

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20150515001

陈曦, 洪响生, 吴慧敏, 等. 稀有鮡鲫神经发育相关基因的克隆、同源性分析及组织分布[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(1): 173-181

Chen X, Hong X S, Wu H M, et al. Cloning, homology analysis, and distribution of neural development related genes of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(1): 173-181 (in Chinese)

# 稀有鮡鲫神经发育相关基因的克隆、同源性分析及组织分布

陈曦<sup>1,2</sup>, 洪响生<sup>1,2</sup>, 吴慧敏<sup>1,2</sup>, 查金苗<sup>2,\*</sup>, 覃剑晖<sup>1</sup>

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070

2. 中国科学院生态环境研究中心 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085

收稿日期: 2015-05-15 录用日期: 2015-06-01

**摘要:** 作为重要的本土模式鱼类, 稀有鮡鲫神经发育相关的生物学背景几乎空白, 导致其在神经毒性评价方面的应用受到限制。本文从稀有鮡鲫脑部克隆得到了神经发育相关的神经生长因子(nerve growth factor; ngf)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor; bdnf)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein; gfap)、髓鞘相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein; mag)、P0蛋白(myelin protein zero; mpz)、微管蛋白 $\alpha 1$  ( $\alpha 1$ -tubulin)和Y染色体性别决定基因10(SRY-box containing gene 10; sox10)等基因的片段, 并对其进化树及表达谱进行了分析。序列分析表明, bdnf的核苷酸序列与鲫鱼、鲤鱼的同源性最高, 均为98%; gfap、ngf、mag和 $\alpha 1$ -tubulin与斑马鱼的同源性最高, 分别为95%、92%、92%和96%; mpz与黑头软口鲮的同源性最高, 为94%; sox10与鲮鱼同源性最高, 达97%。表达谱分析结果表明, ngf、bdnf、mag、mpz、 $\alpha 1$ -tubulin和sox10基因均在脑组织中表达量最高, gfap在脊髓中表达量最高, 上述结果为这一模式鱼类在神经发育学和神经毒性效应评价方面的应用奠定了基础。

**关键词:** 神经系统发育相关基因; 稀有鮡鲫; 克隆; 同源性分析; 组织分布

文章编号: 1673-5897(2016)1-173-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Cloning, Homology Analysis, and Distribution of Neural Development Related Genes of Chinese Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*)

Chen Xi<sup>1,2</sup>, Hong Xiangsheng<sup>1,2</sup>, Wu Huimin<sup>1,2</sup>, Zha Jinmiao<sup>2,\*</sup>, Qin Jianhui<sup>1,2</sup>

1. College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Received 15 May 2015 accepted 1 June 2015

**Abstract:** The poverty in knowledge of neurodevelopment of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) limited its application as a native model fish in neurotoxicity studies and risk assessment. In this case, partial of nerve growth factor (ngf), brain-derived neurotrophic factor (bdnf), glial fibrillary acidic protein (gfap), myelin-associated glycoprotein (mag), myelin protein zero (mpz),  $\alpha 1$ -tubulin and SRY-box containing gene 10 (sox10) were cloned from

brain of rare minnow, and their sequences and transcriptional profile were also studied. Blasting results demonstrated that the sequences of *gfap*, *ngf*, *mag* and  $\alpha 1$ -tubulin in rare minnow shared the highest identities with those of zebrafish (*Danio rerio*) (95%, 92%, 92% and 96%, respectively). *bdnf* gene shared the highest homology with the nucleotide sequence of *Carassius auratus* and *Cyprinus carpio* (98%), whereas *mpz* and *sox10* were more homogeneous with the nucleotide sequence of *Pimephales promelas* (94%) and *Hypophthalmichthys nobilis* (97%) respectively. Besides, the transcriptional profile revealed highest abundance of *ngf*, *bdnf*, *mag*, *mpz*,  $\alpha 1$ -tubulin and *sox10* mRNA in the brain and of *gfap* in the spinal cord of Chinese rare minnow. These results provided a foundation for future studies in neurodevelopment and neurotoxicity assessment using rare minnow as a native model fish.

**Keywords:** neurodevelopment related genes; rare minnow (*Gobiocypris rarus*); clone; homology analysis; transcriptional profile

神经系统的发育主要包括特定神经元的增殖、分化、迁移以及死亡,神经突产生、突触发生和髓鞘形成等多级过程。其中任何环节受到干扰都会产生持续的影响<sup>[1-2]</sup>。神经生长因子(nerve growth factor; *ngf*)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor; *bdnf*)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein; *gfap*)、髓鞘相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein; *mag*)、P0 蛋白(myelin protein zero)、微管蛋白 $\alpha 1$  ( $\alpha 1$ -tubulin)、Y 染色体性别决定基因 10(SRY-box containing gene 10)是参与神经系统发育过程的重要基因。*ngf* 是第一个发现的神经营养因子,具有调节神经元发育和分化的作用。*bdnf* 是含量最丰富的神经营养因子,在哺乳动物脑中广泛存在且参与多种调控过程,例如神经元的分化、突触的形成,还与学习记忆功能密切相关<sup>[3-4]</sup>。*gfap* 是星形胶质细胞的标志性蛋白,在神经发育和成熟中发挥重要的作用<sup>[5-6]</sup>。*mag* 是中枢神经系统中一个小的跨膜糖蛋白,占髓鞘蛋白总量的 1% 左右,可以被当作少突胶质细胞的生物标志物<sup>[7]</sup>,*mpz* 为形成髓鞘的主要结构原件的调控基因,作用过程包括调控施旺细胞的细胞膜附着,包裹住轴突,形成紧凑的髓鞘,且可以刺激受伤轴突的再生,影响髓鞘的结构和功能<sup>[8]</sup>。 $\alpha 1$ -tubulin 是  $\alpha$ -tubulin 基因家族的微管蛋白之一,对运动神经元功能的维持以及轴突和树突的生长起着重要的作用。*Sox10* 基因与神经胶质细胞的发育密切相关,在神经脊的发育神经色素的衍生方面发挥重要作用<sup>[9]</sup>。

目前神经发育相关基因的研究还处于初级阶段,大多集中在表达水平和功能上的研究。Fan 等<sup>[10]</sup>采用定量 PCR 技术,构建了斑马鱼  $\alpha 1$ -tubulin、*bdnf* 等基因的早期发育阶段表达谱,揭示了早期发育过程中,发育时间与基因表达的关系。Bernar-

dos<sup>[11]</sup>发现斑马鱼在 12 hpf 时就可以检测到 *gfap*。新生大鼠暴露一定浓度的毒死蜱,*ngf* 基因 mRNA 的表达水平受到强烈抑制,*mag* 的表达量在出生后 7 d(PND7)显著升高<sup>[12]</sup>;Capiotti 等<sup>[13]</sup>对斑马鱼研究发现,腺苷受体、DARPP-32 和 *bdnf* 表达于斑马鱼发育早期,受到咖啡因作用后,由于机体补偿机制,腺苷受体和基因表达的上调;Wang<sup>[14]</sup>研究了尼古丁对新生大鼠神经营养因子 *bdnf* 和 *ngf* 的影响,*bdnf* 和 *ngf* 表达于海马体和额皮质,尼古丁暴露后,与对照组相比,所有实验组的神经营养因子表达量都显著降低。然而多个神经发育相关基因的系统研究基本上未见报道,大大限制了神经发育功能标志物以及相关机制的研究。

本研究中,使用我国特有的一种小型鲤科鱼类——稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)作为研究对象。稀有鮡鲫主要分布于我国长江上游地区,它体积小,易于培养,性成熟快,繁殖周期短,在实验室条件下可以周年繁殖,产卵多、孵化率高,是一种理想的实验材料<sup>[15-16]</sup>。基于稀有鮡鲫为我国特有鱼类,全基因组缺乏,特别是对于神经发育相关基因研究基本上处于空白,因此本文采用 RT-PCR 的方法,克隆了稀有鮡鲫神经系统发育相关的 7 个基因的片段,开展了同源性分析,同时构建相应定量 PCR 方法,确定了上述基因在稀有鮡鲫不同组织表达分布特征,为神经系统发育的研究提供了分子生物学资料,同时也为外源性化合物对鱼类神经系统发育的毒理学影响等方面的研究提供了研究方法和基础资料。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 试剂

Trizol reagent、反转录酶 M-MLV、Oligo (dT)、dNTP、Rnasin、纯化试剂盒等均购于美国 Promega 公司。其他常用试剂均为国产分析纯。

## 1.2 稀有鮡鲫的饲养

所用稀有鮡鲫均饲养于本实验室。养殖用水为曝气除氯并且经过活性炭过滤的自来水(pH=7.2~7.6),硬度为44.0~61.0 mg CaCO<sub>3</sub> · L<sup>-1</sup>,温度为(25±1) °C,光照周期为16 h:8 h(昼:夜)。每天投喂新孵化的丰年虫(*Artemia nauplii*)和水蚯蚓。

## 1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

取稀有鮡鲫于冰上麻醉,迅速解剖取出脑、肝脏、鳃等组织,使用 Trizol 法提取组织总 RNA 并置于-80 °C 超低温冰箱保存备用。

按照 promega 公司 M-MLV 的逆转录说明书合成 cDNA 第一链,所有试剂均购自美国 promega 公司。总 RNA 2 μg, Oligo(dT) 2 μL, 无核酸酶水补齐至 15 μL 混匀,于 70 °C 温育 5 min, 迅速于冰中冷却。然后依次加入:5 μL 5x Reaction Buffer M-MLV, 1.25 μL dNTP mix, 1 μL RNAasin, 2 μL M-MLV 和 ddH<sub>2</sub>O 0.75 μL, 总共 25 μL 体系, 整个过程在冰上进行。混匀后置于 42 °C 温育 1 h, 并于-20 °C 冻存。

## 1.4 基因克隆

根据 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 中与稀有鮡鲫亲缘关系较近的已知鱼类的目的基因序列, 利用 DNAMAN6.0.40 软件进行比对, 选择其保守区设计引物, 以脑组织 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 总反应体系为 25 μL: 1 μL cDNA 模板、1 μL 上游引物、1 μL 下游引物、12.5 μL mastermix 和 9.5 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 最后延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测并将产物送去北京生物工程技术有限公司进行测序。

## 1.5 序列分析及系统发育树的构建

所测序列在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 上进行 BLAST 分析, 判定是否为目的基因, 同时将序列提交至 GenBank 数据库。

将基因序列利用 DNAMAN 软件分析, 推导出氨基酸序列。从 GenBank 上下载不同物种基因的氨基酸序列, 利用 Clustal X 1.81 软件进行序列的比较, 并用 Mega 5.1 软件构建系统发育树。

## 1.6 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 采用荧光定量 PCR 仪 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA), 内参基因使用管家基因 β-actin, 根据测序得到的序列设

计定量 PCR 引物。定量 PCR 反应体系为: 2 μL cDNA 模板、0.4 μL 正向引物、0.4 μL 反向引物、10 μL GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix 和 7.2 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序为 95 °C, 10 min; 40 个循环: 95 °C 15 s, 57 °C 40 s, 72 °C 30 s; 最后 1 个循环做出熔解曲线: 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 60 s。每个样品 3 次重复。目的基因的相对表达量根据 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算。

## 1.7 数据处理与分析

所有数据均通过 SPSS16.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 分析处理。荧光定量 PCR 结果均表示为平均值±标准偏差 (means ± S.E.), 作图软件使用 Origin-Pro 8.0。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 稀有鮡鲫神经发育相关基因的克隆

采用 RT-PCR 技术对稀有鮡鲫脑组织中与神经发育相关的 7 个基因 (ngf、bdnf、gfap、mag、mpz、α1-tubulin、sox10) 进行克隆, 片段大小分别为 281, 413, 554, 260, 283, 368 和 393 bp。电泳结果表明, 各个 PCR 产物均为单一明亮的条带 (图 1), 且实验重复性较好, 可以满足接下来实验的要求。将测序得到的片段序列提交至 GenBank 数据库, 获得登录序列号 (表 1)。

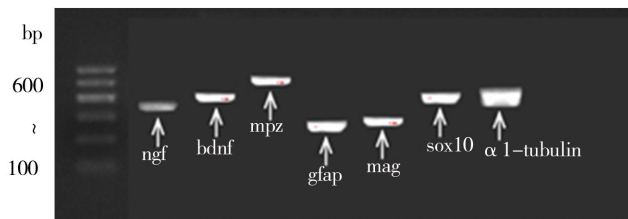


图 1 稀有鮡鲫各基因片段琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of gene segments of *Gobiocypris rarus*

将序列在 NCBI 上做 Blastn 分析, 与其他典型鱼类的同源性分析结果统计于表 2。可以看出, bdnf 的核苷酸序列与鲫鱼、鲤鱼的同源性最高, 均为 98%; gfap、ngf、mag 和 α1-tubulin 与斑马鱼的同源性最高, 分别为 95%、92%、92% 和 96%; mpz 与黑头软口鲦的同源性最高, 为 94%; sox10 与鳙鱼同源性最高, 达 97%。

将获得的 7 个基因的核苷酸序列开展了 Blastp 分析, 结果发现与稀有鮡鲫 bdnf 基因相似的鱼类数量最多, 因此以 bdnf 为例, 运用软件 Mega5.1 构建

表 1 PCR 所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used for PCR

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	GenBank 序列号 GenBank no.	产物大小/bp Product size/bp
<i>ngf</i>	Forward: GGGAGGGAAATAAAACC	KP178114	281
	Reverse: CAGCACACACACGCAAG		
<i>bdnf</i>	Forward: GTTGACCTGTATGCCTC	KP178115	413
	Reverse: CGATCTTCCTTTTGCTA		
<i>gfap</i>	Forward: TCTAAGCCAGACTTGACC	KP178112	554
	Reverse: CACAACCTATGCTCCTCTTC		
<i>mag</i>	Forward: GTTCAACTACTACACGCAC	KP178111	260
	Reverse: CTTTTTATTATCTGACCGA		
<i>mpz</i>	Forward: GTGACGGTTCTATCCTGA	KP316209	283
	Reverse: TTCCTTTGCCTTTCTTGC		
$\alpha 1$ -tubulin	Forward: GAAGATGCTGCCAATAACT	KP178113	368
	Reverse: GGTGTAAGTAGGACGCTCA		
<i>sox10</i>	Forward: GAGGCGTTCAGTCAGGT	KP294528	393
	Reverse: GGCTCTTGTAAATGCGATT		

表 2 稀有鮎鲫与其他已知鱼类相应核苷酸序列的同源性比较

Table 2 Homology comparison of nucleotide sequences between *Gobiocypris rarus* and other fish species

基因名称 Gene name	物种名称 Specie name	同源性 Homology	GenBank 序列号 GenBank no.
<i>ngf</i>	稀有鮎鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	KP178114
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	92%	BC164993.1
	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	78%	XM004068938.1
	孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>	78%	XM008408951.1
	稀有鮎鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	KP178115
<i>bdnf</i>	鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	98%	EU828243.1
	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	98%	L27171.1
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	97%	NM131595.2
	黑棘鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	89%	KF636413.1
	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	89%	XM004067040.1
	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	89%	AY074888.1
	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	88%	GU108576.1
	欧洲鳗鲡 <i>Anguilla anguilla</i>	87%	AY762996.1
	稀有鮎鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	KP178112
	鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	94%	L23876.1
<i>gfap</i>	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	93%	AY151284.1
	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	81%	AY170626.1
	罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i>	78%	DQ001950.1
<i>mag</i>	稀有鮎鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	KP178111
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	92%	NM001007062.1
<i>mpz</i>	稀有鮎鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	KP316209
	黑头软口鲮 <i>Pimephales promelas</i>	94%	FJ755481.1
$\alpha 1$ -tubulin	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	90%	NM194361.2
	稀有鮎鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	KP178113
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	96%	NM001105126.2
<i>sox10</i>	稀有鮎鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	KP294528
	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	92%	KC480581.1
	鳙鱼 <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	97%	KC847696.1
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	92%	BC163883.1

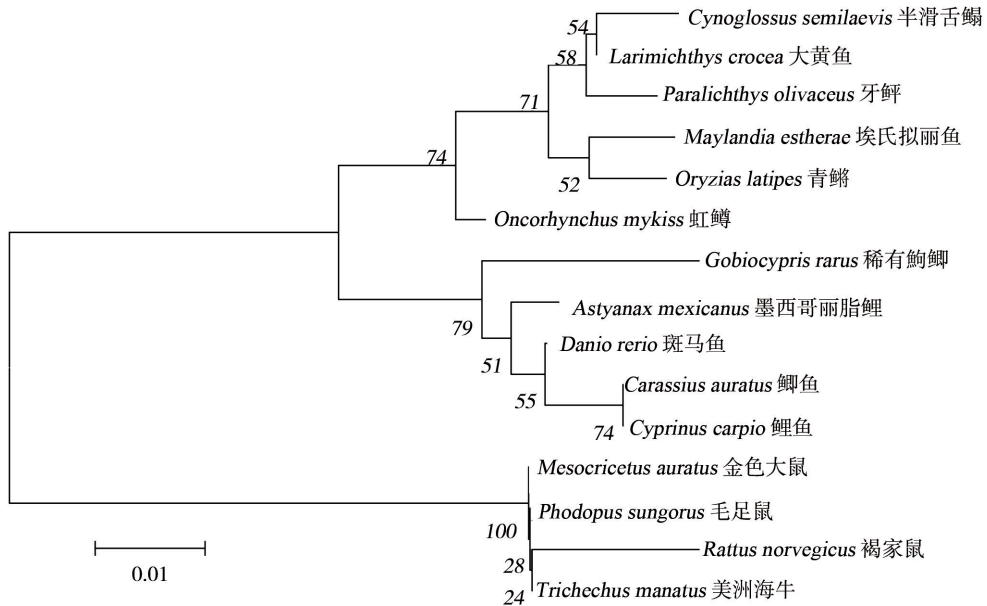


图 2 基于 NJ (neighbor-joining) 法构建的稀有鮡鲫与其他物种 bdnf 基因的核苷酸系统树

注: 涉及物种包括半滑舌鲷(XP\_008308227.1), 大黄鱼(KKF28103.1), *Paralicthys olivaceus* 牙鲆(AAL71888.1), 埃氏拟丽鱼(AEY99594.1), 青鳉(XP\_004067087.1), 虹鳟(ACY54685.1), 墨西哥丽脂鲤(XP\_007246974.1), 斑马鱼(NP\_571670.2), 鲫鱼(ACF35050.1), 鲤鱼(Q90322.1), 金色大鼠(ACN32758.1), 毛足鼠(BAO51936.1), 褐家鼠(ACU43589.1), 美洲海牛(AEY99501.1)。

Fig. 2 Phylogenetic tree of bdnf gene sequence between *Gobiocypris rarus* and other species based on NJ (neighbor-joining) method  
 Note: *Cynoglossus semilaevis* (XP\_008308227.1), *Larimichthys crocea* (KKF28103.1), *Paralicthys olivaceus* (AAL71888.1), *Maylandia estherae* (AEY99594.1), *Oryzias latipes* (XP\_004067087.1), *Oncorhynchus mykiss* (ACY54685.1), *Astyanax mexicanus* (XP\_007246974.1), *Danio rerio* (NP\_571670.2), *Carassius auratus* (ACF35050.1), *Cyprinus carpio* (Q90322.1), *Mesocricetus auratus* (ACN32758.1), *Phodopus sungorus* (BAO51936.1), *Rattus norvegicus* (ACU43589.1), *Trichechus manatus* (AEY99501.1).

了基因序列的核苷酸系统发育进化树(图 2)。由图可知, 稀有鮡鲫与斑马鱼、鲫鱼等鲤科鱼类亲缘关系最接近, 与大鼠等哺乳类关系较远。

基于获得的序列片段, 使用 Primer Premier 5.0 软件, 设计定量 PCR 引物, 引物序列见表 3, 并构建相应定量 PCR 方法, 测定了 ngf、bdnf、gfap、mag、mpz、 $\alpha$ 1-tubulin 和 sox10 基因在稀有鮡鲫脑、脊髓、眼睛、肝脏、性腺、鳃和肌肉 7 个组织中的 mRNA 表达量(图 3)。ngf 基因在成鱼不同组织的表达量表现为: 在脑中表达量最高, 性腺、眼和脊髓中也有一定表达, 在鳃和肌肉中表达量较低; bdnf 基因在成鱼不同组织的表达量表现为: 在脑中高表达, 其他 6 个组织中几乎不表达; gfap 基因在成鱼不同组织的表达量表现为: 在脑、脊髓和眼中表达水平较高, 其余组织中几乎不表达; mag 基因在成鱼不同组织的表达量表现为: 在脑中出现大量表达, 脊髓中表达较低, 其他组织中几乎不表达;  $\alpha$ 1-tubulin 基因在成鱼不同组织的表达量表现为: 在脑、脊髓和眼中均有所表达, 在肝脏、性腺、肌肉中表达极少;

表 3 qRT-PCR 所用的引物序列

Table 3 Primer sequences used for qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	产物大小/bp Product size/bp
ngf	Forward: CAGGTCGTCCTCAAAAAGT	109
	Reverse: AGGGAATAAAACCAAAGC	
bdnf	Forward: TAATACTGTCACAAACGCT	101
	Reverse: GGAATACAAAACTACCTA	
mag	Forward: CGGCTCTGAGACCATCCGCTTG	84
	Reverse: GCCACACCTCCGATAGTCCCA	
$\alpha$ 1-tubulin	Forward: TAGGGTGGTGTGTGTGG	125
	Reverse: TGGAGCGTCTGTCTGTG	
mpz	Forward: GTGATGCCAAGAACCCACCTGA	114
	Reverse: CAACGCCAATAATAGCCCTGT	
sox10	Forward: TCTGGAGGCTGCTGAA	106
	Reverse: CGTGGCTGGTATTTGT	
gfap	Forward: GAGGAGTGGTATCGCTCAAAG	135
	Reverse: AGATCCAGGTCACAGGTCAG	
$\beta$ -actin	Forward: CTATGTTGGTGACGAGGCTCA	82
	Reverse: CCCAGTTGGTGACAATACCG	

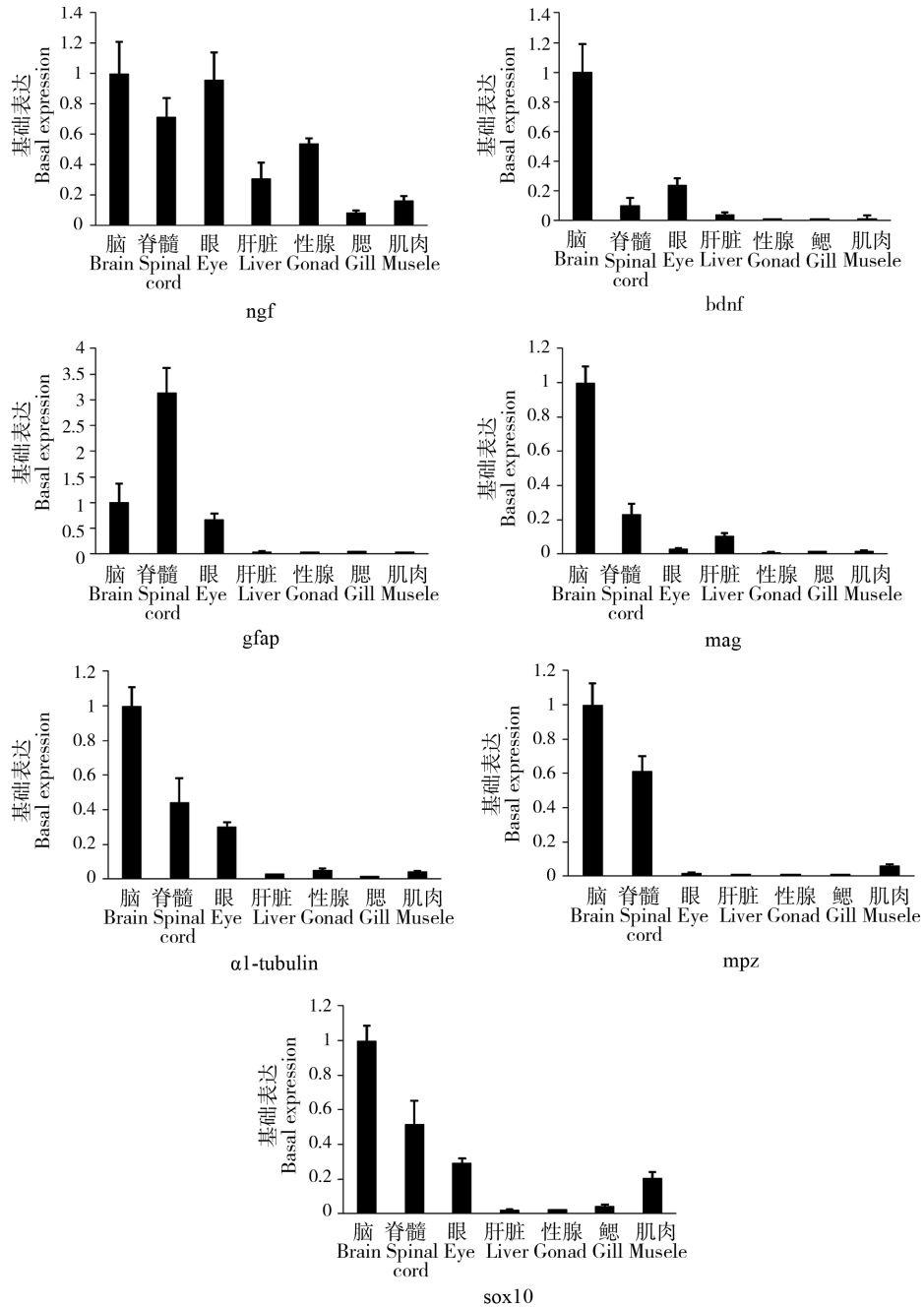


图 3 *ngf*、*bdnf*、*gfap*、*mag*、 $\alpha 1$ -*tubulin*、*mpz* 和 *sox10* 基因在稀有鮡鲫组织中的表达

Fig. 3 Expression of *ngf*, *bdnf*, *gfap*, *mag*,  $\alpha 1$ -*tubulin*, *mpz* and *sox10* mRNA in a panel tissues of rare minnow

*mpz* 除了在脑中表达,脊髓中表达量也相对较高,其他组织中几乎不表达;*sox10* 在脊髓中表达,表达量明显低于脑中,同时在眼和肌肉中也可以检测到,但表达量低于脊髓。结果表明 7 个基因在脑中表达量相对最高,其他组织中表达存在显著的差异。

### 3 讨论 (Discussion)

稀有鮡鲫作为我国特有的一种小型鲤科鱼类,

基于个体小、繁殖快、基因纯等多个优点,越来越多的应用于遗传、生理和环境科学等研究领域。然而目前稀有鮡鲫背景分子生物基础相对薄弱,尤其是神经系统发育相关的基础研究处于空白阶段。本文克隆了稀有鮡鲫神经系统发育相关的 7 个基因:*ngf*、*bdnf*、*gfap*、*mag*、*mpz*、 $\alpha 1$ -*tubulin* 和 *sox10*。序列比对发现,稀有鮡鲫与斑马鱼的同源性较好,所有基因都和斑马鱼相应的核苷酸序列的同源性超过 90%。

神经元是构成神经系统的基本单位,  $\alpha 1$ -tubulin 是合成细胞骨架、维持神经元运动的一种重要的微管蛋白, ngf 和 bdnf 是维持和促进神经元发育和分化的重要的两个神经营养因子。ngf 是从小鼠下颌中分离得到的, 是人们发现的第一个神经营养因子<sup>[17]</sup>, 随后人们相继获得了多种动物的 ngf 基因片段, 序列比较发现, 在不同的物种间, ngf 的氨基酸和 mRNA 序列高度保守<sup>[18]</sup>; bdnf 是含量最丰富的神经营养因子。Leibrock 等<sup>[19]</sup>首次从猪脑中克隆出 bdnf 基因, 1994 年余云开等<sup>[20]</sup>完成了人和猪脑组织中 bdnf 片段的克隆和序列测定, 此外, 还进行了爬行类<sup>[21]</sup>、鸟类<sup>[22]</sup>及其他哺乳动物<sup>[23-24]</sup> bdnf 基因的序列测定和分析。研究发现, bdnf 在哺乳类甚至整个脊椎动物中高度保守。本研究中, bdnf 与鲫鱼的同源性最高, 达到 98%,  $\alpha 1$ -tubulin、ngf 和 bdnf 与斑马鱼的同源性分别为 96%、92% 和 97%, 提示上述基因在稀有鮡鲫与其他鱼类中高度保守。每个神经元都有且只有一条轴突, 它在离开神经元胞体一定距离后会生成髓鞘, mag 和 mpz 在髓鞘的形成和维持、髓鞘化的启动过程中发挥了至关重要的作用, 在受到外界干扰时, 基因的表达量会降低<sup>[12]</sup>。

神经胶质细胞是神经系统中数量最多的细胞, 约占脑体积的一半以上。gfap 和 sox10 均参与星形胶质细胞的发育过程, sox 基因家族成员都含有一个保守的 HMG (High mobility group) 盒<sup>[25]</sup>, sox10 是 sox 基因家族的一员, 它不但能够促进神经胶质发育, 而且能影响感觉神经元和自主神经的分化<sup>[26]</sup>, 本研究结果显示, 稀有鮡鲫 gfap 与鲫鱼和斑马鱼的基因同源性分别达到 94% 和 93%, 其 sox10 基因与鳙鱼的同源性为 97%, 表明它们在稀有鮡鲫与其他鱼类中具有较高的保守型。上述基因的克隆为我们进一步研究它们在遗传学、基因的表达和调控方面提供了数据, 也为稀有鮡鲫在生态毒理学和风险评估方面的应用奠定了基础。

本文我们提取了脑、脊髓、眼、肝脏、性腺、鳃和肌肉 7 个组织, 对基因进行了组织表达分布研究。结果表明, bdnf 和 mag 在脑组织中高表达, 在其他组织表达量很少甚至不表达, 具有组织表达特异性。gfap 在稀有鮡鲫脊髓中表达量最高, 其次是脑和眼组织。gfap 是构成胶质细胞支架的主要部分, 其表达量的高低与胶质细胞的活性状态密切相关<sup>[27]</sup>, 文献报道 gfap 参与西加那利蜥蜴 (*Gallotia gallotia*) 中枢神经系统的再生过程<sup>[28]</sup>, 视网膜是中枢神经系统

的外周组织, 同样 gfap 在视网膜细胞中检测到了的表达<sup>[29]</sup>。另外在壁虎研究中发现同样 gfap 主要表达于脑和脊髓中<sup>[30]</sup>。脊髓是控制躯体及内脏运动和感觉的低级中枢, 它联系了脑与外周神经系统, 控制着基本的神经反射。本文 gfap 基因表达结果表明稀有鮡鲫与蜥蜴、壁虎相类似, 表达于脑、脊髓和视网膜中。提示 gfap 在稀有鮡鲫体内与其他物种有类似功能。对于 ngf 的研究仅局限于神经系统, 但是最近在生殖系统等非神经系统中也检测到了 ngf 的表达, 表明 ngf 对生殖系统的生长发育产生作用<sup>[31]</sup>。Ren 等<sup>[32]</sup>在羊卵巢的颗粒细胞、膜细胞、间质细胞及黄体细胞中都检测到了 ngf 的表达, 表明 ngf 在卵泡发育和黄体功能中发挥重要作用。Shi<sup>[33]</sup>在金仓鼠子宫进行研究, 结果显示, ngf 在子宫内膜上皮细胞、腺细胞中有表达。本文对于 ngf 表达检测发现, 除脑、脊髓和眼之外, ngf 在稀有鮡鲫的性腺组织中也有较高的表达, 表明 ngf 不仅与神经发育相关, 同时可能与性腺细胞发育相关。

本文获得了 ngf、bdnf、gfap、mag、mpz、 $\alpha 1$ -tubulin 和 sox10 基因序列信息和组织中分布, 为补充和完善背景生物学信息以及深入研究神经系统的发育机制提供基础, 同时为进一步研究环境污染物质神经毒性作用机制提供了分子生物学基础。

通讯作者简介: 查金苗(1975-), 男, 博士, 研究员, 主要研究兴趣包括水生生物模型体系的构建和发展、水环境生物毒性测试方法、环境内分泌干扰物的筛选技术研究、环境污染物对水生生物分子毒理机制和水生态系统完整性评估方法等, 在国内外学术刊物上发表高水平论文 70 余篇, SCI 论文 40 余篇。

#### 参考文献 (References):

- [1] Cowden J, Padnos B, Hunter D, et al. Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal projection area in zebrafish embryos [J]. *Reproductive Toxicology*, 2012, 33(2): 165-173
- [2] Selderslaghs I W, Hooyberghs J, Blust R, et al. Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2013, 37: 44-56
- [3] Cunha C, Brambilla R, Thomas K L. A simple role for BDNF in learning and memory? [J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2010, 3(1): 1-14
- [4] Park H, Poo M M. Neurotrophin regulation of neural cir-

- cuit development and function [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2013, 14(1): 7–23
- [5] Gomes F C, Garcia-Abreu J, Galou M, et al. Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice [J]. *Glia*, 1999, 26(2): 97–108
- [6] Nielsen A L, Jorgensen A L. Structural and functional characterization of the zebrafish gene for glial fibrillary acidic protein, GFAP [J]. *Gene*, 2003, 310: 123–132
- [7] Arquint M, Roder J, Chia L S, et al. Molecular cloning and primary structure of myelin-associated glycoprotein [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(2): 600–604
- [8] Zhao L, Liu Q J, Chen H, et al. The effect of 2,5-hexanedione on myelin protein zero expression, and its mitigation using ginkgo biloba extract [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2011, 24(4): 374–382
- [9] Kelsh R N. Sorting out Sox10 functions in neural crest development [J]. *BioEssays*, 2006, 28(8): 788–798
- [10] Fan C Y, Cowden J, Simmons S O, et al. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2010, 32(1): 91–98
- [11] Bernardos R L, Raymond P A. GFAP transgenic zebrafish [J]. *Gene Expression Patterns*, 2006, 6(8): 1007–1013
- [12] Betancourt A M, Burgess S C, Carr R L. Effect of developmental exposure to chlorpyrifos on the expression of neurotrophin growth factors and cell-specific markers in neonatal rat brain [J]. *Toxicological Sciences*, 2006, 92(2): 500–506
- [13] Capiotti K M, Menezes F P, Nazario L R, et al. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2011, 33(6): 680–685
- [14] Wang X Y. The exposure to nicotine affects expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in neonate rats [J]. *Neurological Sciences*, 2015, 36(2): 289–295
- [15] Liang X F, Wang M, Chen X, et al. Endocrine disrupting effects of benzotriazole in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) in a sex-dependent manner [J]. *Chemosphere*, 2014, 112: 154–162
- [16] 曹文宣, 王剑伟. 稀有鮡鲫——一种新的鱼类实验动物 [J]. *实验动物科学与管理*, 2003, 20(S1): 96–99
- Cao W X, Wang J W. Rare minnow: A new laboratory animal in China [J]. *Laboratory Animal Science and Management*, 2003, 20(S1): 96–99 (in Chinese)
- [17] Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcom as 37 and 180 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1954, 40(10): 1014–1018
- [18] Scott J, Selby M, Urdea M, et al. Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor [J]. *Nature*, 1983, 302(5908): 538–540
- [19] Leibrock J L F, Hohn A, Hofer M, et al. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor [J]. *Nature*, 1989, 341: 149–152
- [20] 余云开, 华仲慰, 郭建荣, 等. 人及猪脑源性神经营养因子基因克隆[J]. *科学通报*, 1994, 39(1): 76–78
- Yu Y K, Hua Z W, Guo J R, et al. Cloning of brain-derived neurotrophic factor gene of human and pigs [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1994, 39(1): 76–78 (in Chinese)
- [21] 曹玫, 杨玉华, 张义正. 大凉疣螈脑源性神经营养因子(BDNF)基因的克隆与序列分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2002, 8(3): 314–316
- Cao M, Yang Y H, Zhang Y Z. Cloning and sequence analysis of brain-derived neurotrophic factor gene of *Tylo-triton taliangensis* [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2002, 8(3): 314–316 (in Chinese)
- [22] 杨光, 陈红卫, 杨玉华, 等. 四川山鹧鸪脑源性神经营养因子(BDNF)基因的扩增与序列分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2000, 37: 195–198
- Yang G, Chen H W, Yang Y H, et al. The amplification and sequence analysis of the brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene from Sichuan Partridge [J]. *Journal of Sichuan University: Natural Science Edition*, 2000, 37: 195–198 (in Chinese)
- [23] 林峰, 杨玉华, 张义正, 等. 小熊猫脑源性神经营养因子(BDNF)基因的克隆与序列分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 1997, 34(3): 367–370
- Lin F, Yang Y H, Zhang Y Z, et al. Molecular cloning and sequencing of the brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene from lesser panda [J]. *Journal of Sichuan University: Natural Science Edition*, 1997, 34(3): 367–370 (in Chinese)
- [24] 林峰, 杨玉华, 张义正, 等. 马来熊脑源性神经营养因子基因编码区的克隆与序列分析[J]. *动物学报*, 1998, 44(1): 102–106
- Lin F, Yang Y H, Zhang Y Z, et al. Molecular cloning and sequence of the coding region of brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene from *Helarctos malayanus* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, 44(1): 102–106 (in Chinese)
- [25] Rehberg S, Lischka P, Glaser G, et al. Sox10 is an active



- nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for sox10-mediated transactivation [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(16): 5826–5834
- [26] 章卓, 苏建明, 肖调义. Sox10 在感觉神经元发育中的作用[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(10): 94–106
- Zhang Z, Su J M, Xiao T Y. A genetic investigation of the role of sox10 in sensory neuron development [J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2010, 30(10): 94–106 (in Chinese)
- [27] Bigini P, Bastone A, Mennini T. Glutamate transporters in the spinal cord of the wobbler mouse [J]. *Neuroreport*, 2001, 12(9): 1815–1820
- [28] Romero-Alemán M M, Mónzon-Mayor M, Yanes C, et al. Radial glial cells, proliferating periventricular cells, and microglia might contribute to successful structural repair in the cerebral cortex of the lizard *Gallotia galloti* [J]. *Experimental Neurology*, 2004, 188(1): 74–85
- [29] Sassoe P M, Panzanelli P, Artero C, et al. Comparative study of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the retina of some representative vertebrates [J]. *European Journal of Histochemistry*, 1992, 36(4): 467–477
- [30] 高德宏. 多疣壁虎 GFAP 基因的克隆及其脊髓横断损伤后 GFAP 的表达变化[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010
- Gao D H. The molecular cloning of glial fibrillary acidic protein in *Gekko japonicus* and its expression changes after spinal cord transection [D]. *Huazhong University of Science and Technology*, 2010 (in Chinese)
- [31] 李犇, 李秀雯, 宋默识, 等. 神经生长因子及其受体在雌性哺乳动物生殖系统中的作用[J]. 科技咨询, 2009, 3: 9–10
- Li B, Li X W, Song M S, et al. The effects of nerve growth factor and its receptors in female mammalian reproductive system [J]. *Science & Technology Information*, 2009, 3: 9–10 (in Chinese)
- [32] Ren L, Mohamed S M, Weng Q, et al. Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) and its receptors (TrkA and p75LNGFR) in the reproductive organs of Shiba goats [J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2005, 51(3): 399–404
- [33] Shi Z. Studies on expression and regulation of nerve growth factor and inhibin / activin in reproductive organs of the female golden hamster [D]. Tokyo: Tokyo University of Agriculture and Technology, 2004 ◆