK1* 基因的表达变化及其与受精率、孵化率的关系

qRT-PCR 检测显示(图 5), 0—96h 期间香鱼卵中 *JNK1* 基因的表达呈先升高后降低的变化: 24h 时的表达量比 0h 时显著升高了 1.49 倍( $P < 0.05$ ); 48h 时再次显著升高( $P < 0.05$ )并达到峰值, 此时的表达量为 0h 时的 2.55 倍; 48—72h 期间 *JNK1* 保持高表达水平; 96h 时 *JNK1* 表达显著下调( $P < 0.05$ ), 表达量比 72h 时降低了 34.05%, 但仍显著高于 0h 时的表达水平( $P < 0.05$ )。香鱼排到腹腔中的成熟卵随着保存时间的延长(0—96h)受精率、孵化率不断降低(图 5), 表明卵逐渐过熟、衰老。但在 0—48h 期间变化相对较小, 48h 时仍有 88.99% 的受精率和 67.32% 的孵化率。保存超过 48h 之后卵子质量急剧下降, 72h 时受精率、孵化率分别为 50.2% 和 25.54%, 保存 96h 时卵子则已基本失去发育能力(受精率、孵化率分别为 10.83% 和 0.54%)。 *JNK1* 基因表达的高峰与卵受精、孵化能力的急剧降低在时间上有着一致性, 提示 *JNK1* 与卵的过熟、凋

亡进程有关。

### 3 讨论

*JNK* 与另外三种激酶——ERK、p38 与 ERK5 共同组成了 MAPK 超家族, MAPK 通路在细胞内信号转导中有着重要的作用, 参与多种细胞活动的调节。脊椎动物中, *JNK* 基因家族共有 3 个成员——*JNK1*、*JNK2* 和 *JNK3*, 并且这 3 个基因编码蛋白都可形成多种异构体, 例如在人类中已经发现了 6 种 *JNK1* 蛋白异构体。本文克隆得到的香鱼 *JNK1* 基因 cDNA 序列全长 1669bp, ORF 编码 384 个氨基酸, 该基因的编码蛋白是否能形成多种异构体有待于进一步研究。在正常细胞中, *JNK* 主要定位于细胞质, 当被刺激因素激活后, 一部分活化的 *JNK* 就转移到细胞核中, 通过磷酸化而激活多种核内转录因子, 从而促进相关靶基因的转录和新蛋白质的合成, 发挥相应的生物学效应(侯炳旭等, 2011)。对香鱼 *JNK1* 序列的分析显示其编码蛋白 N 端没有信号肽, 推测 *JNK1* 蛋白链不能

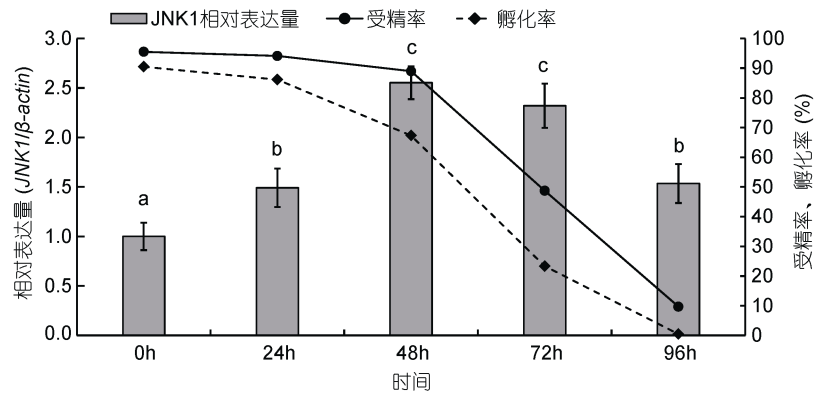


图5 香鱼卵过熟过程中 *JNK1* 基因表达变化

Fig.5 The expression changes of *JNK1* mRNA in *P. altivelis* eggs during post-ovulatory ageing

注: 小写字母不同表示具有显著性差异( $P < 0.05$ )

进入内质网, 其成熟肽只会存在于细胞质内, 这与 JNK 参与胞内代谢调节的功能相符合。

MAPK 超家族蛋白的特点之一是都含有一个双磷酸化功能区, 并且这一区域保守性很高。这一双磷酸化功能区由 3 个氨基酸组成, 称为“三肽基”, 可与其他氨基酸作用形成一个“活化唇”(activation lip)结构, 一般认为这个结构是决定包括 MAPKs 在内的多种蛋白激酶活性的关键结构(龚小卫等, 2003)。在 MAPK 超家族的不同成员中, 三肽基仅第 2 个氨基酸有所不同: ERK 与 ERK5 为 Thr-Glu-Tyr, p38 为 Thr-Gly-Tyr, 而 JNK 则为 Thr-Pro-Tyr (Widmann *et al.*, 1999)。香鱼 JNK1 中除包含三肽基“TPY”外, 还含有依赖 cAMP/cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点“KKLS”、一个 MAPK 锚定位点“VKSDC”, 这与其他脊椎动物 JNK1 的结构特点相同, 推测香鱼中 JNK1 的功能也与其他脊椎动物中相似。

JNK 蛋白由 3 个基因编码, 在人和小鼠中的研究显示 *JNK1*、*JNK2*、*JNK3* 三个基因分别位于不同的染色体上(Bogoyevitch, 2006); 笔者构建的系统进化树也显示各种脊椎动物的 *JNK1*、*JNK2*、*JNK3* 蛋白各自聚为一个大簇, 表明三者是分别独立进化的。本研究获取的香鱼 JNK 序列位于 *JNK1* 簇中, 并且包括香鱼在内的各种硬骨鱼类聚为一个紧密的簇, 序列比对显示序列相似性都在 94% 以上, 其中香鱼与黄鳍 JNK1 相似性最高(97.6%), 表明该蛋白序列在鱼类的系统进化中是比较保守的。

组织表达检测显示 *JNK1* 基因在香鱼脑和性腺中表达量较高, 这与鲫鱼中的情况一致(Xiao *et al.*, 2014), 而斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)脑中 *JNK1* 基因则为中等表达(Guo *et al.*, 2016)。本研究在

香鱼的肝和鳃中均未检测到 *JNK1* 基因的表达, Guo 等(2016)则发现斜带石斑鱼各组织中 *JNK1* 基因表达量最高的是肝、鳃中也有一定表达。不同鱼类之间 *JNK1* 基因表达的组织差异可能是长期进化形成的功能差异所致, 也可能与各种鱼类生活的水环境不同有关。另外, 香鱼雄性肾中 *JNK1* 基因的表达量远高于雌鱼, 雌、雄两性在皮肤、心、肠、胃中的表达也有一定的差别, 但该基因在雌、雄鱼中的功能是否有差异有待于今后的进一步研究。

JNK 是 MAPK 信号传导通路中的重要激酶之一, 有研究显示 JNK1 是促进细胞凋亡的主要分子之一, 如 Kim 等(2012)发现缺血/再灌注可显著增加肝细胞内 *JNK1* 的表达, 并引起肝细胞凋亡; 而 Tien 等(2010)通过药物降低 JNK1 活性后对 LPS 导致的心肌细胞凋亡起到了抑制作用。但目前鱼类中 JNK1 功能的研究较少。我们之前的研究(李凌云等, 2012)显示香鱼排至腹腔中的成熟卵随着保存时间的延长受精率、孵化率逐渐降低与卵内油球直径、SOD 等酶活性及丙二醛含量变化有关, 其中 24—48h 是关键的时间段。本研究中成熟卵排出后 48h 既是香鱼卵受精、孵化能力急剧下降的时间拐点, 也是 *JNK1* 基因表达的高峰, 提示 *JNK1* 基因的表达与卵的过熟、衰老进程有关, 这也与 Aegerter 等(2005)发现虹鳟成熟卵母细胞随保存时间延长而发生的质量下降与 *JNK1* 等 8 种细胞因子表达上调有关的研究结果相一致。现有研究表明 JNK1 所参与的 MAPK 途径对细胞骨架的调节有着重要作用(孙瑜等, 2013), JNK 通路激活后会引引起细胞形态的改变以及微丝重排(Nakamichi *et al.*, 2007); 敲除 *JNK1* 基因后会因微管相关蛋白无法正常磷酸化而影响微管的装配(Chang *et al.*, 2003)。在之前的研究中我



们发现香鱼成熟卵过熟过程中卵膜结构会逐渐退化,成熟卵在腹腔中保存 48h 期间胶膜层逐渐退化、消失,96h 时放射膜逐渐退化、消失(汤先念等,2013);本研究中 *JNK1* 的最大表达量也是出现在 48h 时,48—96h 期间 *JNK1* 的表达量仍保持在较高水平。

#### 4 结论

综上,可以推测香鱼成熟卵过熟过程中细胞膜骨架的逐渐崩溃、解体是由 JNK1 参与的 MAPK 信号传导通路所介导的。在哺乳动物中的研究显示 JNK 信号通路中存在多种上游激活物[如凋亡信号调节激酶(ASK)、MAPK 激酶(MAPK kinase, MKK)、混合连接激酶(MLKs)]和下游作用分子(如 AP-1 蛋白、Elk-1、DPC4、NFAT4d 等)(刘慧等,2008),而 JNK1 在香鱼成熟卵母细胞过熟过程中具体的生理功能和调控机制有待于今后进一步研究。

#### 参 考 文 献

- 刘 慧,唐圣松,2008. JNK 活化机制的研究进展. 现代生物医学进展, 8(6): 1188—1190
- 闫松松,苗 亮,李明云等,2014. 香鱼(*Plecoglossus altivelis*) 养殖群体遗传多样性的 AFLP 分析及性别特异性分子标记筛选. 海洋与湖沼, 45(2): 395—399
- 汤先念,苗 亮,李明云等,2013. 香鱼成熟卵母细胞过熟过程中卵膜结构变化的扫描电镜观察. 水生生物学报, 37(6): 1179—1183
- 孙 瑜,徐立红,2013. MAPK 信号通路对细胞骨架调控作用的研究进展. 癌变 畸变 突变, 25(3): 244—246
- 李明云,陈 炯,史雨红等,2009. 香鱼优质受精卵和发眼卵的大量获取技术. 现代农业科技, (13): 309, 314
- 李明云,苗 亮,安 钦等,2012. 香鱼(*Plecoglossus altivelis*) 排卵后卵内油球、酶活、丙二醛及受精率、孵化率的变化. 海洋与湖沼, 43(2): 313—317
- 侯炳旭,冯丽英,2011. JNK 信号通路介导的凋亡在疾病中的作用. 世界华人消化杂志, 19(17): 1819—1825
- 龚小卫,姜 勇,2003. 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)生物学功能的结构基础. 中国生物化学与分子生物学报, 19(1): 5—11
- 黎增辉,2010. JNK 信号通路. 国际病理科学与临床杂志, 30(3): 273—276
- Aegerter S, Jalabert B, 2004. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 231(1—4): 59—71
- Aegerter S, Jalabert B, Bobe J, 2005. Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. Molecular Reproduction and Development, 72(3): 377—385
- Benedetti G, Fredriksson L, Herpers B *et al*, 2013. TNF- $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B survival signaling impairment by cisplatin enhances JNK activation allowing synergistic apoptosis of renal proximal tubular cells. Biochemical Pharmacology, 85(2): 274—286
- Bobe J, Labbé C, 2010. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology, 165(3): 535—548
- Bogoyevitch M A, 2006. The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. BioEssays, 28(9): 923—934
- Chang L F, Jones Y, Ellisman M H *et al*, 2003. JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. Developmental Cell, 4(4): 521—533
- Chang L F, Karin M, 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature, 410(6824): 37—40
- Ferrandi C, Ballerio R, Gaillard P *et al*, 2004. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in anaesthetized rats. British Journal of Pharmacology, 142(6): 953—960
- Guo M L, Wei J G, Huang X H *et al*, 2016. JNK1 derived from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, involving in the evasion and infection of Singapore grouper iridovirus (SGIV). Frontiers in Microbiology, 7: 121
- Johnson G L, Lapadat R, 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science, 298(5600): 1911—1912
- Kim H Y, Lee S M, 2012. Ferulic acid attenuates ischemia/reperfusion-induced hepatocyte apoptosis via inhibition of JNK activation. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 45(5): 708—715
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> method. Methods, 25(4): 402—408
- Nakamichi K, Saiki M, Kitani H *et al*, 2007. Roles of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in morphological and cytoskeletal responses of microglia to double-stranded RNA. Neuroscience Letters, 414(3): 222—227
- Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S *et al*, 2006. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF- $\kappa$ B and JNK. Cell Death and Differentiation, 13(5): 730—737
- Santen R J, Song R X, McPherson R *et al*, 2002. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 80(2): 239—256
- Tien Y C, Lin J Y, Lai C H *et al*, 2010. *Carthamus tinctorius* L. prevents LPS-induced TNF $\alpha$  signaling activation and cell apoptosis through JNK1/2-NF $\kappa$ B pathway inhibition in H9c2 cardiomyoblast cells. Journal of Ethnopharmacology, 130(3): 505—513
- Uehara T, Bennett B, Sakata S T *et al*, 2005. JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. Journal of Hepatology, 42(6): 850—859
- Wang C, Li M, Wang J *et al*, 2014a. Identification of a sex-linked SCAR marker for *Plecoglossus altivelis* and its application for identifying gender in cultivated and wild populations. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 13(4): 895—906



- Wang C Y, Wang J H, Li M Y *et al*, 2014b. The genomic structure and expression patterns of Cyp19a1a and Cyp19a1b genes in the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14: 785—793
- Wang J H, Miao L, Li M Y *et al*, 2014c. Cloning the *Dmrt1* and *DmrtA2* genes of ayu (*Plecoglossus altivelis*) and mapping their expression in adult, larval, and embryonic stages. *Zoological Research*, 35(2): 99—107
- Weston C R, Davis R J, 2007. The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2): 142—149
- Widmann C, Gibson S, Jarpe M B *et al*, 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews*, 79(1): 143—180
- Xiao Y M, Chen L L, Liu J *et al*, 2010. Contrast expression patterns of *jnk1* during sex reversal of the rice-field eel. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 314B(3): 242—256
- Xiao Y M, Zhou Y H, Xiong Z *et al*, 2013. Involvement of JNK in the embryonic development and organogenesis in zebrafish. *Marine Biotechnology*, 15(6): 716—725
- Xiao Y M, Jiang M G, Luo Z W *et al*, 2014. Identification and analysis of the *jnk1* gene in polyploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus* red var.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genetics and Molecular Research*, 13(1): 906—919
- Xie Z G, Dickens M, Raingeaud J *et al*, 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270(5240): 1326—1331

## CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF SWEETFISH (*PLECOGLOSSUS ALTIVELIS*) *JNK1* GENE DURING THE POST-OVULATORY AGEING OF EGGS

DU Jing-Ya, MIAO Liang, LI Ming-Yun, TANG Xian-Nian, LI Shuang, WANG Kun  
(Key laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract** The c-Jun N-terminal kinases (JNKs) are one subgroup of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and play crucial roles in cytoskeleton and apoptosis. Here, *JNK1* cDNA was cloned and characterized from sweetfish *Plecoglossus altivelis*, and the expression changes of *JNK1* gene were detected in eggs which were held in the body cavity for 0—96h. The results showed that *P. altivelis JNK1* cDNA contained 1670 nucleotides with an open reading frame of 1155 nucleotides and encoding 384 amino acids, the 5'- and 3'-untranslated region contained 45 nucleotides and 469 nucleotides, respectively. The molecular mass of predicted JNK1 protein was 44.2kDa and its theoretical isoelectric point was 6.61. The multiple sequence alignment of amino acid sequences indicated that the JNK1 of different vertebrates was highly conserved, *P. altivelis JNK1* shared the highest amino acid similarity (97.6%) with JNK1 of swamp eel *Monopterus albus*. Phylogenetic tree analysis also confirmed that *P. altivelis JNK1* fell into the JNK1 cluster and was most closely relation to *M. albus JNK1*. Reverse transcription PCR (RT-PCR) analysis showed that *P. altivelis JNK1* mRNA had high expression in brain and gonad, but under-detectable in liver and gill. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed there was a correlation between the expression of JNK1 and the quality of the eggs during the process of egg post-ovulatory ageing. Compared to freshly ovulated eggs (0h), the expression of JNK1 increased 1.49 fold when the eggs were held in the body cavity for 24h, and the expression peak appeared at 48h (2.55 fold). In this period (0—48h), the eggs had high fertilization rate (88.99% at 48h) and hatching rate (67.32% at 48h). The expression level of JNK1 maintained the higher level at 72h and 96h (2.32 and 1.53 folds compared to 0h, respectively). At this period, the quality of the eggs sharply decreased (50.2% fertilization rate and 25.54% hatching rate), and was almost lose their developmental capacities (10.83% fertilization rate and 0.54% hatching rate at 96h). Therefore, the increased expression of JNK1 is closely related to the apoptosis of egg post-ovulatory ageing, and these data could be helpful to understand both the biological function of *JNK1* gene and the mechanism of egg post-ovulatory ageing.

**Key words** *Plecoglossus altivelis*; egg post-ovulatory ageing; *JNK1* gene; expression change