

The Cloning and Expression Analysis of Different Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) Subtypes on *Paralichthys olivaceus*

Chunli Wang, Tongtong Lin

College of Marine Life, Ocean University of China, Qingdao Shandong
Email: tutu802355@163.com

Received: Dec. 7th, 2015; accepted: Dec. 20th, 2015; published: Dec. 29th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Glycogen synthase kinase-3 mainly includes two subtypes of GSK-3 α and GSK-3 β , whose catalytic activity area is highly homologous. GSK-3 β can participate in multiple signaling pathways, including Wnt signal, affect the survival of normal cells and participate in the occurrence and development of the tumor. In this paper, we got GSK-3 α , GSK-3 β and GSK3 β -like subtypes of *Paralichthys olivaceus* through gene cloning. NCBI Blast and NJ method built the system evolutionary tree; results showed that the GSK3 β -like subtypes are peculiar to the marine fish. Meanwhile, Megalign protein sequence alignment and SMART structure prediction revealed that the three different subtypes are highly homologous in functional domain. But, the qRT-PCR results showed that GSK-3 β presents significantly higher expression than the other two subtypes during embryonic development, which may be related to that GSK-3 β plays a major role in a variety of biological processes.

Keywords

Paralichthys olivaceus, GSK-3, Wnt, Embryonic Development

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)糖原合成酶激酶-3 (GSK3)不同亚型的克隆及表达研究

王春丽, 林彤彤

中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛
Email: tutu802355@163.com

收稿日期: 2015年12月7日; 录用日期: 2015年12月20日; 发布日期: 2015年12月29日

摘要

糖原合成酶激酶-3 (Glycogen Synthase Kinase-3, GSK3)主要有GSK-3 α 和GSK-3 β 两种亚型,二者在催化活性区域具有高度的同源性。GSK3 β 可以参与包括Wnt信号在内的多个信号通路的调控,影响正常细胞的生存并参与肿瘤的发生与发展。本文以牙鲆为材料,通过基因克隆得到GSK-3 α , GSK-3 β 和GSK3 β -like 3个亚型,NCBI序列比对并经NJ法构建系统进化树,结果显示GSK3 β -like亚型是海洋鱼类所特有的。同时,Megalign蛋白序列比对及SMART结构预测显示3个不同亚型的功能结构域高度同源;但qRT-PCR结果显示,GSK3 β 在胚胎发育时期的表达量明显高于另外两个亚型,这可能与GSK3 β 在多种生物学过程中发挥主要作用相关。

关键词

牙鲆, 糖原合成酶激酶-3, Wnt信号, 胚胎发育

1. 引言

糖原合成酶激酶-3 (GSK-3)是一种在进化上非常保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,普遍存在于哺乳动物真核细胞中[1]。它最早是在兔骨骼肌的分次提取物中被分离出来,在哺乳动物中主要有两种亚型,即GSK-3 α 和GSK-3 β ,二者在催化区域具有高达98%的同源性[2],在N端和C端的非催化功能区同源性较差,是参与肝糖代谢的关键酶。

GSK3 β 功能多样,研究也最多。不但可以通过对底物的磷酸化实现对Wnt信号通路的调控[3],还可以在PI3K/Akt信号通路中作为下游蛋白,与AKT发生直接作用[4]。同时,它还是胰岛素信号通路的关键调节因子。GSK3 β 可以根据底物不同参与多个信号通路的调控,如底物磷酸化,亚细胞定位等[5]。通过与多种蛋白及转录因子相互作用,参与细胞的增值、分化及凋亡等一系列生理过程[6]。近年来研究发现,它还在癌症、神经精神类疾病的发病机制中具有重要作用,能够在癌细胞转录、细胞周期加速、肿瘤细胞的侵袭与转移等多个过程中起调控作用,GSK3 β 是众多恶性肿瘤中的关键激酶,虽然在肿瘤发生中的具体效应还不确定,在肿瘤发生中的作用已经被充分证实[7]。众多研究发现,肿瘤中无论Wnt/ β -catenin通路还是PI3K/Akt信号通路通常都会处于异常活跃状态,在许多肿瘤如胃癌,结肠直肠癌、胰腺癌中都可检测到活化的GSK3 β 的高表达情况[8][9]。因此GSK-3 β 在近年来成为多种疾病治疗中备受关注的可能靶点,受到越来越多研究者的重视[10]。

本篇文章通过分子克隆得到牙鲆GSK-3基因的GSK-3 α , GSK-3 β 和GSK-3 β -like3种亚型,并通过序列比对,蛋白结构预测及系统进化等对牙鲆GSK-3的3个不同亚型进行初步分析,并通过qRT-PCR研究了牙鲆GSK-3基因在早期胚胎发育过程中的时空表达变化。

2. 材料及方法

2.1. 胚胎样品的获取及处理

体外自然受精的牙鲆卵至于23 $^{\circ}$ C(上下浮动1 $^{\circ}$ C)的新鲜海水中孵育,期间保持充气,并隔日更换新

鲜海水。分别取受精卵、2 细胞、16 细胞、桑椹胚、高囊胚、原肠期(原肠早期、原肠晚期)、神经胚、尾芽、出膜期、出膜后、出膜 12 h、出膜 1 d 和出膜 36 h 共 14 个胚胎发育早期典型时期的胚胎和仔鱼置于 1.5 ml RNA-free 的离心管中, 每管固定 30 枚胚胎。经 PBS 两次清洗后置于液氮中速冻, 最后转移至 -80°C 中保存备用(注: 因为没有关于胚胎发育时期该基因表达量的相关报道, 我们只是随机挑取了 14 个胚胎发育时期进行检测)。

2.2. 总 RNA 的提取及定量模板的体外合成

利用 Trizol 试剂法提取牙鲈各胚胎组织总 RNA, 经苯酚/氯仿初步纯化后利用异丙醇沉淀 RNA。初步纯化的 RNA 加入 DNaseI 去除 DNA 杂质后利用 RNA clean 纯化试剂盒(博迈德)除去残留的蛋白质, 最后利用 M-MLV 反转录体系(Takara)体外反转录得到定量模板 cDNA。

2.3. 蛋白功能结构域预测分析

利用 SMART 在线网站初步预测牙鲈 GSK 蛋白的保守功能结构域, 然后绘制牙鲈 GSK 蛋白家族的一级结构示意图。

2.4. 系统进化分析

通过 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=GSK>)获得哺乳动物(人及家鼠), 两栖类(非洲蟾蜍), 淡水鱼类(斑马鱼)及部分海水鱼(半滑舌鳎, 大黄鱼, 眶锯雀鲷)的 GSK3 基因氨基酸序列, 利用 MEGA6 软件, 将上述 7 个物种的氨基酸序列与我们经分子克隆得到的牙鲈 GSK3 基因各亚型的氨基酸序列以邻位相连法(NJ)进行系统进化分析, 并构建系统进化树。

2.5. qRT-PCR

体外反转录得到的牙鲈胚胎各时期的 cDNA, 稀释到 20 ng/ μl 作为荧光定量 PCR 的模板。通过 IDT 在线网站设计各基因的荧光定量引物, GSK3 α -Fw: GGTAGGATGTTTGGGAGATGAG; GSK3 α -Rv: ACCACGGCCACACATAAA。GSK3 β -Fw: CTCTGCCCTGGTTCATCTTT; GSK3 β -Rv: CTCTGCCCTGGTTCATCTTT。GSK3 β -like-Fw: CAGCTAACTCGACCCTCATC; GSK3 β -like-Rv: TGGTACTGAACT。内参基因选取的是 18S rRNA, 其中 18S rRNA-Fw: GGTAACGGGGAATCAGGGT; 18S rRNA-Rv: TGCCTTCCTTG GATGTGGT。但因为 18S rRNA 在组织中表达量极高, 我们首先通过等比稀释将其模板稀释 1000 倍。运用 Light Cycler 480 (Roche Applied Science)进行 qRT-PCR 扩增, 反应条件是 95°C 预变性 (5 min), 然后(95°C 15 s, 60°C 45 s)共 45 个循环。每个样品重复 3 次, 取其平均值。

2.6. 数据分析

通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对 3 个基因 qRT-PCR 所得到的结果进行数据处理, 根据分析得到的 GSK3 基因和 18S rRNA 内参基因的拷贝数, 计算出目的基因的相对表达量。最后用 Prism6 软件分析作图并利用 SPSS 20.0 软件进行方差显著性分析。

3. 结果

3.1. 牙鲈 GSK3 三种亚型基因的克隆及蛋白功能结构域

通过 PCR 扩增发现牙鲈 GSK3 基因包含 3 个亚型, GSK3 α 基因全长 1323 bp, 编码 440 个氨基酸; GSK3 β 基因全长 1278 bp, 编码 425 个氨基酸; GSK3 β -like 基因全长 1320 bp, 编码 439 个氨基酸(图 1)。

1 ATGAGCGGCAGCGGGCGGGCCAGGGCCAGCTCATTGCTGAGCCTCCCGGAGCTCCCGGATCCGCTGCAGCCGGC
 1 M S G S G R A R A S S F A E P P G A P G S A A A G
 76 GCCGGATCAGCAGTGGCCGGCGAAGCTCGACAGGAAAACTGGGGCTCCACAAGCCACTGGGAGCAGCTCGACG
 26 A G S A V A G G S S T G K T G A P Q A T G S S S T
 151 AGCTTTGGCAATTTGAAACTGCCAGAGACAGTGGCAAAGTGACGACGGTGGTAGCTACACCGGGCCAGGGCCCC
 51 S F G N L K L P R D S G K V T T V V A T P G Q G P
 226 GATCGCCCTCAGGAAGTGTCTACACAGACATAAAGGTTATAGGAAATGGCTCCTTTGGTGTGGTCTACCAAGCT
 76 D R P Q E V S Y T D I K V I G N G S F G V V Y Q A
 301 CGCCTCATTGACAGCCAGGAGATGGTGGCAATTAAGAAAAGTTCTCCAAGACAAGAGGTTAAGAATAGGGAAGCTG
 101 R L I D S Q E M V A I K K V L Q D K R F K N R E L
 376 CAAATTATGAGGAAATTGGACCACTGCAATATTGTGAGGCTACGTTACTTCTTACTCCAGTGGTGAGAAGAAA
 126 Q I M R K L D H C N I V R L R Y F F Y S S G E K K
 451 GATGAAGTGTATTTGAATCTGGTGTGGATTACGTCCCAGAGACAGTGTACAGGGTAGCTCGGCACTTCAACAAG
 151 D E V Y L N L V L D Y V P E T V Y R V A R H F N K
 526 GCCAAGACAACCATCCCCATCATCTATGTTAAGGTGTACATGTACCAGCTGTCCGCAGTCTGGCTTATATCCAT
 176 A K T T I P I I Y V K V Y M Y Q L F R S L A Y I H
 601 TCCCAGGGCGTGTGTACAGAGACATCAAGCCCCAGAACCTTCTGGTGGACCCGGAGACGGCCATCCTCAAAGCTC
 201 S Q G V C H R D I K P Q N L L V D P E T A I L K L
 676 TGTGACTTTGGCAGTGCTAAGCAGCTAGTTCGCGGGGAGCCGAATGTGTCCTATATCTGCTCAGGTAATATCGT
 226 C D F G S A K Q L V R G E P N V S Y I C S R Y Y R
 751 GCCCCAGAGCTCATCTTTGGTGCCACTGACTACACGTCCAACATTGACATCTGGTCCGGGGGCTGCGTGTGGCC
 251 A P E L I F G A T D Y T S N I D I W S A G C V L A
 826 GAGCTGCTGCTGGCCAGCCATCTTCCCCGGGATAGTGGTGTGGACCAGCTAGTAGAGATCATCAAGTTCTG
 276 E L L L G Q P I F P G D S G V D Q L V E I I K V L
 901 GGGACACCGACAAGGGAGCAAATCCGGGAGATGAACCCGAACTACACAGAGTTCAAATTTCCACAAATCAAAGCA
 301 G T P T R E Q I R E M N P N Y T E F K F P Q I K A
 976 CACCCTTGACAAAAGGTGTTAAGCCTCGTACTCCACCAGAGGCCATTGCCCTCTGCTCTCGACTGCTGGAATAC
 326 H P W T K V F K P R T P P E A I A L C S R L L E Y
 1051 ACGCCAGTACTAGACTCTCTCTCTGGAGGCATGTGCACACGCCTTCTTTGACGAGCTGCGCCAGCCCAACACC
 351 T P V T R L S P L E A C A H A F F D E L R Q P N T
 1126 CGTCTGCCAGTGGACGAGAAGTGGCGCTCCTCTTCAACTTCAGTCCTGTTGAGCTGTCTATTTCAGCCCCAGTTG
 376 R L P S G R E L P L L F N F S P V E L S I Q P Q L
 1201 AACTCCACTCATTCTCCTCAGCTCGTGCACAGACATCGCCTGCCTCACATGAGGGCAGTGTCCAGACAGT
 401 N S T L I P P H A R A Q T S P A S H E G S V P D S
 1276 ACCGCCAGCCAGCTCAGCACCTGGATCCATCAACAACAGCACCTGA
 426 T A Q P S S A P G S I N N S T *

(a)

1 ATGTCGGGTCGGCCAGGACCACATCCTTCGCGGAGAGCTGCAAACCAGTGCCGCAGCCCTCCGCTTTCGGCAGC
1 M S G R P R T T S F A E S C K P V P Q P S A F G S
76 ATGAAAGTCAGCAGGGATAAAGATGGAAGCAAGTAACAACAGTTGTGGCCACTCCGGGCAAGGCCGACCGG
26 M K V S R D K D G S K V T T V V A T P G Q G P D R
151 CCACAGGAGGTGAGCTACACGGACACCAAGGTCATCGGTAACGGCTCGTTCGGCGTCGTCTACCAGGCTAAATC
51 P Q E V S Y T D T K V I G N G S F G V V Y Q A K L
226 TGCGACTCCGAGAGCTGGTGGCCATCAAGAAGTCTGCAAGACAAGAGTTCAAGAACCGTGAGCTGCAGATC
76 C D S G E L V A I K K V L Q D K R F K N R E L Q I
301 ATGAGGAAGTTGGACCACTGCAACATAGTCCGCTGCGTTACTTCTTCTACTCCAGTGGTGATAAGAAAGATGAA
101 M R K L D H C N I V R L R Y F F Y S S G D K K D E
376 GTGTATCTGAACCTGGTCTGGACTACGTTCCCTGAGACTGTCTACAGAGTGGCAAGACTACAGCCGAGCCAAA
126 V Y L N L V L D Y V P E T V Y R V A R H Y S R A K
451 CAGACCCTGCCATGGTTTTGTCAAGTTGTACATGTACCAGCTGTTCCAGGAGCCTGGCCTACATCCATTCAATT
151 Q T L P M V F V K L Y M Y Q L F R S L A Y I H S F
526 GGGATCTGCCATCGGGACATCAAACCCAGAATCTGCTGCTGGACCCGGAGACTGCTGTGCTCAAGCTCTGTGAC
176 G I C H R D I K P Q N L L L D P E T A V L K L C D
601 TTTGGCAGTGCTAAGCAGCTGGTCCGTGGAGAGCCAAATGTGTCCTACATATGCTCTCGTACTATCGAGCCCT
201 F G S A K Q L V R G E P N V S Y I C S R Y Y R A P
676 GAGCTCATCTTTGGGGCCACTGACTACACTTCCAGTATAGACGTGTGGTCAGCTGGCTGCGTACTGGCAGAGTTG
226 E L I F G A T D Y T S S I D V W S A G C V L A E L
751 TTGCTAGGGCAACCAATCTTTCCTGGTGACAGTGGAGTGGATCAGTTGGTTGAAATCATCAAGTTCTCGGCACC
251 L L G Q P I F P G D S G V D Q L V E I I K V L G T
826 CCGACTCGAGAGCAGATCCGCGAGATGAACCCCACTACACCGAGTCAAGTTCCCCAGATCAAGGCACATCCT
276 P T R E Q I R E M N P N Y T E F K F P Q I K A H P
901 TGGACTAAGGTGAGTCAACAGGTGTTCCGGCCGCGCACGCCCCCGAGGCCATCGCCCTGTGCTCTCGTCTGCTG
301 W T K V S Q Q V F R P R T P P E A I A L C S R L L
976 GAGTACACACCCACGGCCCGCTCACTCCCCTGGAGGCTGCGCACACTCCTTCTTTGATGAGCTGCGCGAACCT
326 E Y T P T A R L T P L E A C A H S F F D E L R E P
1051 AACGTCAAACCTGCCAACGGGAGAGAGAAGCCCTCCCTCTTCAACTTACCACCCAAGAATTATCCAGTAATCCC
351 N V K L P N G R E K P S L F N F T T Q E L S S N P
1126 TCTTTGGCCTCCATACTCATCCCTGCCATGCCCGCAGCCAGGCCTCCGCCTCCACCCCAACCAACCTCTGCC
376 S L A S I L I P A H A R S Q A S A S T P T N T S A
1201 ACCACAGATGGCAGCAGCACAGAGCGAGGTCCCAGCACCACCACCGCCTCTGCCTCGGCATCAAACCTCCACCTCC
401 T T D G S S T E R G P S T T T A S A S A S N S T S
1276 TGA
426 *

(b)


```

1   ATGAGCGGCAGCGGGCGGCCAGGACCAGCTCGTTTGTGTGAGCCGCCAGGTGTTCCGGGAGCCGCCGTGCGTCC
1   M S G S G R P R T S S F A E P P G V P G A A A A S
76  GCCGCCGATCAGCCGCTGCCGTGGGGAGCAGCACAGGAAAGTCCGGGGTCCCTCAGGCCCTCCGGCACCAGCTCG
26  A A G S A A A V G S S T G K S G V P Q A S G T S S
151 TCGGGATGCTCGAACCTGAAGCTCGCTCGAGACAGCGGCAAGGTGACGACAGTGGTGCCACACCGGGTCAGGGA
51  S G C S N L K L A R D S G K V T T V V A T P G Q G
226 CCAGACCGTCCACAGGAAGTCTTTACTGACATCAAGGTGATTGGTAATGGGTCGTTCGGTGTGGTGTACCAG
76  P D R P Q E V S Y T D I K V I G N G S F G V V Y Q
301 GCTCGGCTCATCGACAGCCAGGAGATGGTGGCCATCAAAAAGTTCTGCAGGATAAGAGTTCAAGAATCGTGAG
101 A R L I D S Q E M V A I K K V L Q D K R F K N R E
376 CTACAGATCATGAGGAAGCTGGATCACTGCAACATTGTCAGACTACGTTACTTCTTACTCCAGTGGTGAGAAG
126 L Q I M R K L D H C N I V R L R Y F F Y S S G E K
451 AAAGATGAAGTGTACCTCAACCTGGTGTGGACTTTGTCCCTGAGACGGTCTACAGGGTGCCAGGCATTTAAC
151 K D E V Y L N L V L D F V P E T V Y R V A R H F N
526 AAGCCAAGAGCATCATTCTATCATATATGTGAAGGTGTACATGTACCAGTTGTTTCGCAGCCTGGCTTATATC
176 K A K S I I P I I Y V K V Y M Y Q L F R S L A Y I
601 CATTCCCAGGGTGTGTGCACAGAGACATCAAGCCCCAGAACCTGCTTGTGCGACCCAGAGACTGCCATCCTCAAA
201 H S Q G V C H R D I K P Q N L L V D P E T A I L K
676 CTGTGCGACTTCGGCAGCGCCAAGCAGCTGGTCCGCGGTGAGCCCAACGTGTCGTATATCTGCTCACGGTATTAT
226 L C D F G S A K Q L V R G E P N V S Y I C S R Y Y
751 CGAGCCCCTGAGTTAATTTTCGGTGCCACAGACTACACAGCAAACATTGACATCTGGTCAGCAGGCTGCGTTCTC
251 R A P E L I F G A T D Y T A N I D I W S A G C V L
826 GCGGAGCTGCTGCTGGGACAGCCATATTCGCCGGAGACAGTGGAGTGGACCAACTGTAGAGATTATCAAGGTT
276 A E L L L G Q P I F P G D S G V D Q L V E I I K V
901 CTAGGAACACCAACACGAGAACAGATCCGAGAGATGAACCCAAACTACACAGAATTCAAGTTCCTCAGATTA
301 L G T P T R E Q I R E M N P N Y T E F K F P Q I K
976 GCTCATCCATGGACCAAGGTGTTAAGCCCCGACCCCTCCGGAGGCGATTGCCCTCTGCTCTCGGCTGCTGGAG
326 A H P W T K V F K P R T P P E A I A L C S R L L E
1051 TACACACCGGCTCACGCTTCTCCCACTAGAGGCTGCTCACATGCCTTCTTCGACGAGCTGCGCCAGCCCAAC
351 Y T P A S R F S P L E A C S H A F F D E L R Q P N
1126 ACGCGGCTGCCAGCGGCCGAGAGCTGCCGATGCTCTTCAACTTCAGCACACAGAGCTGTCGATCCAGCCGAG
376 T R L P S G R E L P M L F N F S T T E L S I Q P Q
1201 CTAAACTCGACCCTCATCCCTCCTCACGCCGCTCTCACACAGCTGCTCCGCCACGATGGCACCAGGTTTCAGAT
401 L N S T L I P P H A R S H T A A S A H D G T G S D
1276 TCATCTCAACACAGTTCAGTACCAGGATCTCTCAACAGCATCTGA
426 S S Q H S S V P G S L N S I *

```

(c)

(a), (b), (c)分别表示牙鲆 *GSK3 α* , *GSK3 β* 与 *GSK3 β -like* 的基因序列**Figure 1.** The *GSK3* gene sequences of *Paralichthys olivaceus***图 1.** 牙鲆 *GSK3* 基因序列

然后通过 SMART 在线网站预测牙鲆 GSK3 基因的蛋白功能结构域, 绘制出蛋白的一级结构示意图 (图 2), 发现 3 个基因均含有位于中间的大小约为 285 个(GSK3 β 为 289 个)氨基酸的 S_TKc 蛋白激酶催化活性功能域, 并表现出高度的保守性。在 S_TKc 功能结构域处具有高达 90% 的序列同源性, 其中催化活性位点、ATP 结合位点, 底物结合位点以及下游 Axin 蛋白结合区域氨基酸序列完全相同, 这也验证了 GSK3 不同亚型在蛋白功能结构域上的高度保守性(图 3)。然而 3 个基因在 N 端及 C 端序列差异较大。GSK3 β 基因与另外两个基因相比, 在 N 端有一段 20 多个氨基酸的缺失, 并在 C 端区多了 10 个氨基酸左右的片段。GSK3 β 与另外两个基因在 N 端及 C 端序列及结构上的差异对其功能上可能存在的差异仍不清楚。

3.2. GSK3 系统进化分析结果

从 NCBI 上下载得到已公布的部分物种的 GSK3 基因序列, 鱼类中包括淡水鱼斑马鱼, 海水鱼中的大黄鱼, 眶锯雀鲷以及半滑舌鳎, 两栖类中选取的是非洲蟾蜍, 哺乳类动物选取小鼠和人。将上述物种的氨基酸序列, 与克隆得到的牙鲆 GSK3 基因氨基酸序列一起进行分析, 利用 MEGA 6.0 软件, 通过 NJ 法构建 GSK3 基因系统进化树(图 4)。

结果显示: 1) GSK3 β -like 这个亚型只在海水鱼类中存在, 且与鱼类的 GSK3 α 首先聚为一支, 然后再与两栖类及哺乳类的 GSK3 α 聚在一起, 说明 GSK3 β -like 是进化过程中产生的海水鱼类所特有的一个新的 GSK3 亚型。2) 牙鲆 GSK3 在进化关系上与大黄鱼和眶锯雀鲷亲缘性最高, 且 GSK3 α 与 GSK3 β 两个亚型在系统发生上完全一致, 这也表明了 GSK3 基因在进化上的保守性。

3.3. GSK3 基因在牙鲆胚胎发育早期的 qRT-PCR 表达分析

牙鲆胚胎发育各时期中 GSK3 基因定量结果显示: 在受精卵中就能检测到 GSK3 三种亚型的表达, 表现为母源性表达(图 5)。由图可知, GSK3 各基因在牙鲆胚胎发育各时期中表达量并不高, 且表现出基本一致的表达变化趋势: 合子开始发育到 2 cell, GSK3 三种亚型表达量先是明显下调, 然后表达量上升, 16 cell 后表达量开始逐渐下降, 原肠胚开始后表现为显著下调, 可能是由于原肠作用影响。发育到神经胚后表达量表现出一次显著升高并维持在较高的表达水平直到出膜期, GSK3 三种亚型从出膜期开始表达量再次显著下降, 直至出膜后 1 天才表达量开始上升。GSK3 β 与 GSK3 β -like 的表达量都在出膜期达到最高, 而 GSK3 α 的表达量在受精卵时期表现最高。

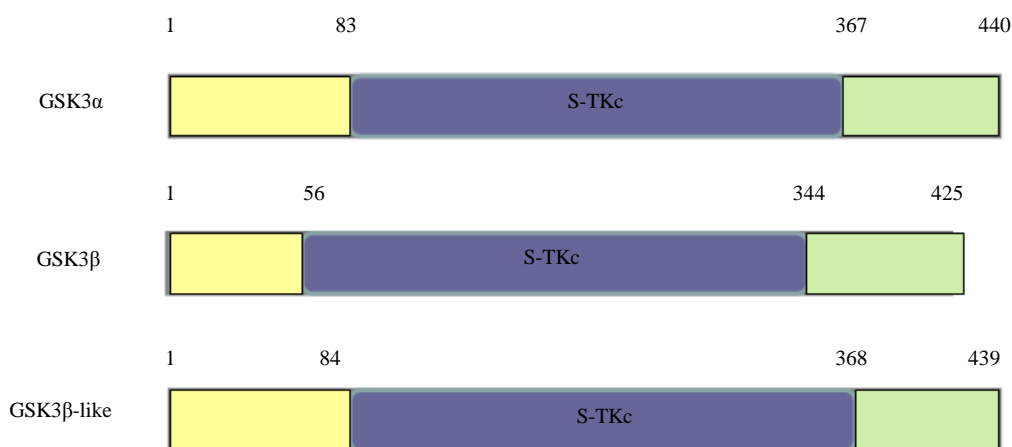


Figure 2. The GSK primary structure diagram of *Paralichthys olivaceus*

图 2. 牙鲆 GSK3 蛋白一级结构示意图

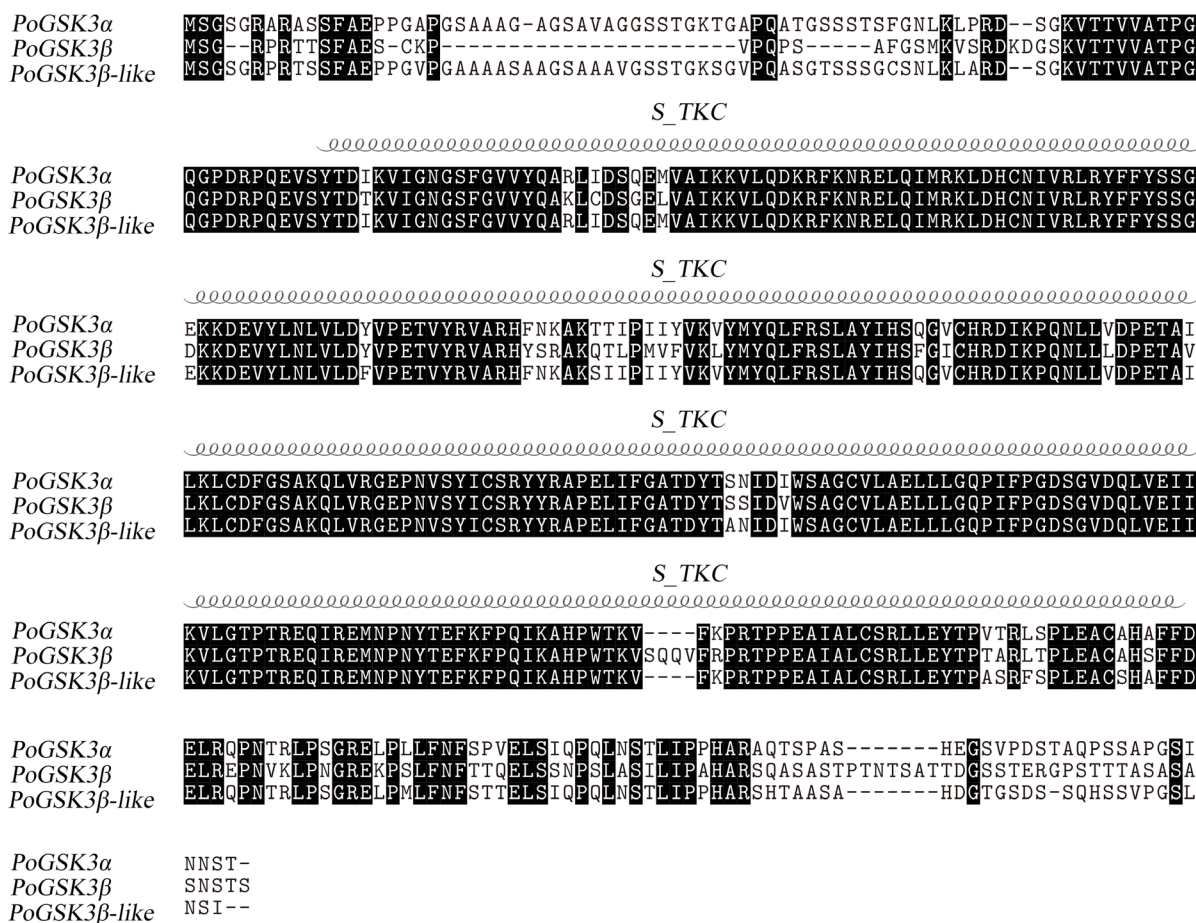


Figure 3. GSK3 amino acid sequence alignment of *Paralichthys olivaceus*

图 3. 牙鲈 GSK3 基因氨基酸序列比对

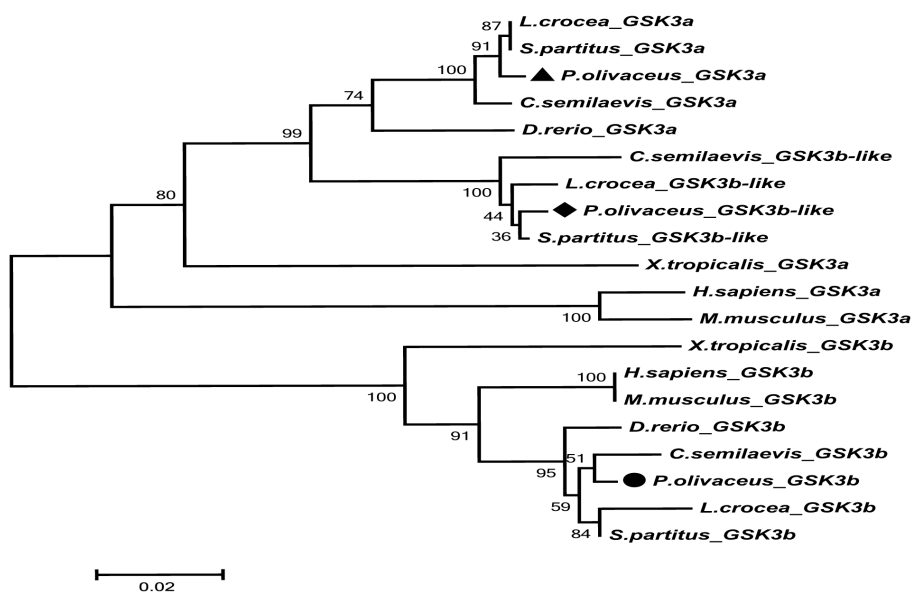


Figure 4. The GSK3 protein phylogenetic analysis of *Paralichthys olivaceus*

图 4. 牙鲈 GSK3 基因蛋白系统进化分析

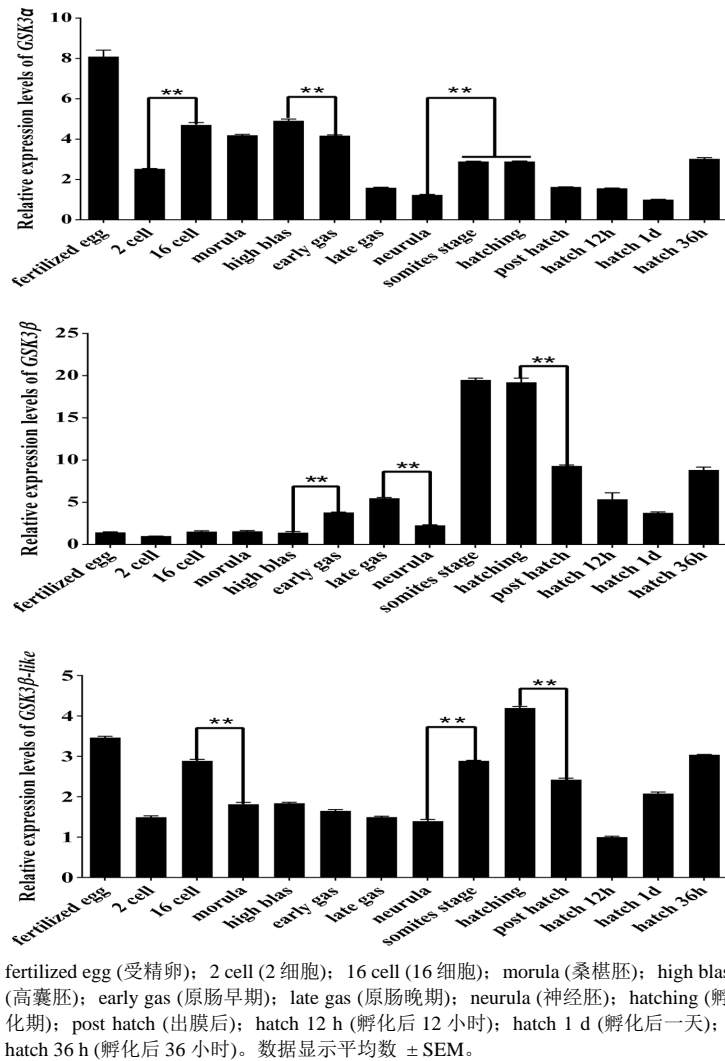


Figure 5. The qRT-PCR analysis of *Paralichthys olivaceus* GSK3 gene during embryonic development
图 5. 牙鲆 GSK3 基因胚胎发育时期 qRT-PCR 分析

但值得注意的是, *GSK3β* 基因在牙鲆胚胎发育时期的时空表达表现出与另外两个基因略有不同的变化趋势。1) 从受精卵时期到囊胚期, 与另外两个基因相比, *GSK3β* 基因的表达量一直较低, 但发育到体节期后, 其表达量突然显著升高, 远远高于另外两个基因。这种高表达可能与 *GSK3β* 在 Wnt 信号通路及其它生物学过程中发挥主要作用相关。2) 从高囊胚期到体节期, *GSK3α* 与 *GSK3β-like* 都表现出逐渐下降的表达趋势, 而 *GSK3β* 的表达量先升高, 在原肠晚期才出现显著下调。囊胚期及原肠期的表达差异可能与各基因在胚层形成及运动过程中发挥不同作用有关。

综上可得: 除 *GSK3α* 外, *GSK3β* 与 *GSK3β-like* 的表达量都在出膜期达到最高。且 *GSK3β* 在胚胎发育时期的表达量明显高于另外两个基因, 可能与 *GSK3β* 在多种生物学过程中发挥主要作用相关。

4. 讨论

糖原合成酶激酶-3 (GSK-3)在哺乳动物中主要有两种亚型, 即 *GSK-3α* 和 *GSK-3β*, 本次实验通过分子克隆得到牙鲆 GSK-3 基因的 3 种亚型: *GSK-3α*, *GSK-3β* 和 *GSK-3β-like*, 通过 NCBI 序列比对及系统

进化分析可得, GSK-3 β -like 亚型为海洋鱼类所特有。但有意思的是: GSK-3 β -like 与 GSK-3 α 氨基酸序列一致性(95%)显著高于 GSK-3 β (88%)。而系统进化分析也显示, 海洋鱼类 GSK-3 α 首先与 GSK-3 β -like 聚为一支, 然后再与哺乳类及两栖类的 GSK-3 α 聚在一起, 也说明 GSK-3 α 与 GSK-3 β -like 在进化关系上更为接近。

X 射线晶体衍射显示: GSK-3 β 蛋白结构包括三个部分: 由 7 个 β 片层形成一个 β -桶结构的氮端区域, 中间铰链区域以及 C 端 α 螺旋区域(PDB ID: 1PYX)。通过 SMART 在线网站预测并绘制出的牙鲈 GSK 蛋白的一级结构示意图显示: GSK-3 β 的 S_TKc 蛋白激酶催化活性功能域位于中间 56-344 氨基酸区域, 且该功能域在三个亚型中高度保守, 序列同源性高达 96%。但它们在两端的同源性仅 36%, 且 GSK-3 α 和 GSK-3 β -like 与 GSK-3 β 相比, 在 N 端有一个 20 个氨基酸左右的延伸。GSK-3 β 与其它亚型在催化功能区的高度保守以及在 N 端结构上的差异导致它们虽然功能上代偿但又存在某些差异。GSK-3 α 和 GSK-3 β 有着相似的功能, 都可以参与软骨细胞分化, 调控 Wnt 信号通路[11] [12], 但两者的功能并不能相互替代。小鼠 GSK-3 β 基因敲除实验发现, 敲除 GSK-3 β 基因后, 早期胚胎发育正常, 但敲除 GSK-3 β 基因的小鼠出生 13.5~14.5 天后会死于肝退化, 说明 GSK-3 α 可以一定程度上功能性地弥补 GSK-3 β 的缺失, 在发育中也具有非常重要的作用, 但这两种亚型在功能上仍存在某些差异[13]。

另外, 二者在心脏发育过程中也发挥不同的作用, 心肌细胞的存活离不开 GSK3 α , 而 GSK3 β 负责调控心脏的定位及左右分布[7]。

GSK3 最初是从骨骼肌中分离出来的, 但在哺乳动物各组织中普遍表达, 其中 GSK3 β 在脑组织中具有显著高表达, 尤其是神经元细胞中。这是由于 GSK3 β 在神经信号通路中发挥重要作用, 参与轴突的生成。在牙鲈胚胎发育时期, GSK3 三种亚型均表现为母源性表达, 其中 GSK-3 α 和 GSK-3 β -like 表达量较低, 且呈现基本一致的表达变化趋势, 而 GSK3 β 基因在发育早期表达量较低, 但发育到体节期后, 其表达量突然显著升高, 远远高于另外两个基因, 这种高表达可能与 GSK3 β 在多个信号通路及生物学过程中发挥主要作用相关。

GSK3 β 是 Wnt/ β -catenin 信号通路中的成员, 能够通过 β -catenin 激酶磷酸化作用调控 Wnt 信号通路的活化或失活, 在通路中与 Wnt 一起充当正调节因子。GSK3 β 在调节细胞增殖与凋亡、微管动力学及细胞运动和血管生成中均具有重要作用[14]。越来越多的研究发现, GSK3 β 还能在癌细胞转录、肿瘤细胞的侵袭与转移等多个过程中起调控作用, 是众多恶性肿瘤中的关键激酶。鉴于 GSK3 β 的多元化作用及其在不同肿瘤中发挥不同的调控作用, 学者们猜测其可能成为新的肿瘤的治疗靶点[4]。

在斑马鱼中的研究表明: GSK3 β 抑制剂化合物处理会引起芽基细胞核内 β -catenin 的积累、Wnt/ β -catenin 信号通路下游基因 *lef1* 和 *shh* 表达上调, 促进再生组织中细胞的增殖并最终促进斑马鱼再生过程中的骨生长[15]。另有报导: 抑制 GSK3 β 能够激活 BMP 信号并较少 SOST 的表达从而引起成骨细胞的分化增强。这些研究都证实了 GSK3 β 在 Wnt/ β -catenin 信号通路中发挥着重要作用。而大黄鱼肝脂质沉积实验表明: GSK3 β / β -catenin 可能通过 peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ)来参与调控大黄鱼肝脏中 fatty acid synthetase (FAS) and lipoprotein lipase (LPL)的形成, 并最终抑制肝脂质沉积[16]。

因此开展对于牙鲈 GSK3 基因结构、系统发生及其在牙鲈胚胎发育早期的表达变化的基础研究, 对于我们更好地理解其在 Wnt 信号通路中的分子作用机制以及后续开展 GSK3 基因的功能验证具有重要意义, 也为我们更深入地了解其对于牙鲈早期生长发育的可能调控作用打下基础。

5. 结论

- 1) 本文通过基因克隆得到了牙鲈 GSK3 基因的三个不同亚型: GSK-3 α , GSK-3 β 和 GSK3 β -like, 其

中 NCBI 比对及系统进化分析显示 GSK3 β -like 亚型是海洋鱼类所特有的, 且在进化关系上与 GSK-3 α 更为接近。

2) 氨基酸序列比对结果显示: 三个亚型的 S_TKc 蛋白激酶催化活性功能域高度保守, 但在 N 端和 C 端的非催化功能区同源性较差。

3) 牙鲆胚胎发育各时期 GSK3 基因定量结果显示: GSK3 α 的表达量在受精卵时期表现最高, 而 GSK3 β 与 GSK3 β -like 的表达量都在出膜期达到最高, 且 GSK3 β 在胚胎发育时期的表达量明显高于另外两个基因, 这可能与 GSK3 β 在多种生物学过程中发挥主要作用相关。

参考文献 (References)

- [1] 刘明明, 叶德泳. 糖原合成酶激酶-3 β 及其抑制剂研究进展[J]. 药学进展, 2009, 33(4): 145-151.
- [2] Kockeritz, L., et al. (2006) Glycogen Synthase Kinase-3—An Overview of an Over-Achieving Protein Kinase. *Current Drug Targets*, **7**, 1377-1388. <http://dx.doi.org/10.2174/1389450110607011377>
- [3] Wu, D. and Pan, W. (2010) GSK3: A Multifaceted Kinase in Wnt Signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, **35**, 161-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.002>
- [4] 郭扬, 曲国蕃. GSK3 β 在恶性肿瘤中的作用及研究现状[J]. 现代生物医学进展, 2012(22): 4390-4392.
- [5] 郑颖, 张璟. 糖原合成酶激酶-3 β 与肾脏疾病[J]. 生命科学研究, 2007, 11(4): 79-82.
- [6] 刘谦, 等. 糖原合成酶激酶-3 β 及其天然药物抑制剂研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 223-229.
- [7] Mamaghani, S., et al. (2009) Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition Disrupts Nuclear Factor-KappaB Activity in Pancreatic Cancer, But Fails to Sensitize to Gemcitabine Chemotherapy. *BMC Cancer*, **9**, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-9-132>
- [8] Mai, W., et al. (2009) Deregulated GSK3 β Sustains Gastrointestinal Cancer Cells Survival by Modulating Human Telomerase Reverse Transcriptase and Telomerase. *Clinical Cancer Research*, **15**, 6810-6819. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0973>
- [9] 邱霞, 黄建. NF- κ B、Wnt 信号转导通路与乳腺癌的发生发展[J]. 实用肿瘤杂志, 2009(4): 413-417.
- [10] 郭昊, 等. 肿瘤治疗关键靶点糖原合成酶激酶-3 β 的研究进展[J]. 广东化工, 2015, 42(10): 76-77.
- [11] Matsuda, T., et al. (2008). Distinct Roles of GSK-3 α and GSK-3 β Phosphorylation in the Heart under Pressure Overload. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 20900-20905. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0808315106>
- [12] Shozo, I., et al. (2012) GSK-3 α and GSK-3 β Proteins Are Involved in Early Stages of Chondrocyte Differentiation with Functional Redundancy through RelA Protein Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 29227-29236. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.372086>
- [13] Hoeflich, K.P., et al. (2000) Requirement for Glycogen Synthase Kinase-3 in Cell Survival and NF-B Activation. *Nature*, **406**, 86-90. <http://dx.doi.org/10.1038/35017574>
- [14] 安淑香. GSK3 β 和 p38MAPK 在乳腺癌组织中的表达及意义[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 中国医科大学, 2010.
- [15] Curtis, C.L. (2013) Wnt Signaling in Zebrafish Fin Regeneration: Chemical Biology Using a GSK3beta Inhibitor. *Dissertations & Theses, Gradworks*.
- [16] Liu, D., et al. (2015) GSK-3 β Participates in the Regulation of Hepatic Lipid Deposition in Large Yellow Croaker (*Larmichthys crocea*). *Fish Physiology & Biochemistry*, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-015-0145-7>