

仿刺参 *EGFR* 基因的克隆与表达分析

李霞*, 王雪, 秦艳杰, 刘洋, 周一兵

(大连海洋大学辽宁省海洋生物资源可持续利用重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 表皮生长因子受体(EGFR)是多种细胞因子的受体,在细胞增殖、迁移及分化中具有重要的作用。应用 RACE 法首次从仿刺参体腔细胞中克隆出 *EGFR* 基因的全长 cDNA 序列。该 cDNA 全长 3 826 bp,包括 821 bp 的 5'-UTR,281 bp 的 3'-UTR,开放阅读框 2 724 bp,编码 907 个氨基酸。推导的氨基酸序列 55-184aa 和 365-487aa 符合 *EGFR* 基因所具有的 L1 和 L2 受体结构域,在 203-344aa 和 503-823aa 含有 *EGFR* 家族特征区域 CR1 和 CR2 半胱氨酸富集区,并同为跨膜糖蛋白,在结构上具有一致性。经 BlastP 与 GenBank 已知物种氨基酸序列进行同源性比对,仿刺参 *EGFR* 基因氨基酸序列与果蝇 *EGFR* 相似性为 49%,同源性为 34%,与斑马鱼 *EGFR* 相似性为 47%,同源性为 34%,与淡水椎实螺 *EGFR* 相似性为 49%,同源性为 31%。据此推断,仿刺参 *EGFR* 基因属于 *EGFR* 家族成员。利用 Real-time PCR 技术检测了该基因在仿刺参各组织中的表达,结果显示在肠、呼吸树、表皮、体腔细胞、纵肌中 *EGFR* 均有表达,且体腔细胞和表皮表达量较高。结果表明,该基因可能在仿刺参组织发育和再生过程中起到重要的调控作用。

关键词: 仿刺参;表皮生长因子受体;基因克隆;表达

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)是一类广泛分布于真核生物体细胞膜上的多功能糖蛋白,为 HER/ErbB 家族的 4 个成员之一,故又名 HER1 或 ErbB1。正常状态下,它通过与相应配体结合,激活多种酶,并引发一系列信号的转导,从而促进细胞 DNA、RNA 及蛋白质的合成,诱导细胞的有丝分裂、迁移和分化等过程^[1]。其配体主要有表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、转化生长因子- α (transforming growth factor- α ,TGF- α)、双调节蛋白(amphiregulin,AR)、表皮素(epiregulin,EPR)、肝素结合性表皮生长因子(heparin binding EGF,HB-EGF)和神经调节素 2- α (neuregulin,NRG2- α)等^[2-4]。目前已在多个物种中发现 *EGFR* 基因,它不仅参与调节生物体的生长发育,更有研究显示,EGFR 在加快创伤修复过程中也起着重要

作用^[5]。

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)属棘皮动物门(Echinodermata),海参纲(Holothuroidea),帽手目(Aspidochirotida),刺参科(Stichopodidae),仿刺参属(*Apostichopus*)。主要分布于我国的山东、辽宁和河北沿海,是重要的海水养殖经济种类。仿刺参是一类再生能力很强的生物,其多个组织在受到损伤后能快速修复^[6-8],但目前的相关研究主要集中在形态学和细胞学,关于其再生修复的分子生物学机理研究则较少。本研究以仿刺参体腔细胞为材料,首次克隆了仿刺参 *EGFR* 基因的全长 cDNA 序列,并利用 Real-time PCR 技术进行了该基因在仿刺参各组织中的表达分析,以期研究仿刺参组织发育相关功能基因及再生修复机制提供理论基础。

收稿日期:2011-05-12 修回日期:2011-10-23

资助项目:辽宁省教育厅创新团队(2007T015);辽宁省教育厅实验室专项(2008S064)

通讯作者:李霞,E-mail:lx@dlou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

试验用仿刺参取自旅顺龙王塘海区,采样时间为2010年5月,取回后在大连海洋大学海水增殖学重点实验室生态室200 L水槽中暂养一个月以上,饲养用水为砂滤海水,每天半量换水1次,并投喂人工自制饵料,水温控制在(18 ± 1) °C。

1.2 方法

总RNA提取 取正常健康的仿刺参,用注射器抽取体腔液,离心收集细胞,采用TRIZOL (Invitrogen)法提取仿刺参体腔细胞中总RNA。使用RNase Free DNase I (TaKaRa)对总RNA进行处理以除去DNA污染,最终定容于DEPC处理水。用紫外分光光度计检测其纯度并计算浓度,同时进行琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。纯化后的总RNA溶液保存于-80 °C。

目的片段的获得 采用购自TaKaRa公司PrimeScript™ RT-PCR Kit试剂盒将提取的Total RNA进行反转录。对NCBI上提供的果蝇*EGFR*基因(GenBank登录号AY461288.1)进行序列分析,利用Primer Premier 5.0软件设计引物F1、R1(表1)扩增目的片段,25 μL PCR反应体系为10 × PCR Buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL, dNTP Mixture(各2.5 mmol/L) 2 μL, TaKaRa *Taq* (5 U/μL) 0.25 μL, Primer FR (20 μmol/L) 2 μL, dH₂O 15.75 μL, cDNA 1 μL。PCR反应条件为94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环35次; 72 °C 10 min。采用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒[生工生物工程(上海)有限公司]将PCR产物纯化后连接到pMD19-T (TaKaRa)载体上,热转化到感受态细胞*E. Coli* DH5α (TaKaRa)中,涂平板、挑菌,经PCR检测阳性克隆后进行扩培,采用试剂盒回收质粒[生工生物工程(上海)有限公司],送TaKaRa公司测序,并将所得片段序列与GenBank中已知序列进行比对。

RACE扩增 根据克隆得到的目的片段,分别设计3'、5'RACE特异性引物(表1)。使用TaKaRa 3'-Full RACE Core Set Kit Ver. 2.0 (TaKaRa)试剂盒按说明书进行3'RACE扩增。取5 μL PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收3'RACE产物,克隆方法同上,序列测定由

TaKaRa公司完成。

使用TaKaRa 5'-Full RACE Kit (TaKaRa)试剂盒,按照说明书对总RNA进行去磷酸化处理、“去帽子”反应,并与5'RACE Adaptor连接后,反转录合成5'RACE的cDNA,再进行PCR扩增。取5 μL PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收5'RACE产物,克隆方法同上,序列测定由TaKaRa公司完成。

表1 实验用引物序列
Tab.1 Sequences of PCR primers

引物 primer	引物序列(5'→3') sequence
F1	CCGACCACTGCCAAAAACAAAC
R1	ACATTCAATACACTCGCCATC
5'RACE 1R-1	CTCCACGCAGAATTGATC
5'RACE 1R-2	ATTGGCCATTATGTTTCGTAA
5'RACE 2R-1	CCAGGGTTTCCTCGCCTCTTAT
5'RACE 2R-2	TGGAATAGGTCGGATGTCAATA
3'RACE 1F-1	ATGTCCTTACCGTTGTCC
3'RACE 1F-2	CTGGAGGATGTACGGGAGA
3'RACE 2F-1	TCATTTTCATTATCCACCTACC
3'RACE 2F-2	CCCAGACGCTGATAAGATTG
3'RACE 3F-1	CTGAAAGGACCAATCCACAGAGC
3'RACE 3F-2	GGCATAGCATAGACATTACACCT
Cytb F	TGAGCCGCAACAGTAATC
Cytb R	AAGGGAAAAGGAAGTGAAAG
E4 F	AATGCCAGGGAAGCGTTAG
E4 R	TCCCGTTGGGCTGTCTC

1.3 生物信息学分析与系统进化树构建

将仿刺参*EGFR*基因的全长cDNA用DNASTAR软件确定正确的开放阅读框,并翻译成氨基酸序列;用Blast X程序与GenBank、EMBL、DDBJ及PDB数据库中的序列进行比较;用ProtParam预测理化性质;用ProtScale分析亲水/疏水性;用TMHMM Server 2.0预测跨膜结构域;SignalP 3.0 Server进行信号肽预测;应用ExPaSy-motifscan和InterProscan预测motif区域;用NPS@HNN预测蛋白质二级结构。将获得的仿刺参*EGFR*序列与其他物种*EGFR*序列进行Clustal W比对,然后用MEGA 4.0软件做出*EGFR*基因的系统进化树。

1.4 仿刺参*EGFR*基因在各组织中的表达检测

随机选取5只健康正常仿刺参,取其表皮、体腔细胞、肠、纵肌、呼吸树各约100 mg,分别提取

各组织总 RNA 并用 RNase-Free DNase I 除去 DNA 污染。经核酸定量分析仪检测其纯度和浓度,并进行琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,调整各组织总 RNA 浓度达到 500 ng 左右,使用 PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time) 试剂盒 (TaKaRa) 进行反转录得到 cDNA。根据已获得的仿刺参 *EGFR* 全长序列设计 Real-time PCR 引物 E4 F 和 E4 R (表 1),内参引物选取 *Cyt b* F 和 *Cyt b* R (表 1)。

标准品进行 5 倍梯度稀释,共稀释成 6 个浓度样品,将待测样品与标准品同时进行反应。按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real-time) 试剂盒 (TaKaRa) 的操作步骤,进行 Real-time PCR 反应。20 μ L 反应体系为 SYBR Premix Ex Taq[™] II (2 \times) 10.0 μ L;正向引物 0.8 μ L,反向引物 0.8 μ L;cDNA 模板 2.0 μ L;dH₂O 6.0 μ L (总反应体系 20.0 μ L)。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 35 s,共 40 个循环,之后进行溶解曲线的绘制。扩增反应在 Mx3005P (Stratagene, USA) 实时荧光定量 PCR 仪上进行。每个样品重复 1 次。

将得到的样品内参基因的 C_t 值代入内参基因的标准曲线,目的基因的 C_t 值代入目的基因的标准曲线,计算目的基因 mRNA 的相对表达量。SPSS 16.0 软件进行显著性分析,用 Microsoft Office Excel 工具做图。

2 结果

2.1 仿刺参 *EGFR* 基因 cDNA 序列的获得

通过 RT-PCR 反应获得仿刺参 *EGFR* 基因中间片段,将所得片段序列与 GenBank 中已知序列

进行比对,确定为 *EGFR* 基因后进行 RACE 扩增。将所测得的序列片段用 DNASTAR 软件进行拼接,最终得到仿刺参 *EGFR* 基因 cDNA 序列全长 (图 1)。该 cDNA 全长 3 826 bp,包括 821 bp 的 5'-UTR,281 bp 的 3'-UTR,开放阅读框 2 724 bp,编码 907 个氨基酸。预测分子量为 100 059.2 u,理论等电点为 4.43。

利用在线工具 ExPaSy-ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 对仿刺参 *EGFR* 的氨基酸亲水性/疏水性进行预测,结果显示其最大值为 4.211,最小值为 -3.044,且绝大部分氨基酸分值为负,故推测该蛋白可能为亲水性蛋白。利用信号肽在线预测工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析得知,仿刺参 *EGFR* 在 25 和 26 位氨基酸 (TDA-ER) 之间有分裂位点,其概率值为 0.849。说明 1 ~ 25 个氨基酸为信号肽。通过跨膜预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 显示仿刺参 *EGFR* 为一类跨膜蛋白,跨膜区为 853 ~ 873 位氨基酸 (图 1)。通过 Motif 分析发现该序列含有 *EGFR* 受体结合区 L1 和 L2 (55 ~ 184 位,365 ~ 487 位),两个半胱氨酸富集区 CR1 和 CR2 (203 ~ 344 位,503 ~ 823 位),均为 *EGFR* 基因特有的保守结构域 (图 1),并含有 *EGFR* 家族受体结构域特征性序列 NLELI (61 ~ 66 位)。同时发现 4 个 N-糖基化位点、14 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (其中 1 个位于细胞膜内)、29 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点 (其中 2 个位于细胞膜内)、1 个潜在酪氨酸激酶磷酸化位点及 16 个 N-肉豆蔻酰化位点。二级结构预测显示, α 螺旋 180 个占 19.85%, β 折叠 146 个占 16.10%,无规则卷曲 581 个占 64.06%。

```

1 AACAGGTTAGAGGCTATGCTTACTCAAAGTATTTATATACATTTCAATCAAGATTCCG
61 TAAACGTTGTACAATGTACGTTGTTTCGTTATTTGAATCTCTCGTAGTAACTCGTGTGATG
121 TGAAGTTTAACTTTGACCACAATATTCTCTCAGCGCAGGGATCGCAAGAGGAAAAGAAGT
181 TTTCGGAATAAACATTTAATTGTGGGACTGTTTAGTTTCTCTGGATTATTTTATTAAC
241 TGATTTGCAGCCGTTGGTTAAGCTTATCCTCCCTTGCAAGTGGATATTACTCATTGTTTT
301 CTTTCGTAGGCATTACCTAGCAACAGGAAGATAAATCACGTCCTATGTTGTGAATCATC
361 GAGCAAGGAATATCAACTACTGTGTGATTGTCATTCAGGTTTCTCTTCAAACACTTAAG
421 ATTATACTAGAGTTGTTAATTCGAACTTACGAGAATTTATCAACCTTTTGCCATTACG
481 GATTTAGTACTGAACFTTCCCATGGCGTCGGTATAGATAATGCCGCAATGTTTATCTG
541 TAGAGAGGCATAAGAGACTGTGTGAGTAATCAGTTCTGACATGTTCTCTGATCTTTTCGTT
601 ACTTGGAATCATCAAATGTCTAGTTTGTGTTTCAGCTGAAAACCTGTGCTGTTGTTATA
661 TATTAATTCTAGTTATGTGATATACTCCGATTACTACGCAACATCAAACCTGAACTATCA
721 CTTTAAAACCTGAGATATATGTGCACATGAATATATAGATAAATATATTCGATTTCGAAGG
781 TTTTGCCTTAGCACAAAACCGACTACTAGCAACCAAGAAAATGGCTTCTTTAAAGGTTT
1 M A S L K V
841 TCATCTTTAATTTTCTCTATACTGATTACTTCCATCTGAGATTAACGGATGACAGAAA
7 F I F N F S S I L I Y F H L R L T D A E
901 GAATCACTTGCAAAGGAACCAACATTTGACGAAAAAATACCCGCCCATTAATGAGA
27 R I T C K G T N I G T K K Y P P P L N E

```

961 TGGCGCTAGAGCGTCGATACCGGGATGTACACACGTTGAGGGGAATCTTGAGCTTATTE
47 M A L E R R Y Q G C T H V E G N L E L I
1021 ACATCCGACCTATTCCAGATGAGGAGTCTTCTCTCTCTCTCTCTTACGAGCATATC
67 D I R P I P D E E S S L S S S S Y E A Y
1081 ACATGCAGTCAGATGAAGATGATACACCGATCTATCGTTCTGGAGCAAATCCGTGAGA
87 H M Q S D E D E Y T D L S F L E Q I R E
1141 TATCCGGCTACCTTCTGATCAGTAATGTACATCGCAGTGTGTACCGCTCCACAACCTGA
107 L1 I S G Y L L I S N V H R S V V P L H N L
1201 → G E T T A A G A G G C G A G G A A C C C T G G A T G G A G A T G C G C T T G T A T A A T G A C A G C A A G C A
127 R I I R G E E T L D G D A L V I M T A S
1261 CAAGACTTGATGATGCTATCAGCTATCTTCTCTACAAGAAATATCACAAGGGGAGTGA
147 T R L D D V Y Q L S S L Q E I S Q G G V
1321 GAATAGATCCCGTCAACCTATGTACATTGAAACGATTAATGGGAAGACCTGCAACGTG
167 R I D P V N L C Y I E T I N W E D L Q R
1381 ACCTGCAATTGACTGGAGATAGCAGTGGAGAACAATGCTATAAGTGTGACGAAAGCT
187 D L Q L T G D S S G E Q C A I S C D E S
1441 GTGAGGAGGCTGCTGGGATGAAGGCCCGACACTGCCAAAACAACTTTAACTAACT
207 C E A G C W D E G P D H C Q K Q T L T N
1501 GTGATAGTTCATGCTCTACCGTTGTCGAGGACCTGGCCAGAAGATTGCTGTCATGAAC
227 CR1 C D S S C P Y R C R G P G P E D C C H E
1561 → A G T G C G T G G A G G A T G T A C G G G A G A T T C C A A C A T A G A T T G C A A G T C C T G T C G A T T C T T A
247 Q C A G G C T G D S N I D C K S C R F L
1621 CCAATGGTGACGAGTGCATGCTGCTCCGAAAAGATTTATAATCCAGCGACCT
267 T N G D E C V S A C P P K K I Y N P A T
1681 TTCTAACCGAGATAATCCAGAATTCGATACGAACATAAAGGCCAATGTTGGAATCCT
287 F L T E I N P E F R Y E H K G Q C L E S
1741 CR1 G T C T G A T T C A C T A G T C G G T C A G G A T C A A T T C T G C G T G G A G G A G T G C A G T A T A A T T A C C
307 C P D S L V G Q D Q F C V E E C S Y N Y
1801 AAAATATTGATGGCGAGTGCATTGAATGTGACGGCATTGTCCAAAAGGCTGTGCTGGCC
327 Q N I D G E C I E C D G I C P K G C A G
1861 TCTCGTTAAATGAGTTTTTAACAGTGGATCTTATGTGAGAGATAGGTTCTTATTGCA
347 L S L N E F L T V D L I D G D R F L N C
1921 CTGCGATTGTTGGTAATGTTCTCATCAATGAAGAATCATTAAAGACGAATGTTGGCGG
367 T R I V G N V L I N E E S F K D E L L A
1981 GAGTTGTTGGCATAACTGCAGCTCATCTGGAAGTATTTTCGATCTGTTACTGAGATTACGG
387 G V V G I T A A H L E V F R S V T E I T
2041 GATACTTGGTACTGACATGGGACACGCCAAAACATAACTTGATTGATCTGACAATATTTC
407 L2 G Y L V L T W D T P K H N L I D L T I F
2101 → A A A A T T T G G A A A A A T A G G A G G G A G A A A C T T C C G T G C A T G A G G G A A A T T G T A C G C G T
427 E N L E K I G G E E T S V H E G K L Y A
2161 TTATCCTTAACATACCACCTCTTGGAGAGCAGACTTCAGCTCGTTAAAATCTGTTAATG
447 F I L N I P L L E I A D F S S L K S V N
2221 GAGATATATTTACGTTGATACATGTTATCATACAAGAGAAATGTTCTGGAAGTACTGTT
467 G D I F Y V D T C Y H T R E M F V E L L
2281 ATGACCCTACGCAGCAAGAAGTGGTGAACGTTCTCCGACAGCCCTGTGTTGGAAGTTCAT
487 Y D P T Q Q E V V E R S P Q T Q C G T S
2341 TGTGCGATGAAGAGTGTACAGATATTGGATGTTGGGGTCCATCTGCTGGCCAAATGTTTCA
507 L C D E E C T D I G C W G P S A G Q C F
2401 CCTGTGCAAAATTTAGGGCTTGAAGATGGAACCTGTGTACCACTATGTGATCCCGAAAATC
527 T C R N Y G L E D G T C V P L C D P E N
2461 ATTTCAATTTCCACCTACCGATGACGGAGCGTAGGAACCTGCGGACTATGTGACGAAC
547 H F I I P P T D D G G V G T C G L C D E
2521 AATGTACGGGAGGATGACTGGCCGAGTAACACAGATTGTATTAGTTGTCGTAATTTCC
567 Q C T G G C T G P S N T D C I S C R N F
2581 AGATTGGTTCTCACTGTAACAGAGTGAATGAGGGACAGTATCCCGTTGGAAAGATAT
587 CR2 Q I G S H C T N E C N E G Q Y P V G K I
2641 → G T G A A T T G T C T G A C T T T T G T A C T C A G G G T G C A G G T A A C G A A C A T A T G A T A G G C G
607 C E L C P D F C T Q G C T G N E H M I G
2701 ACGGGGATGCAACCAATGTTCTATTGTTTTAATCGACATGAAGAGAACTTTATGAGCT
627 D G G C N Q C S I V L I D H E E N F M S
2761 GTTTAGATTCTAGATTCTTGTGATGTTGATCACTTGCAGTGAACCTGACATGATC
647 C L D S L D S C D V D H L Q V N S H M Y
2821 CTAACTCATCGTGTGTCAACAGTGTACCCGGAGTGTGAAGGAGGGTGTGCGAGCAG
667 P N S S V C Q Q C H P E C E G G C L R A
2881 GAGATTCTACCGGATGAGAATATGCAAGAGACACAGGCGTGGTATGAACTGTTGAGC
687 G D S T G C R I C K R H R R G M N C V E
2941 AGTGCTCGAGCGCAATACCCAGACGCTGATAAGATTTGTAGAAATGCGACCAACCT
707 Q C S S A E Y P D A D K I C R N C D P T

```

3001  GTCCTCATTGTAATAACGGAACGGATACTGATTGTACAAAATGTGAAAACCTAGAAAGTAC
727  C L H C N N G T D T D C T K C E N L E V
3061  TTCGTGGAAGACGATAAGCGAAAGTGTGTACCGAGTGTCCAGTGGAGTTCCATATATAT
747  CR2 L L E D D K R K C V T E C P V E F P Y I
3121  TAGAGACATACCGTGTGTGGCAGCATGTCCCTGAAAACCTATCCGAACTAGACACTA
767  L E T Y T C V A A C P E N S F R S E D T
3181  TCTGTAAGTCTTGCCATCCAGAGTCAATGGAGGGTGCAACGATGAAACCAATAAAGGGT
787  I C K S C H P E C N G G C N D E T N K G
3241  GTCTGGTGTGTGAACACGTGACTTTAGATGGCTCCTGTGTGGGGAATGTCAGACAGCC
807  C L V C E H V T L D G S C V A E C P D S
3301  ACGAAGATACCAACGGGTTGCGGAGATGAGCAAAAGATTTGAAGCGTCTCCTGCAAGTT
827  H E D T N G V R E M S K R F E A S P A S
3361  CGCCTCTAAAAGTCTTAACATTGATCATAATTCTCGTCTTGTGGTGGTATTAGTCGTTG
847  S P L K V L T L I I I L V L V V L V V
3421  TM CCATAGTAATCGTAGTACTAACTGAAAGGACCAATCCACAGAGCTCCTAATGCAATGT
867  A I V I V V L K L K G P I H R A P N A M
3481  ATTTGAACGATATGACGAAGACAGAGAAAGTGATCGTGATGATGGGGTAATGGCATAAG
887  Y L N D M T K T E E S D R D D G G N G I
3541  CATAGACATTACACCTCACGTGACATCACATCGAACATGCCATTGGTCAGTCCCAGTAAA
907  A *
3601  AAATCTGGTGAACGTGAGGGGGAAAAGAATACTGAAGTTGAAGGAATAGGGTGAATGA
3661  ETGAAGTTGAGAAGATCTCCAAAGGGTGGGAGATGGATTCATAAATTTATTTGGAAG
3721  TTGGAGCAGTACATCAAAGGATTAATCTCAGAACGTTTTTCAAAGGATCATGTGTAGGC
3781  CTATTGCCTATCAAATTAATAAACTTGAAAAACAAAAA

```

图 1 仿刺参 *EGFR* cDNA 全长及推导的蛋白质序列

CR1, CR2: 半胱氨酸富集区; L1, L2: 受体结合区; TM: 跨膜区。

Fig. 1 Sequence of the cDNA and deduced protein of *EGFR* in *A. japonicus*

CR1, CR2: cysteine-rich region; L1, L2: receptor-binding domain; TM: transmembrane.

将仿刺参 *EGFR* 氨基酸序列使用在线 Blast X (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行同源性比较, 仿刺参 *EGFR* 与淡水椎实螺、斑马鱼及果蝇等物种的氨基酸序列呈现较高的保守性(表 2)。应用 MEGA 4.0 软件在 Bootstrap 置信值为 1 000 的条件下构建系统进化树(图 2)。仿刺参 *EGFR* 序列自聚为一支, 在分子进化地位上与其生物学分类一致, 得到的系统进化树反映了上述物种进化关系的远近。

2.2 仿刺参 *EGFR* 在不同组织中的表达

Real-time PCR 结果表明, *EGFR* 基因在仿刺参肠、呼吸树、表皮、纵肌及体腔细胞中均有表达(图 3), 其中体腔细胞表达量最高, 为呼吸树的 143.87 倍, 差异显著($P < 0.05$); 表皮次之, 为呼吸树的 51.67 倍, 差异显著($P < 0.05$); 在肠、纵肌中表达量较低, 仅为呼吸树的 10.82 倍和 4.47 倍, 差异不显著($P > 0.05$)。

表 2 氨基酸序列的同源性比对
Tab. 2 The amino acid sequence identities

物种 species	GenBank 登录号 GenBank accession no.	相似性/% similarity	同源性/% identity
冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	CAC35008.1	47	31
丽蝇蛹集金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i>	XP_001602830	49	33
刀剑尾鱼 <i>Xiphophorus xiphidium</i>	AAP55673	46	34
佛罗里达弓背蚁 <i>Camponotus floridanus</i>	EFN60989	49	32
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_919405	47	34
果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	AAR85245	49	34
双斑蟋 <i>Gryllus bimaculatus</i>	BAG65666	48	33
热带爪蟾 <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	XP_002939960	47	33
淡水椎实螺 <i>Lymnaea stagnalis</i>	ABQ10634	46	31
鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_990828	47	31
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	EDL97896.1	47	31

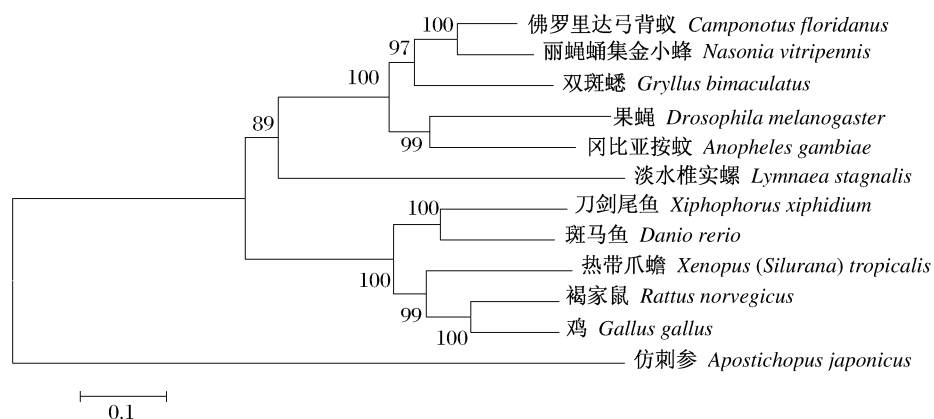


图2 根据 EGFR 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of EGFR

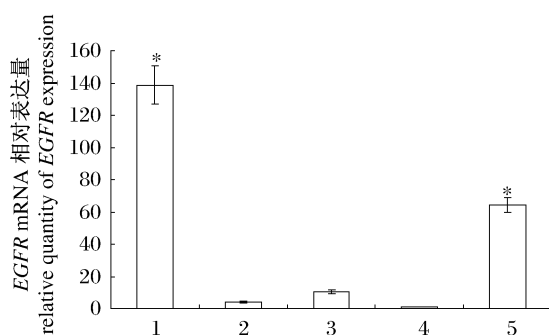


图3 仿刺参正常状态下各组织中 EGFR 基因的相对表达量(以 Cyt b 为参照)

* 代表差异显著 ($P < 0.05$); 1. 腔细胞; 2. 纵肌; 3. 肠; 4. 呼吸树; 5. 表皮。

Fig. 3 Relative quantity of EGFR expressions in the different tissues of *A. japonicus* under normal condition (standardized to Cyt b)

* represents significant difference ($P < 0.05$); 1. coelomocyte; 2. longitudinal muscle; 3. intestinal; 4. respiratory trees; 5. epidermis.

3 讨论

EGFR 是一种具有酪氨酸蛋白激酶活性的受体蛋白^[9], 1984 年该基因在人类^[10]中被首次克隆以来, 在褐家鼠^[11]、鸡^[12]、果蝇^[13]等物种中发现了它的存在, 在斑马鱼^[14]、淡水椎实螺^[15]及僧帽牡蛎 (*Ostrea cucullata*)^[16]等水产动物中其基因也成功地被克隆。

本研究首次在棘皮动物仿刺参中成功克隆出 EGFR 基因, 其蛋白结构分析显示, 该基因具有 EGFR 特有的胞外区、跨膜区和胞内区三部分结构^[17], 是一类跨膜性糖蛋白^[18]。与僧帽牡蛎

EGFR 较短的胞外区不同的是, 仿刺参 EGFR 的胞外区更加完整, 由 L1、CR1、L2、CR2 4 个结构域构成, 这说明仿刺参 EGFR 不仅能与 EGF 相结合, 同样也可以与 TGF- α 等细胞因子结合引起受体二聚化作用^[19]。因此, 仿刺参 EGFR 在功能上较僧帽牡蛎 EGFR 更完善, 与哺乳动物的 EGFR 更加类似。仿刺参 EGFR 胞内区与哺乳动物 EGFR 相比较短, 但含有两个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点及一个蛋白激酶 C 磷酸化位点。当 EGFR 与配体结合激活胞内信号转导通路, 这时胞内的磷酸化位点可进一步与胞内相应信号分子结合, 将信号转导进去, 这表明仿刺参 EGFR 属于一种受体型酪氨酸激酶, 能够同配体结合将靶蛋白的酪氨酸残基磷酸化。此种结构与僧帽牡蛎 EGFR 结构十分类似^[16]。这种差异的存在可能由于仿刺参的分类地位与人、昆虫等物种差别甚远, 不具有复杂的剪切拼接模式。

同源性分析结果显示了进化过程中物种间亲缘关系的远近。仿刺参 EGFR 与人类等高等动物的 EGFR 基因序列同源性均较低, 为 25% ~ 29%, 而与淡水椎实螺、果蝇和斑马鱼的 EGFR 相似性较高, 为 46% ~ 49%, 由不同物种 EGFR 序列构建的系统进化树也同样显示了这一差异, 分类地位相近的物种聚在一束。由于棘皮动物中 EGFR 的研究还很少, 因此仿刺参独自聚成一束。

人类细胞增殖、迁移、分化等生命过程中都有 EGFR 的参与, 因此 EGFR 可在除造血系统以外几乎所有的人体组织中表达。与其类似, 在仿刺参的肠、表皮、呼吸树、体腔细胞和纵肌中我们也检测到了 EGFR 的表达。当然, 不同组织中的

EGFR 可能具有不同的功能, Tice 等^[20] 和 Biscardi 等^[21] 发现在小鼠的成纤维细胞中 *EGFR* 可以促进细胞有丝分裂, 但过度表达会导致肿瘤的发生^[22]。进一步研究显示该基因为细胞的迁移和运动提供驱动力^[23-24]; 斑马鱼和果蝇卵巢中的 *EGFR* 可能促进卵细胞的发育^[25-26]; 果蝇翅中的 *EGFR* 对翅脉的形成具有促进作用^[27]。本研究发现, 仿刺参 *EGFR* 在体腔细胞中的表达量远远高于其他 4 种组织, 这种高表达可能源于这类细胞担负着机体免疫作用^[28], 处于增殖的活跃期, 以便随时抵抗外源细菌的侵蚀及自身更新的需要^[29]。而表皮组织中 *EGFR* 呈现高表达, 与表皮细胞经常处于更新状态有关, 此结果与人类皮肤中 *EGFR* 的高表达相类似^[30]。仿刺参 *EGFR* 在纵肌和肠组织中表达相对较低, 与 Wang 等^[25] 研究发现斑马鱼肠和肌肉中 *EGFR* 表达量较高不一致, 可能是由于不同物种同一组织器官行使功能的差异特性造成的, 因此基因的表达量也会不同。呼吸树是海参特殊的呼吸器官^[31], 其包含多种细胞类型, 具有活跃的分泌能力。本研究首次在呼吸树中检测到 *EGFR* 的表达, 可推测该基因参与了呼吸树的生长发育过程。

本研究在仿刺参各组织中均检测到 *EGFR* 基因的表达, 说明该基因在仿刺参各组织生长发育中起到重要的调控作用, 这也为研究仿刺参组织器官发育提供了更多的理论基础。再生现象一直是生物学家研究的热点, 而组织修复和重建是通过许多因子的调控作用来完成的, 如 EGF, HGF 和 TGF- α 。EGFR 作为这些生长因子的受体, 其表达量将直接反映生长因子的调控水平, 在促进组织修复方面起着重要的作用^[32]。这种修复机制与仿刺参组织再生机制十分相似^[33], 都是通过促进细胞的增殖、迁移和分化, 最终完成受损部位或器官的修复。本研究在仿刺参体内发现了 *EGFR* 的存在, 推测其在仿刺参多种组织的再生过程中必定起着重要作用, 对该基因的克隆、表达以及更深入的研究, 有助于揭示仿刺参组织器官再生的分子机理。

参考文献:

- [1] Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases [J]. Cell, 2000, 103 (2) : 211 - 225.
- [2] Wells A. EGF receptor [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1999, 31 (6) : 637 - 643.
- [3] Yarden Y, Sliwkowski M X. Untangling the ErbB signalling network [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001, 2 (2) : 127 - 137.
- [4] Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor [J]. Journal of Biology Chemistry, 1990, 265 (14) : 7709 - 7712.
- [5] Milani S, Paladini I, Orsini B, et al. Role of epidermal growth factor in peptic ulcer healing [J]. Digestive Diseases Sciences, 1995, 40 (11) : 2497 - 2504.
- [6] 聂竹兰, 李霞. 海参再生的研究 [J]. 海洋科学, 2006, 30 (5) : 78 - 82.
- [7] Leibson N L, Dolmatov I Y. Evisceration and regeneration of the internal complex of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirota) [J]. Zoologichesky Zhurnal, 1989, 68 (8) : 67 - 74.
- [8] Shukalyuk A I, Dolmatov I Y. Regeneration of the digestive tube in the holothurian *Apostichopus japonicus* after evisceration [J]. Russian Journal of Marine Biology, 2001, 27 (3) : 168 - 173.
- [9] Bouloigouris P, Elder J. Epidermal growth factor receptor structure, regulation, mitogenic signaling and effects of activation [J]. Anticancer Research, 2001, 21 : 2769 - 2775.
- [10] Ulrich A, Coussens L, Hayflick J S, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells [J]. Nature, 1984, 309 : 418 - 425.
- [11] Petchl A, Harris J, Raymond V W, et al. A truncated, secreted form of the epidermal growth factor receptor is encoded by an alternatively spliced transcript in normal rat tissue [J]. Molecular and Cell Biology, 1990, 10 : 2973 - 2982.
- [12] Lax I, Johnson A, Howk R, et al. Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse cells, and differential binding of EGF and transforming growth factor- α [J]. Molecular and Cell Biology, 1988, 8 : 1970 - 1978.
- [13] Palsson A, Rouse A, Riley-Berger R, et al. Nucleotide variation in the Egfr locus of *Drosophila melanogaster* [J]. Genetics, 2004, 167 (3) : 1199 - 1212.
- [14] Goishi K, Leep P, Davidson A J, et al. Inhibition of zebrafish epidermal growth factor receptor activity results in cardiovascular defects [J]. Mechanisms of

- Development, 2003, 120: 811 – 822.
- [15] Van Kesteren R E, Gagatsek J S, Hagendorf A, *et al.* Postsynaptic expression of an epidermal growth factor receptor regulates cholinergic synapse formation between identified molluscan neurons [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2008, 27 (8): 2043 – 2056.
- [16] 许茜, 秦骥, 柯才焕. 僧帽牡蛎 EGFR 基因的克隆及早期发育阶段的表达 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2010, 49(6): 756 – 763.
- [17] Jorissen R N, Wakjer F, Pouliot N, *et al.* Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling [J]. *Experimental Cell Research*, 2003, 284: 31.
- [18] Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor [J]. *Cell*, 2002, 110(6): 669 – 672.
- [19] Bougoiris P, Elder J. Epidermal growth factor receptor structure, regulation, mitogenic signalling and effects of activation [J]. *Anticancer Research*, 2001, 21: 2769 – 2775.
- [20] Tice D A, Biscardi J S, Nickles A L, *et al.* Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor [J]. *Cell Biology*, 1999, 96(4): 1415 – 1420.
- [21] Biscardi J S, Maa M C, Tice D A, *et al.* c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyr845 and tyr1101 is associated with modulation of receptor function [J]. *Journal of Biology Chemistry*, 1999, 274(12): 8335 – 8343.
- [22] Bao J, Gur G, Yarden Y. Src promotes destruction of c-Cbl; implications for oncogenic synergy between Src and growth factor receptors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(5): 2438 – 2443.
- [23] Takehito U, Liu J L, Zhang P J, *et al.* Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortacin [J]. *Nature Cell Biology*, 2001, 3 (3): 259 – 266.
- [24] Goi T, Shipitsin M, Lu Z M, *et al.* An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity [J]. *EMBO Journal*, 2000, 19: 623 – 630.
- [25] Wang Y, Ge W. Cloning of epidermal growth factor (EGF) and eGF receptor (EGFR) from the zebrafish ovary; evidence for EGF as a potential paracrine factor from the oocyte to regulate activin/follistatin system in the follicle cells [J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(3): 749 – 760.
- [26] Ghiglione C, Bach E A, Paraiso Y, *et al.* Mechanism of activation of the Drosophila EGF receptor by the TGF α ligand Gurken during oogenesis [J]. *Development*, 2002, 129(1): 175 – 186.
- [27] Guichard A, Biehs B, Sturtevant M A, *et al.* Rhomboid and star interact synergistically to promote EGFR/MAPK signaling during Drosophila wing vein development [J]. *Development*, 1999, 126 (12): 2663 – 2676.
- [28] Eiseikina M G, Magarlamov T Y. Coelomocyte morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae) [J]. *Russian Journal of Marine Biology*, 2002, 28 (3): 197 – 202.
- [29] Hetzel H R. Studies of coelomocytes type I: Survey on coelomocyte type [J]. *Biological Bulletin*, 1963, 125: 289 – 301.
- [30] 陈伟, 付小兵, 孙同柱, 等. 表皮细胞生长因子及其受体在胎儿皮肤组织内的表达特征及其意义 [J]. *中国临床康复*, 2002, 6(8): 1128 – 1129.
- [31] 廖玉麟. 中国动物志: 棘皮动物门海参纲 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 1 – 334.
- [32] Repertinger S K, Campagnaro E, Fuhtman J, *et al.* EGFR enhances early healing after cutaneous incisional wounding [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2004, 123(5): 982 – 989.
- [33] Jose E, Garcia-Ararras, Michael J, *et al.* Visceral regeneration in Holothurians [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2001, 55: 438 – 451.

Cloning and expression analysis of the *EGFR* gene in *Apostichopus japonicus*

LI Xia*, WANG Xue, QIN Yan-jie, LIU Yang, ZHOU Yi-bing

(Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization in Liaoning Province's University,
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: As a variety of cytokines receptors, epidermal growth factor receptor (EGFR) plays an important role in cell proliferation, migration and differentiation. It was not only involved in regulating growth and development in tissues, but also in the wound healing. In the present study, cDNA full-length sequence of the *EGFR* gene was cloned in coelomocytes of *Apostichopus japonicus*, by using 3' RACE and 5' RACE, and the sequence and structural analysis of the *EGFR* gene by using bioinformatics methods. The results showed that the cDNA length was 3 826 bp, including the 821 bp of the 5'-UTR and 281 bp of the 3'-UTR. The open reading frame was 2 724 bp, which could encode 907 amino acids. The deduced amino acid sequence of 55 – 184aa and 365 – 487aa was L1 and L2 receptor domain of the *EGFR* gene. The CR1 and CR2 cysteine-rich regions, which were transmembrane glycoprotein, were located in the 203 – 344aa and 503 – 823aa regions. Identity rates of deduced amino acid sequence of EGFR with those of known species were subjected to BlastP searching in NCBI. Results showed that the structure of *EGFR* gene in the study was similar to that of other species *EGFR* gene, and the amino acid sequence of *EGFR* gene of *A. japonicus* was 49% in similarity and 34% in homology with EGFR of *Drosophila melanogaster* and 47% in similarity and 34% in homology with EGFR of *Danio rerio* and 49% in similarity and 31% in homology with EGFR of *Lymnaea stagnalis*. All results indicate that the *EGFR* gene of *A. japonicus* detected in this study is one of the *EGFR* family members. Based on the results above, expression of *EGFR* in different tissues by relative quantitative RT-PCR, the internal standard gene was *Cytb*. The result showed *EGFR* expresses in every tissue of *A. japonicus*, especially higher in coelomocyte and epidermis, which was 143.87 and 51.67 times of the respiratory tree, and the difference was significant to other tissues ($P < 0.05$). The expression of intestine and longitudinal muscle was low, only 10.82 times and 4.47 times of respiratory tree, and the difference was not significant ($P > 0.05$). These results indicate that the EGFR plays an important role in cell growth and tissue regeneration of *A. japonicus*.

Key words: *Apostichopus japonicus*; epidermal growth factor receptor (EGFR); gene clone; expression

Corresponding author: LI Xia. E-mail: lx@dlo.u.edu.cn