

急性 Pb^{2+} 胁迫对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) 幼鱼 Hippo 信号通路基因表达的影响*

钱宝英 卢明敏 钱鸿基 潘宇奇 林乐琪 徐芳英 施港归 齐 鑫

(台州学院生命科学学院 台州 318000)

摘要 为研究重金属铅离子对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)幼鱼 Hippo 信号通路中主要基因表达的影响, 本实验采用 qPCR 技术研究了 96 h 急性不同浓度铅胁迫(0、10、17.8、31.6、56.2 和 100 mg/L) 下 Hippo 信号通路中的部分基因在肝脏、肌肉、鳃和小肠组织中的 mRNA 表达量变化。结果显示: 与对照组(0 mg/L)相比, 七个基因在肝脏组织中表达量变化总体上呈上升趋势, 除 *Lats1/2* 外, 其他基因在铅胁迫浓度(17.8 mg/L)时都显著上调($P < 0.05$); 在肌肉组织中, *MOB1* 表达量在不同浓度铅胁迫下上升显著($P < 0.05$); 在鳃组织中, *YAP/TAZ*、*TEAD*、*PP2A*、*MOB1*、*KIBRA* 和 *FRMD* 表达量在铅胁迫浓度(10 mg/L)时显著上调($P < 0.05$); 在小肠组织中, *PP2A*、*KIBRA* 和 *14-3-3* 表达量显著下降($P < 0.05$)。结果提示大口黑鲈可能通过调节 Hippo 信号通路中相关基因的表达响应铅胁迫。

关键词 大口黑鲈; 急性铅胁迫; Hippo 信号通路; 基因表达

中图分类号 Q176; Q789; S965 doi: 10.11693/hyhz20200700222

铅为生物非必需的蓄积性重金属元素, 可通过食物链的生物级联放大效应在生物体内富集, 损害生物各组织器官, 已成为土壤及水域中的三种主要重金属污染物之一(Rajamanickam *et al*, 2008; 潘天扬等, 2016)。铅污染在水域表层沉积物中高于相应水相, 当环境条件变化时可缓慢释放至上层水相, 鱼类通过鳃呼吸及摄食底层水生动植物进入鱼体后引起其生长发育和繁殖异常、器官畸变或死亡, 且底栖或处于食物链顶端的水生生物体内铅蓄积程度高于非底栖生物(刘芳芳, 2013; 龙昱等, 2016)。进入鱼体内的铅离子不仅与蛋白质、酶等功能基团巯基结合而干扰其生理生化活动, 而且还在基因水平上诱导染色体失常(Ferraro *et al*, 2004), 引起 DNA 链损伤断裂及片段丢失(Hong *et al*, 2007; Sokolova *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2008), 关键基因 *G6PDH*、*GST*、铁蛋白基因以及 β -球蛋白基因表达延时、mRNA 表达量改变(Mager *et al*, 2008)。此外, 铅离子在一定程度上可造成鱼类

细胞内染色质凝集、周边化、细胞质密度增加进而出现空泡后形成凋亡小体(项黎新等, 2001)。

Hippo 信号通路由进化上高度保守的一系列激酶组成, 包括 *YAP/TAZ*、*Salvador*、*Lats1/2*、*MOB1*, 调控细胞分化、增殖和凋亡、组织器官发育、肿瘤发生等(Song *et al*, 2019; 麻明彪等, 2020)。Hippo 信号通路的激活/抑制与细胞生长密度紧密相关, 在高密度生长的细胞中, Hippo 通路中激活的 *Lats1/2* (large tumor suppressor kinases1/2, 大型肿瘤抑制因子 1/2) 磷酸化转录共激活因子 *YAP/TAZ* (Yes-associated protein/transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, Yes 相关蛋白/结合 PDZ 的转录共激活因子), 促使 *YAP/TAZ* 与 14-3-3 蛋白结合后定位于细胞质中, 被抑制转录共激活作用的 *YAP/TAZ* 进而导致蛋白质降解及细胞凋亡从而限制组织器官的过度生长(Zhao *et al*, 2007, 2010; Badouel *et al*, 2011); 而在低密度生长的细胞中, Hippo 通路则呈抑制状态, *YAP/TAZ* 易

* 浙江省基础公益研究计划项目, LGN18C190007 号; 台州市科技计划项目, 1901ny09 号。钱宝英, 博士, 讲师, E-mail: wutongye1979@126.com

通信作者: 齐 鑫, 教授, E-mail: qixin0612@tzc.edu.cn

收稿日期: 2020-07-31, 收修改稿日期: 2020-09-22

位进入细胞核与转录增强因子 TEAD (TEA domain, TEA 结构域)家族结合调控细胞增殖抑制凋亡的基因转录, 从而促进细胞生长和增殖(Zhao *et al.*, 2011; Agarwala *et al.*, 2015; Gibaul *et al.*, 2016)。有研究表明, Lats1/2 还可被抑癌蛋白 MOB1 (Mps One Binder kinase activator-like1, 多磷酸粘多糖激酶激活剂 1)磷酸化, 致使 Lats1/2 滞留于细胞质(Di Benedetto *et al.*, 2016)。通路中 KIBRA 蛋白(kidney and brain expressed protein, 肾脑表达蛋白)又称为 WWC1, 属 WWC 蛋白家族, 与 FRMD 蛋白(FERM domain-containing protein 1, FERM 结构域蛋白)上游调节蛋白相互作用, 参与调节细胞增殖和细胞凋亡(Tepass, 2009; 宋林, 2019)。PP2A (protein phosphatase 2A, 蛋白磷酸酶 2A)是丝氨酸/苏氨酸磷酸酶家族中其中一个蛋白磷酸酶, 广泛参与调控细胞周期、细胞增殖分化、信号转导、肿瘤细胞增殖转移等(孙奕等, 2018), 在 Hippo 通路中, PP2A 在 α -catenin 的负调节下, 通过与 14-3-3 蛋白相互作用控制 YAP1 的磷酸化(Schlegelmilch *et al.*, 2011)。

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)又名加州鲈, 为太阳鱼科(Centrarchidac)、黑鲈属(*Micropterus*), 以肉食为主的广温杂食性鱼类, 是我国重要的淡水养殖品种之一(石琼等, 2014), 在食物链中处于较高位置。又因大口黑鲈为底栖鱼类, 在铅污染水体中极易生物富集。水体中的铅离子通过大口黑鲈鳃呼吸进入循环系统, 因此在鳃中的蓄积量较高(阮晓等, 2001; Rogers *et al.*, 2003)。此外, 鱼类在摄取鱼食同时吞咽铅离子, 小肠作为消化和吸收的主要部位, 铅离子极可能在小肠部位被吸收。肝脏是鱼类重要的消化代谢器官, 也是鱼类重要的生理指示器, 进入鱼体内的铅离子可引起肝细胞损伤或畸变。Ribeiro 等(2014)发现铅可在 *Prochilodus lineatus* 的肝脏、鳃和肌肉组织中检测到铅离子。已有研究表明大口黑鲈幼鱼肝脏组织 YAP/TAZ 表达量在 Pb²⁺浓度 17.8 mg/L 下急性胁迫 96 h 时显著上升(Qian *et al.*, 2020), YAP/TAZ 为 Hippo 信号通路核心基因, 目前对 Pb²⁺胁迫后大口黑鲈 Hippo 信号通路中的其他关键基因表达变化的研究未见报道。本文在前期研究的基础上分析了 96 h Pb²⁺不同浓度胁迫后的 Lats1/2、MOB1、KIBRA、FRMD、14-3-3、TEAD 和 PP2A 在肝脏、肌肉、鳃和小肠组织, 以及 YAP/TAZ 在肌肉、鳃和小肠组织中的表达变化。研究结果可为大口黑鲈幼鱼对 Pb²⁺胁迫的分子响应机制研究提供一定的理论数据。

1 材料与方法

1.1 材料与取样

大口黑鲈幼鱼[平均体重(3.0±0.2) g]购买自湖州淡水鱼苗种场, 随机分成 18 组养于 120 L 白色养殖箱, 每箱 30 尾。经停食适应 2 d 后, 每天早晚投喂大口黑鲈幼鱼专用饲料, 正常养殖 7 d 后开始进行胁迫实验。以 Pb(NO₃)₂ (CAS: 10099 74-8, AR: 99%)制备的 50 mg/L Pb²⁺溶液为母液, 稀释至不同的胁迫处理浓度 10、17.8、31.6、56.2 和 100 mg/L, 其中以 Pb²⁺ 0 mg/L 为对照组, 每个浓度梯度三个平行, 每个浓度梯度共 90 尾, 胁迫期间正常投喂。胁迫处理 96 h 后, 从对照组和各浓度梯度胁迫组各取 9 尾大口黑鲈幼鱼(每个养殖箱取 3 尾, 一个浓度梯度共 9 尾), 经麻醉后取肝脏、肌肉、鳃和小肠组织, 样品保存于 RNA 组织保存液中, 存于-80°C 冰箱备用。

1.2 基因表达分析

采用组织总 RNA 抽提试剂盒 6688-1(OMEGA, 广州)并根据试剂盒提供的说明书进行样品总 RNA 的提取, 1.2%琼脂糖凝胶检测总 RNA 完整性, 并用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 分析总 RNA 浓度和纯度, 检测合格的总 RNA 保存于-80°C 超低温冰箱备用。用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa, 大连)并根据说明书进行 cDNA 第一链合成, 反转录产物保存于-20°C 冰箱备用。

根据本实验室前期转录组测序获得的大口黑鲈 Lats1/2、MOB1、KIBRA、FRMD、14-3-3、TEAD、PP2A 和 YAP/TAZ 基因部分 cDNA 序列, 以 β -actin(β 列肌动蛋白)为内参基因, 用 Primer premier 5.0 设计引物并送北京六合华大合成。具体引物名称和序列见表 1。

实时荧光定量 PCR(qPCR)反应体系共 20 μ L, 包括 SYBR Green (FastStart Universal SYBR Green Master, Roche) 9 μ L, 10 μ mol/L 的正向和反向引物各 0.6 μ L, cDNA 模板 1 μ L, DNase/RNase free 的无菌 H₂O 8.8 μ L。qPCR 反应条件包括: 50°C 2 min, 95°C 预变性 10 min, (95°C 变性 10 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 20 s, 共 40 个循环), 最后进行熔解曲线分析。目的基因和内参基因扩增效率模板采用不同稀释倍数 cDNA(1、10、100 和 1000 倍)。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算目的基因 mRNA 表达倍数变化(Schmittgen *et al.*, 2008)。采用 SPSS 统计分析软件(版本 21.0)对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 当 P<0.05 时差异显著。最后用 OriginPro 作图软件(版本 9.1)作图。

表 1 qPCR 引物
Tab.1 The primer sequence of qPCR

基因	正向或反向	引物序列(5'—3')	基因	正向或反向	引物序列(5'—3')
<i>β-actin</i>	正向 F	TGTAAGCCAACGCTGGAACA	<i>PP2A</i>	正向 F	ACGAAATCAGCGTGGACAGT
	反向 R	GGCTGGAGACCGCTAAACTT		反向 R	GTTACAGGACGTCACCCAT
<i>KIBRA</i>	正向 F	AACTACAAGCTGGACGAGGC	<i>YAP/TAZ</i>	正向 F	GCCAAAGTTTTGGTGTGCGCA
	反向 R	CGAGTAACCCACGGTTCCAA		反向 R	GAGTGTTCCTCGGCTGTGA
<i>FRMD</i>	正向 F	CCTCCTGCTGACGACATTCA	<i>14-3-3</i>	正向 F	AGATGGCAGTTTTGGGGACT
	反向 R	ATTACGGAGGAGACCGTTGC		反向 R	AGTGTGAGCTCATGGAGGTTG
<i>MOBI</i>	正向 F	ACACCCGAAACAGACGAGAC	<i>TEAD</i>	正向 F	GAGTGTGTGGACATCAGGCA
	反向 R	AATATCGCTGGCAGGACGAG		反向 R	ATTGGCTGGTGACACCGTAG
<i>Lats1/2</i>	正向 F	GAGTCATGTGTCCAGCGGAA			
	反向 R	TTATCCGGCTCGGCATCTTC			

2 结果

2.1 大口黑鲈急性 Pb²⁺胁迫处理后肝脏组织的表达分析

以对照组(0 mg/L)各目的基因在大口黑鲈肝脏组织中的表达量作为参照, 96 h 不同浓度 Pb²⁺胁迫后, 肝脏组织中各基因表达量出现了不同的变化(图 1a, 1b)。Lats1/2 表达量在胁迫浓度 100 mg/L 时相对对照组上调极显著, 在其他胁迫浓度下表达量变化不显著; MOBI、PP2A 和 TEAD 表达量在不同浓度铅胁迫下总体上调, 在 17.8 和 31.6 mg/L 时表达量上升显著; 14-3-3 表达量相比对照组总体呈上升, 并在 17.8、31.6 和 56.2 mg/L 时显著上调; KIBRA 在 17.8 mg/L 时表达量上调极显著, 其他胁迫浓度下虽有升高但不显著; 基因 FRMD mRNA 表达量呈先下降后升高又下降的趋势, 在 17.8 mg/L 时显著上调, 在其他浓度虽有下调和上调趋势, 但与对照组相比变化不显著。

2.2 大口黑鲈急性 Pb²⁺胁迫处理后肌肉组织的表达分析

96 h 不同浓度 Pb²⁺胁迫后, 肌肉组织中除 TEAD 外其余各目的基因表达量与对照组(0 mg/L)变化明显(图 2a, 2b)。YAP/TAZ mRNA 表达量随着 Pb²⁺胁迫浓度的提高, 在 17.8 mg/L 时与对照组相比上调极显著, 在恢复至对照组水平(数据来源于参考文献 Qian *et al.*, 2020); Lats1/2 在 10 和 17.8 mg/L 时上调极显著, 随着浓度的升高, 表达量变化不显著; 与对照组相比, 基因 MOBI mRNA 表达量在不同胁迫浓度下都呈显著上升, 在 17.8 mg/L 时达到最高值(表达倍数为 5.18); 14-3-3 表达量随着 Pb²⁺胁迫浓度的升高, 先显著下调, 在 31.6 mg/L 时上调极显著, 56.2 mg/L 时下调极显著, 在 100 mg/L 时又极显著上升; PP2A 表达量 10 和

56.2 mg/L 时上升极显著, 在 31.6 和 100 mg/L 时虽较对照组下调, 但变化不显著; KIBRA mRNA 表达量在 Pb²⁺胁迫浓度 10 mg/L 时显著上调, 随着胁迫浓度的升高, 表达量较对照组都无显著变化; 基因 FRMD 在 Pb²⁺胁迫浓度 10、56.2 和 100 mg/L 时显著上调; 而 TEAD 表达量在所有 Pb²⁺胁迫浓度处理下较对照组变化不显著。

2.3 大口黑鲈急性 Pb²⁺胁迫处理后鳃组织的表达分析

大口黑鲈幼鱼在 96 h 不同浓度 Pb²⁺胁迫后, 鳃组织中各目的基因表达量与对照组(0 mg/L)有不同的变化(图 3a, 3b)。基因 YAP/TAZ 表达量随着胁迫浓度的上升呈先上调后下调, 在 10 mg/L 表达量上调极显著, 在 17.8、56.2 和 100 mg/L 时表达量显著下调; Lats1/2 mRNA 表达量在 100 mg/L 时下调极显著, 其他胁迫处理浓度下表达量与对照组相比都无显著变化; 基因 MOBI 在胁迫浓度 10 和 31.6 mg/L 时表达量上调极显著, 其他浓度下与对照组相比变化不显著; 14-3-3 mRNA 表达量在所有胁迫处理浓度下都下降, 在 17.8 mg/L 时下调极显著, 在 10 和 56.2 mg/L 呈显著下调; PP2A mRNA 表达量随着胁迫浓度的升高先上调极显著, 后恢复至对照组水平; KIBRA 在 10 mg/L 时表达量先显著上升, 随着胁迫浓度的升高, 与对照组相比, 表达量有下降趋势, 但无显著性; FRMD mRNA 表达量在 10 mg/L 时与对照组相比上升极显著, 随着胁迫浓度的升高表达量恢复到对照组水平且无显著性差异; TEAD 表达量随着 Pb²⁺胁迫浓度的升高先上调后下降, 在 10 mg/L 上调极显著, 17.8 和 100 mg/L 时表达量显著下调。

2.4 大口黑鲈急性 Pb²⁺胁迫处理后小肠组织的表达分析

除 Lats1/2 外, 其余目的基因在 96 h 不同浓度

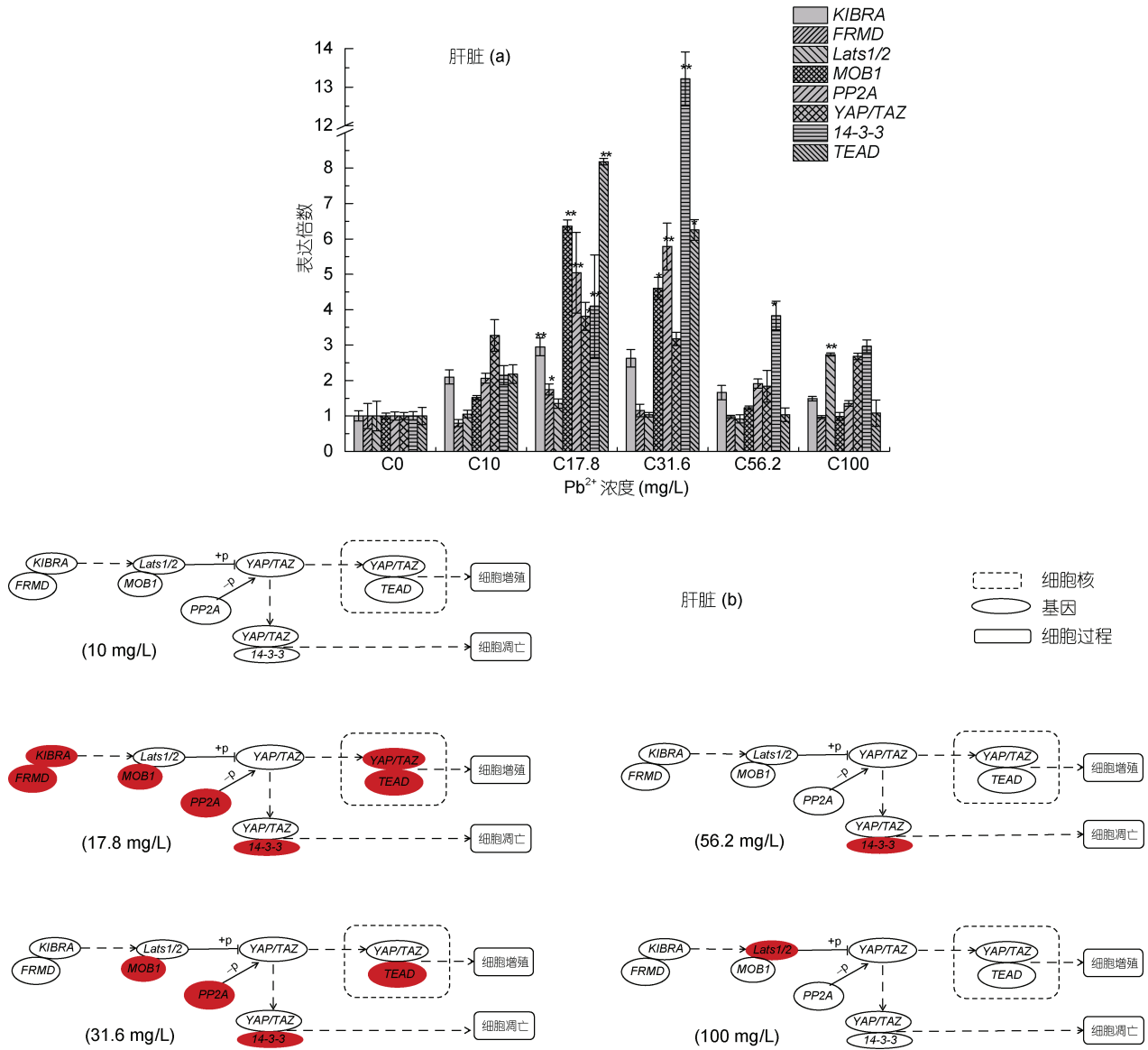


图 1 基因 *Lats1/2*、*MOB1*、*KIBRA*、*FRMD*、*14-3-3*、*TEAD*、*PP2A* 和 *YAP/TAZ* 在 96h 急性 Pb²⁺胁迫后大口黑鲈幼鱼肝脏组织中的 qPCR 分析

Fig.1 qPCR analysis of *Lats1/2*, *MOB1*, *KIBRA*, *FRMD*, *14-3-3*, *TEAD*, *PP2A*, and *YAP/TAZ* in the liver of largemouth bass under acute Pb²⁺ stress for 96h

注: 图 1a 和图 1b 中 *YAP/TAZ* 数据来源于参考文献(Qian *et al.*, 2020)。图 1b 中红色表示表达量显著上调, 白色表示表达量与对照组相比变化不显著

Pb²⁺胁迫处理后的大口黑鲈幼鱼小肠组织中表达量变化明显(图 4a, 4b)。与其他组织不同, *YAP/TAZ* 基因表达量在不同胁迫浓度下表达量均下降, 17.8、56.2 和 100 mg/L 时相比对照组表达量显著下调; *Lats1/2* 基因在所有 Pb²⁺胁迫浓度下表达量与对照组相比无显著变化; *MOB1* mRNA 表达量除 31.6 mg/L 时与对照组没有显著性差异外, 其余胁迫处理浓度下均显著下调; *14-3-3* mRNA 表达量在所有胁迫浓度下与对照组相比都显著下调, 并且在 10、17.8、56.2 和

100 mg/L 时表达量下调极显著; 随着 Pb²⁺胁迫浓度的升高, *PP2A* mRNA 表达量都下调极显著; *KIBRA* 表达量变化与 *PP2A* 类似, 在所有胁迫浓度下表达量与对照组相比均显著下调; *FRMD* 基因表达量随着胁迫浓度的增加, 先上升, 后恢复至对照组水平, 在 10 mg/L 是相比对照上升极显著, 在 17.8 mg/L 时上升显著; *TEAD* mRNA 表达量在 10、17.8 和 31.6 时相比对照组无显著变化, 随着胁迫浓度的升高, 在 56.2 和 100 mg/L 时表达量较对照组显著降低。

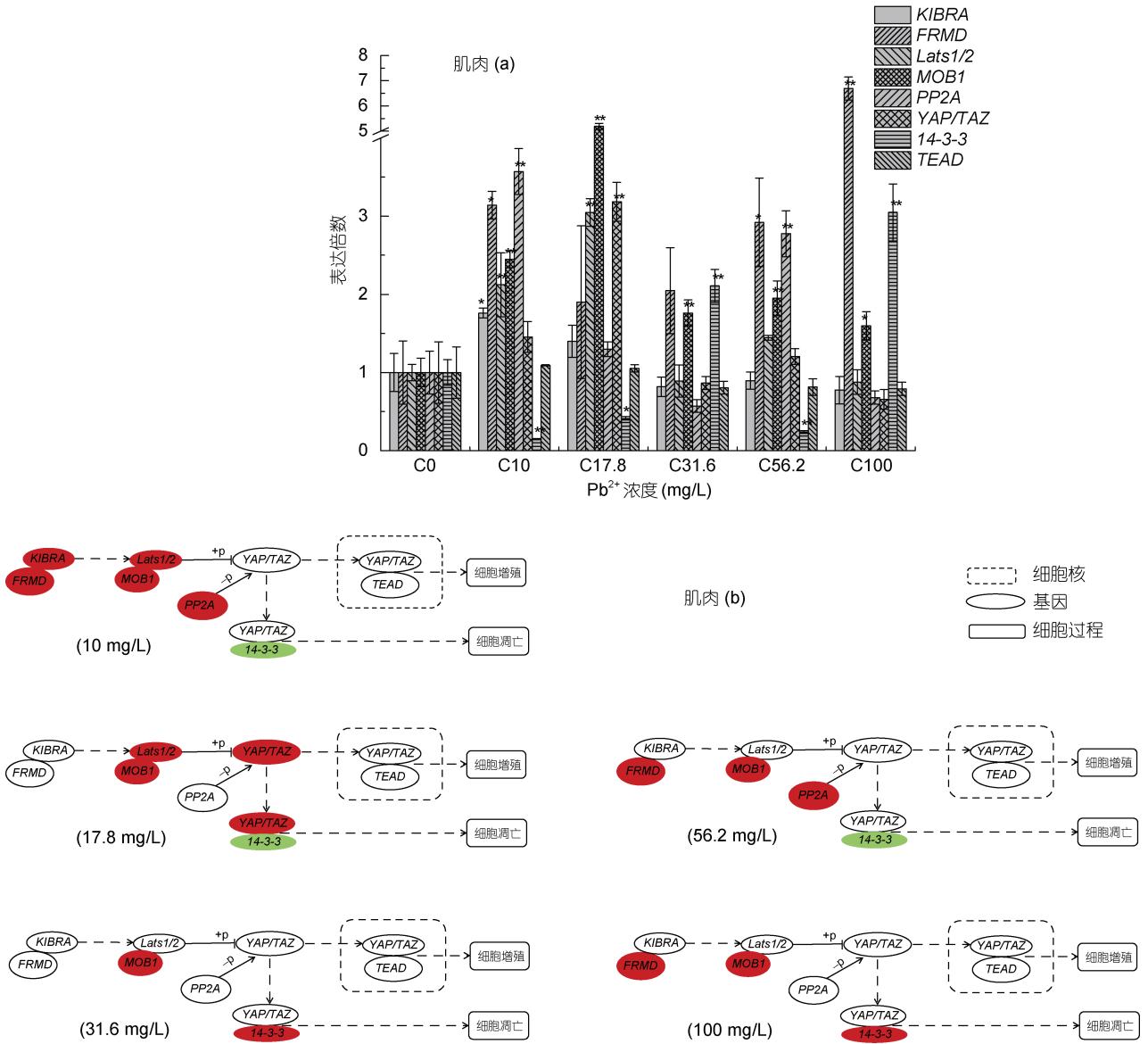


图 2 基因 *Lats1/2*、*MOB1*、*KIBRA*、*FRMD*、*14-3-3*、*TEAD*、*PP2A* 和 *YAP/TAZ* 在 96h 急性 Pb²⁺ 胁迫后大口黑鲈幼鱼肌肉组织中的 qPCR 分析

Fig.2 qPCR analysis of *Lats1/2*, *MOB1*, *KIBRA*, *FRMD*, *14-3-3*, *TEAD*, *PP2A* and *YAP/TAZ* in the muscle of largemouth bass under acute Pb²⁺ stress for 96h

注：图 2b 中红色表示表达量显著上调，绿色表示表达量显著下调，白色表示表达量与对照组相比变化不显著

3 讨论

铅是水体中常见的可持续释放的生物非必需重金属污染物，具生物蓄积性和生物放大作用(Qian *et al*, 2020)。铅离子在水体中对鱼类有较强的毒性，损伤鱼体组织，甚至可致其生长发育产生阻滞。Hippo 信号通路通过促进细胞凋亡、分化和抑制增殖来达到控制生物体生长发育过程中器官组织的大小(Agarwala *et al*, 2015)。在本实验中，不同铅离子浓度胁迫后大口黑鲈幼鱼 Hippo 信号通路中 *Lats1/2*、

MOB1、*KIBRA*、*FRMD*、*14-3-3*、*TEAD*、*PP2A* 和 *YAP/TAZ* 基因表达量在不同组织中出现了不同程度的变化，这一结果预示着铅胁迫后大口黑鲈幼鱼生长发育很有可能通过 Hippo 信号通路中这些主要调节因子来发挥作用。此外，通路中的基因表达量变化不仅与铅离子胁迫浓度相关，在不同的组织中表达量也不一致。

前期对浓度为 17.8 mg/L 铅离子胁迫大口黑鲈幼鱼后发现肝脏组织中 *YAP/TAZ* mRNA 表达量相较于对照组显著上升等(Qian *et al*, 2020)。在 Hippo 信号通

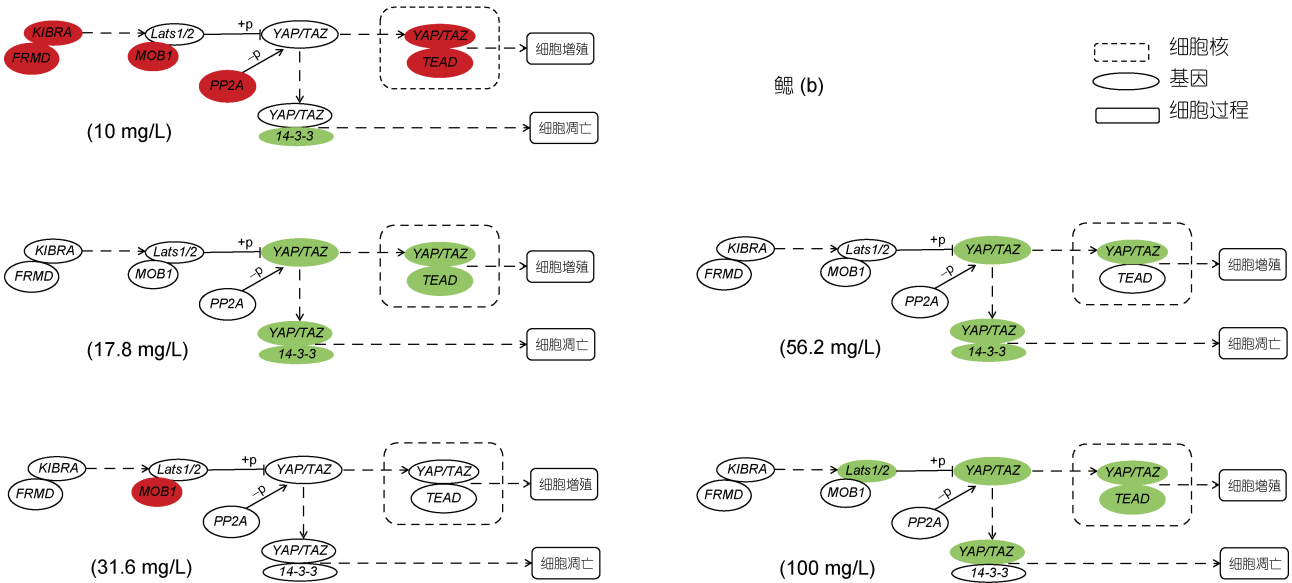
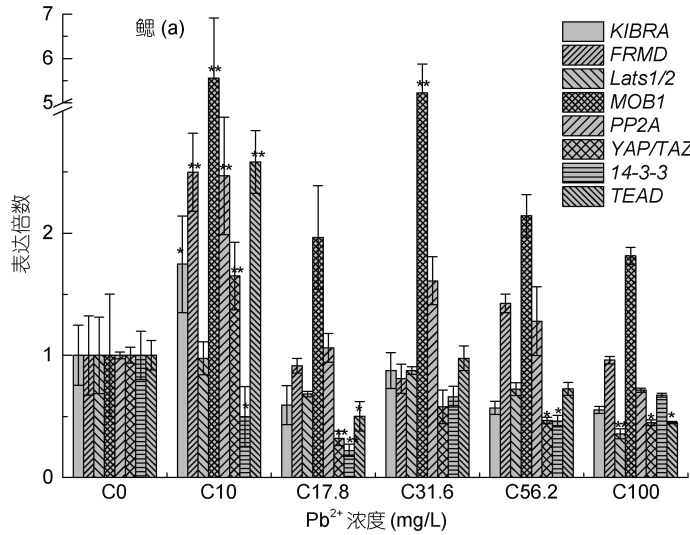


图3 基因 *Lats1/2*、*MOB1*、*KIBRA*、*FRMD*、*14-3-3*、*TEAD*、*PP2A* 和 *YAP/TAZ* 在 96h 急性 Pb²⁺胁迫后大口黑鲈幼鱼鳃组织中的 qPCR 分析

Fig.3 qPCR analysis of *Lats1/2*, *MOB1*, *KIBRA*, *FRMD*, *14-3-3*, *TEAD*, *PP2A* and *YAP/TAZ* in the gill of largemouth bass under acute Pb²⁺ stress for 96h

注: 图 3b 中红色表示表达量显著上调, 绿色表示表达量显著下调, 白色表示表达量与对照组相比变化不显著

路中, YAP/TAZ 蛋白可被 *Lats1/2* 磷酸化, 磷酸化的 YAP/TAZ 蛋白继而与胞质中的 14-3-3 特异性结合, 使得 YAP/TAZ 定位于胞质中, 并被胞质中的蛋白酶体泛素化后降解(Zhao *et al*, 2007; Lei *et al*, 2008), 进而阻滞细胞核内抑制细胞凋亡相关基因的转录, 促进细胞凋亡。而在 Hippo 通路异常情况下, 未磷酸化的 YAP/TAZ 进入细胞核, 与 TEAD 转录因子共激活和调控促进细胞增殖的相关基因转录表达(胡立桥等, 2017), 且通路的异常激活极可能诱导细胞异常增殖, 并发生组织病变甚至癌变(齐海霞等, 2020)。本实验

对不同铅离子浓度胁迫处理后的大口黑鲈幼鱼肝脏组织其他基因表达量研究发现, 10 mg/L 时表达量与对照组相比均无显著变化, 而在 17.8 mg/L 铅离子水体中 96 h 后, *MOB1*、*KIBRA*、*FRMD*、*14-3-3*、*TEAD*、*PP2A* 表达量较对照组均显著升高, 其他浓度如 31.6 mg/L 时 *MOB1*、*PP2A*、*14-3-3*、*TEAD* 表达量显著升高, 随着铅离子浓度的进一步升高, 所研究的大部分基因表达量均无显著变化, 从结果中可看出, 水体中 17.8 mg/L 铅离子浓度对大口黑鲈幼鱼肝脏组织 Hippo 信号通路的影响最大, 这可能的原因是在此浓

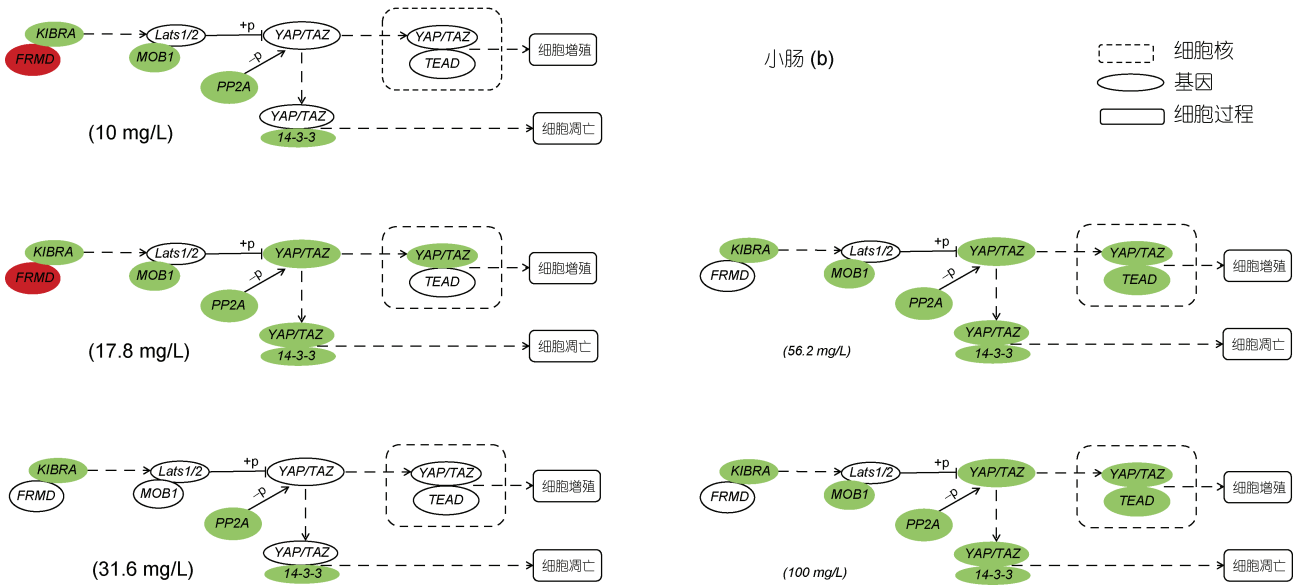
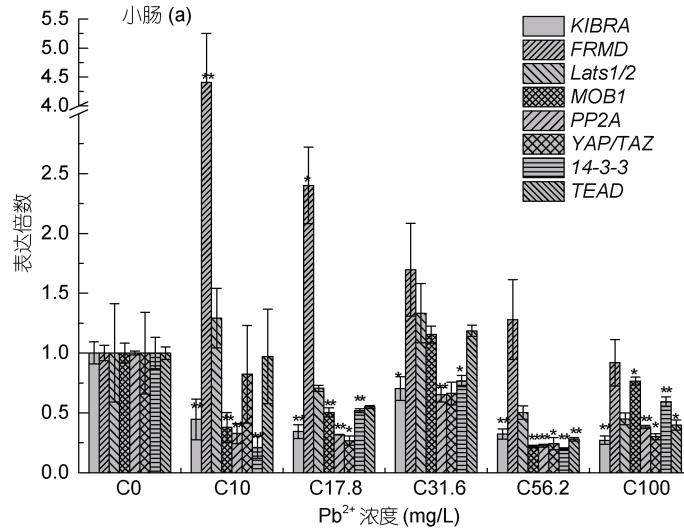


图 4 基因 *Lats1/2*、*MOB1*、*KIBRA*、*FRMD*、*14-3-3*、*TEAD*、*PP2A* 和 *YAP/TAZ* 在 96h 急性 Pb^{2+} 胁迫后大口黑鲈幼鱼小肠组织中的 qPCR 分析

Fig.4 qPCR analysis of *Lats1/2*, *MOB1*, *KIBRA*, *FRMD*, *14-3-3*, *TEAD*, *PP2A* and *YAP/TAZ* in the intestine of largemouth bass under acute Pb^{2+} stress for 96h

注: 图 4b 中红色表示表达量显著上调, 绿色表示表达量显著下调, 白色表示表达量与对照组相比变化不显著

度下, 铅离子极大地促进了 *KIBRA*、*FRMD* 和 *MOB1* 的表达, 并升高了 *KIBRA*、*FRMD* 和 *MOB1* 蛋白质合成, 且在一定程度上提高了 *LATS1/2* 的表达量(与对照组相比表达量升高, 但未达到显著水平), 我们猜测少量合成的 *LATS1/2* 在 *MOB1* 的协同作用下磷酸化部分 *YAP/TAZ*, 但由于 *PP2A* 表达量的显著上升, 可能导致 *PP2A* 蛋白合成增加, 使得 *YAP/TAZ* 去磷酸化, 因此这少量的 *YAP/TAZ* 可能在细胞质中与表达量显著升高的 *14-3-3* 特异性结合, 但可能不足以引起细胞凋亡, 而未被磷酸化或被 *PP2A* 去磷酸化的

YAP/TAZ 则进入细胞核作为共激活转录因子与表达量显著升高的 *TEAD* 调节抑制细胞凋亡因子的基因转录, 可能导致细胞增殖甚至异常增殖。此外, 在铅离子浓度为 31.6 mg/L 时, *14-3-3* 和 *TEAD* 虽都显著上升, 但 *YAP/TAZ* 表达量上升不显著, 可能的原因是高浓度的铅离子胁迫已经损伤肝细胞。

在本实验中, 肌肉组织中 *YAP/TAZ* 表达量只在 17.8 mg/L 时显著上升, 从实验结果来看, 96 h 的铅胁迫提高了 *Lats1/2* 和 *MOB1* 的表达量, 可能提高了 *Lats1/2* 蛋白质的合成, 而在此浓度下, *PP2A* 表达量

变化不显著,合成的 YAP/TAZ 在 Lats1/2 的参与下磷酸化。但奇怪的是,在此铅离子浓度下,14-3-3 基因表达量显著下降,我们推测,17.8 mg/L 铅离子浓度胁迫下可能不会导致大口黑鲈幼鱼肌肉细胞凋亡。在其他胁迫浓度下,虽然基因表达量变化与 17.8 mg/L 时不一致,但总体上来看,铅离子胁迫对肌肉细胞的凋亡或增殖可能都没有影响,如铅胁迫浓度 31.6 和 100 mg/L 时,虽然 14-3-3 表达量与对照组相比显著上升,但 YAP/TAZ 表达量却变化不显著,此外,TEAD 变化也不显著,这使得 14-3-3 不能与 YAP/TAZ 结合,而即使 YAP/TAZ 进入细胞核,由于 TEAD 表达量变化不显著,YAP/TAZ 也不能发挥共激活因子的作用。这些分子水平上的基因表达量变化的结果可能与肌肉组织对铅离子的亲和力较差有关,大量研究表明,铅离子在鱼体肌肉组织中的蓄积量小于肝脏组织(阮晓等,2001; Rogers *et al*, 2003; Patel *et al*, 2006)。这说明铅离子对 96 h 胁迫后的大口黑鲈幼鱼肌肉组织中 Hippo 信号通路的影响较小。

鳃是鱼类呼吸的主要器官,是水体中铅离子残留和蓄积的主要部位(阮晓等,2001; Rogers *et al*, 2003)。在大口黑鲈幼鱼鳃组织中,10 mg/L 铅离子胁迫 96 h 对 Hippo 信号通路影响较大,PP2A 表达量相较于对照组显著上升,可致使 YAP/TAZ 去磷酸化增加,从而导致进入鳃细胞核的 YAP/TAZ 增加,从实验结果看,鳃细胞核中 YAP/TAZ 和 TEAD 表达量都显著上升,这可能导致鳃细胞的大量增殖甚至异常增殖。随着铅胁迫浓度的提高,所研究基因大部分都相较于对照组显著下降,如在铅离子胁迫浓度 17.8 mg/L 时,YAP/TAZ、14-3-3 和 TEAD 表达量都显著下降,在其他胁迫浓度如 56.2 和 100 mg/L 时 YAP/TAZ 也都显著下降。类似的结果还出现在不同浓度铅离子胁迫 96 h 的大口黑鲈幼鱼小肠组织中,如在 56.2 和 100 mg/L 时,KIBRA、MOBI、PP2A、YAP/TAZ、14-3-3 和 TEAD 基因 mRNA 表达量相较于对照组都显著下降。目前还不清楚不同浓度铅胁迫后为什么在鳃(除 10 mg/L 铅离子胁迫外)和小肠组织中会出现这样的结果,且与肝脏和肌肉组织的表达量变化相差很大,一种可能的原因是铅离子在大口黑鲈幼鱼肝脏组织中的蓄积大于其他组织,而鳃组织在较低浓度 10 mg/L 铅离子胁迫处理 96 h 时蓄积量较大,从而导致入核的 YAP/TAZ 量增加,而在其他胁迫浓度下,可能在不到 96 h 时就已经导致鳃组织损伤,小肠组织亦同理。这应进一步实验来充分了解鳃

组织和小肠组织 Hippo 信号通路在铅胁迫后出现的这种分子机理。

大口黑鲈为底栖性鱼类,重金属铅对其器官、组织的生长发育影响较大,严重时会同程度损伤鱼体组织,在分子水平上,则表现为不同组织中相关基因表达量的变化。Hippo 信号通路中的相关基因不仅与细胞凋亡相关,还与促进细胞增殖的基因表达有关。其中,Lats1/2、MOBI 是正向调节因子,Lats1/2 磷酸化 YAP/TAZ 后,可间接促进 YAP/TAZ 的降解,最终结果致使细胞凋亡。而 PP2A 则与 Lats1/2 作用相反,使 YAP/TAZ 去磷酸化,致使进入细胞核的 YAP/TAZ 增加,最终结果致使细胞大量增殖或异常增殖甚至癌变。本实验中,不同浓度铅离子 96 h 胁迫处理大口黑鲈幼鱼后,肝脏组织(胁迫浓度 17.8 mg/L)和鳃组织(胁迫浓度 10 mg/L)是都出现了 YAP/TAZ 与 TEAD 表达量显著上升,这预示着此时肝脏组织和鳃组织有可能在铅离子的作用下出现了细胞的异常增殖。

4 结论

铅胁迫处理显著影响了大口黑鲈幼鱼 Hippo 信号通路中的部分基因在肝脏、肌肉、鳃和小肠组织中 mRNA 表达量。通过对 Lats1/2、MOBI、KIBRA、FRMD、14-3-3、TEAD、PP2A 和 YAP/TAZ 基因在肝脏、肌肉、鳃和小肠组织中的 mRNA 表达量变化进行分析,发现所研究基因的 mRNA 表达量具有组织和浓度特异性,且在肝脏组织中表达量变化显著的基因都呈上调,而在肌肉、鳃和小肠组织中,部分基因在某些铅离子胁迫浓度下呈显著下降。结果显示不同浓度的铅胁迫对大口黑鲈幼鱼肝脏、肌肉、鳃和小肠组织中 Hippo 信号通路有较大的影响。研究结果可为大口黑鲈对铅离子胁迫后的 Hippo 信号通路研究提供理论依据,并可为其他鱼类对铅离子的分子响应机制研究提供一定参考。此外,结果显示在鳃和小肠组织中 KIBRA、MOBI 等部分基因 mRNA 表达量在某些铅离子胁迫浓度下相较于对照组呈显著下降,与肝脏组织中的表达量变化相反,可能在不同组织中的表达存在不同的调控机制,在不同组织中铅离子是如何影响 Hippo 信号通路的机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 石 琼, 范明君, 张 勇, 2014. 中国经济鱼类志. 武汉: 华中科技大学出版社, 281—283

- 龙 昱, 罗永巨, 肖 俊等, 2016. 重金属胁迫对鱼类影响的研究进展. 南方农业学报, 47(9): 1608—1614
- 刘芳芳, 2013. 淡水鱼类中重金属污染及其与环境相关性分析. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文
- 齐海霞, 柴艳芬, 2020. Hippo 信号通路相关分子与肿瘤发生的研究进展. 医学综述, 26(4): 683—689
- 阮 晓, 郑春霞, 王 强等, 2001. 重金属在罗非鱼淡水白鲢和鲤鱼体内的蓄积. 农业环境保护, 20(5): 357—359
- 孙 奕, 张晓蓉, 2018. PP2A 在成骨细胞和脂肪细胞中的作用. 医学综述, 24(8): 1468—1472
- 宋 林, 2019. KIBRA 调节外泌体的分泌及其机制研究. 山东: 山东大学博士学位论文
- 项黎新, 邵健忠, 孟 真, 2001. 六种重金属离子胁迫诱导鱼类细胞凋亡的研究. 生物化学与生物物理进展, 28(6): 866—869
- 胡立桥, 周兆才, 田 伟, 2017. Hippo 信号通路结构生物学研究进展. 遗传, 39(7): 659—674
- 麻明彪, 杜延义, 陶律延等, 2020. Hippo 信号通路与炎症的研究进展. 中国免疫学杂志, 36(6): 752—758
- 潘天扬, 房树林, 闫玉莲等, 2016. 水体中铅对长江上游 6 种鱼类的急性中毒效应. 淡水渔业, 46(3): 34—39
- Agarwala S, Duquesne S, Liu K *et al*, 2015. Amotl2a interacts with the Hippo effector Yap1 and the Wnt/ β -catenin effector Lef1 to control tissue size in zebrafish. *eLife*, 4: e08201
- Badouel C, Meneill H, 2011. Snapshot: the hippo signaling pathway. *Cell*, 145(3): 484—484.e1
- Di Benedetto A, Mottolese M, Sperati F *et al*, 2016. The Hippo transducers TAZ/YAP and their target CTGF in male breast cancer. *Oncotarget*, 7(28): 43188—43198
- Ferraro M V M, Fenocchio A S, Mantovani M S *et al*, 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, 27(1): 103—107
- Gibault F, Corvaisier M, Bailly F *et al*, 2016. Non-photoinduced biological properties of verteporfin. *Current Medicinal Chemistry*, 23(11): 1171—1184
- Hong F S, Wu C, Liu C *et al*, 2007. Direct evidence for interaction between lead ions and kidney DNA from silver crucian carp. *Chemosphere*, 68(8): 1442—1446
- Lei Q Y, Zhang H, Zhao B *et al*, 2008. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 28(7): 2426—2436
- Mager E M, Wintz H, Vulpe C D *et al*, 2008. Toxicogenomics of water chemistry influence on chronic lead exposure to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 87(3): 200—209
- Patel M, Rogers J T, Pane E F *et al*, 2006. Renal responses to acute lead waterborne exposure in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 80(4): 362—371
- Qian B Y, Xue L Y, Qi X *et al*, 2020. Gene networks and toxicity/detoxification pathways in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver induced by acute lead stress. *Genomics*, 112(1): 20—31
- Rajamanickam V, Muthuswamy N, 2008. Effect of heavy metals induced toxicity on metabolic biomarkers in common carp (*Cyprinus Carpio* L.). *Maejo International Journal of Science and Technology*, 2(1): 192—200
- Ribeiro A M, Risso W E, Fernandes M N *et al*, 2014. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3): 645—657
- Rogers J T, Richards J G, Wood C M, 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 64(2): 215—234
- Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O *et al*, 2011. Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. *Cell*, 144(5): 782—795
- Schmittgen T D, Livak K J, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101—1108
- Sokolova I M, Lannig G, 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research*, 37(2—3): 181—201
- Song J G, Wang T Z, Chi X C *et al*, 2019. Kindlin-2 inhibits the hippo signaling pathway by promoting degradation of MOB1. *Cell Reports*, 29(11): 3664—3677.e5
- Tepass U, 2009. FERM proteins in animal morphogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(4): 357—367
- Zhang Y M, Wang Y J, Yu R L *et al*, 2008. Effects to heavy metals Cd^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} , on DNA damage of loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Frontiers of Biology in China*, 3(1): 50—54
- Zhao B, Li L, Tumaneng K *et al*, 2010. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF^{-TRCP}. *Genes & Development*, 24(1): 72—85
- Zhao B, Tumaneng K, Guan K L, 2011. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature Cell Biology*, 13(8): 877—883
- Zhao B, Wei X M, Li W Q *et al*, 2007. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, 21(21): 2747—2761

EFFECT OF ACUTE Pb²⁺ STRESS ON THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN HIPPO SIGNALING PATHWAY IN JUVENILE LARGEMOUTH BASS *MICROPTERUS SALMOIDES*

QIAN Bao-Ying, LU Ming-Min, QIAN Hong-Ji, PAN Yu-Qi, LIN Le-Qi,
XU Fang-Ying, SHI Gang-Gui, QI Xin
(School of Life Science, Taizhou University, Taizhou 318000, China)

Abstract To study the genes in Hippo signaling pathway of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides*, the mRNA expressions of genes that involved in Hippo signaling pathway in the liver, muscle, gill and intestine of the fish species undergone acute Pb²⁺ stress in different concentrations (0, 10, 17.8, 31.6, 56.2, and 100 mg/L) for 96 h was investigated, and the genes included *KIBRA*, *FRMD*, *Lats1/2*, *MOBI*, *PP2A*, *YAP/TAZ*, *14-3-3*, and *TEAD*. Results show that in the tissue of liver, the mRNA expression levels of these genes were increased compared to the control group, and the genes expressions were up-regulated significantly at Pb²⁺ concentration of 17.8 mg/L in 96 h, except for *Lats1/2*. In the muscle, the expression of *MOBI* was increased significantly at all the different Pb²⁺ concentrations. In the gill, the mRNA expressions of genes including *YAP/TAZ*, *TEAD*, *PP2A*, *MOBI*, *KIBRA*, and *FRMD* up-regulated dramatically at 10 mg/L in 96 h. In the tissue of intestine, *PP2A*, *KIBRA*, and *14-3-3* expressions were significantly down-regulated in this study. Therefore, the regulation of mRNA expression of related genes in Hippo signaling pathway had a molecular mechanism to respond against acute Pb²⁺ stress in largemouth bass.

Key words largemouth bass *Micropterus salmoides*; acute Pb²⁺ stress; Hippo signaling pathway; gene expression