

文章编号: 1000-0615(2019)04-0742-09

DOI: 10.11964/jfc.20171011012

## 黄颡鱼Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路5个重要基因的识别及其在卵巢中的表达对铜暴露的响应

张丽晗, 罗智\*, 有文静, 李丹丹, 徐异桓, 潘亚雄

(华中农业大学水产学院, 动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 采用RT-PCR和RACE技术获取了黄颡鱼Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路5个重要基因*wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*的全长cDNA序列, 分别为1 743、2 133、1 379、1 508和2 636 bp, 其中ORF长度分别为1 052、1 115、872、1 160和2 372 bp, 分别编码351、372、291、387和791个氨基酸。氨基酸序列比对和系统发育树分析显示, 上述基因十分保守, 黄颡鱼与墨西哥丽脂鲤亲缘关系最近。组织表达分析显示, 上述基因的mRNA在脑、脾脏、肾脏、鳃、心脏、肌肉、肠系膜脂肪、肝脏及卵巢等组织中都有表达, 但表达水平不尽相同。这些基因在黄颡鱼卵巢中的表达水平对铜暴露的响应结果显示, 在暴露28 d时, *wnt3a* mRNA水平随着铜浓度的增加而降低, 而*wnt8a*趋势则相反, *wnt2*、*wnt2bb*和*ctnnb1*基因表达各个处理组间无显著性差异; 在56 d时, *wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*基因表达各个处理组间均无显著差异。研究表明, Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路基因的功能发生了分化, 部分成员可能介导了铜影响黄颡鱼卵巢发育的调控。

**关键词:** 黄颡鱼; Wnt/ $\beta$ -catenin; 基因克隆; 组织; 铜暴露

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

Wnt信号转导通路是机体重要的转导通路之一, 在调节细胞增殖、分化、胚胎发育和卵泡生成方面具有重要作用<sup>[1-2]</sup>, 它分为经典的Wnt信号通路和非经典的Wnt信号通路, 其中经典Wnt信号通路即Wnt/ $\beta$ -catenin通路, 主要由WNT1、WNT2、WNT3A和WNT8参与<sup>[3]</sup>, 是Wnt信号中研究最清楚的一条通路, 在整个进化过程中高度保守。目前在哺乳动物中已经克隆鉴定了19种WNT蛋白<sup>[4]</sup>, 并且表明Wnt在卵巢发育的各个时期广泛表达<sup>[5]</sup>; Wnt信号通路的错误调节可导致包括卵巢发育失调在内的多种病理变化<sup>[6-7]</sup>。在鱼类研究中同样克隆得到了Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路一些基因的cDNA序列, 如斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[8-10]</sup>等。最近, 本课题组克隆得到了黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)Wnt家族4个基因(*wnt5a*、*wnt5b*、*wnt7a*和*wnt9b*)的全长cDNA序列<sup>[11]</sup>。关于

它们的功能, 部分研究涉及到Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在鱼类发育过程中的生理作用<sup>[9]</sup>, 也有研究表明Wnt通路在哺乳动物卵巢发育和激素分泌过程中起着重要作用<sup>[12-13]</sup>。然而, 到目前为止, Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在鱼类发育和激素分泌中所起的作用尚不清楚。

铜是包括鱼类在内的脊椎动物必需的微量元素之一, 广泛地参与体内的许多生化过程, 然而, 过量的铜对生物体可产生毒性作用<sup>[14]</sup>。Zhang等<sup>[15]</sup>研究发现, 水体铜暴露能影响黄颡鱼的卵巢发育和激素分泌<sup>[15]</sup>, 进一步的研究表明铜差异性影响了黄颡鱼Wnt家族4个基因(*wnt5a*、*wnt5b*、*wnt7a*和*wnt9b*)的mRNA表达水平<sup>[11]</sup>。*wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*同是Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的重要成员, 研究者设想上述基因和蛋白介导了铜影响黄颡鱼卵巢发育的调控。所以, 作为

收稿日期: 2017-10-28 修回日期: 2017-12-24

资助项目: 国家自然科学基金(31422056)

通信作者: 罗智, E-mail: luozhi99@mail.hzau.edu.cn

全面解析黄颡鱼Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路功能的一部分, 本研究克隆得到了黄颡鱼Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路5个重要基因(*wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*)的全长cDNA序列, 探讨了它们的组织表达模式, 进一步研究了水体铜暴露对上述基因mRNA表达的影响, 为深入研究Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在鱼类卵巢发育和激素分泌中所起的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

本实验中雌性黄颡鱼分为2组, 均购自武汉上涉湖养殖场。第1组用于Wnt/ $\beta$ -catenin通路基因cDNA序列的克隆和组织表达水平的测定。用于基因克隆的黄颡鱼组织样品为肝脏和卵巢组织。用于基因表达谱测定的组织包括脑、脾脏、肾脏、鳃、心脏、肌肉、肠系膜脂肪、肝脏和卵巢。取样参考文献[16-17]。

第2组用于探讨水体铜暴露对黄颡鱼卵巢Wnt/ $\beta$ -catenin家族基因表达水平的影响。实验参照已有方法[15], 并在相应的平行研究中做了详细的叙述[11]。216尾规格均一的黄颡鱼[平均体质量(10.2±0.2) g, mean±SE]随机放入9个300 L玻璃纤维缸中, 每缸24尾, 分别暴露在铜浓度为0(对照组)、30(低浓度组)和60(高浓度组)  $\mu\text{g/L}$ 的水体中, 每个处理设3个重复(即3个缸)。水中铜浓度的实测值分别为(3±1)  $\mu\text{g/L}$ 、(31±2)  $\mu\text{g/L}$ 和(62±3)  $\mu\text{g/L}$  (mean±SE, n=16)。实验期间, 黄颡鱼每天饱食投喂商业饲料2次。实验持续8周, 分别在第28天和56天进行取样, 用于基因表达水平的测定。

### 1.2 实验药品

RNA提取试剂盒(Trizol Reagent)、逆转录试

剂盒、3'-Full RACE Kit试剂盒、5'-Full RACE Kit试剂盒、荧光定量试剂盒、凝胶纯化回收试剂盒、*Taq*酶、DNA Marker (2000)、dNTP等试剂购自大连宝生物公司(TaKaRa); 胰蛋白胨和酵母粉购自Sigma公司; 无水乙醇、氯仿、异丙醇等为中国国药分析纯产品。

### 1.3 Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路5个基因cDNA序列的克隆

参考文献[16-17], 总RNA的提取参照Invitrogen的TRIzol说明书进行。总RNA的质量通过琼脂糖凝胶电泳进行检测, 其浓度及OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>值通过Nanodrop ND-2000分光光度计测定。然后, 以提取的总RNA为模板, 用TaKaRa的反转录试剂盒(PrimeScript<sup>TM</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)合成第一链cDNA。

根据GenBank及Ensembl数据库中已报道的鱼类*wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*基因序列, 设计简并引物(表1), 以扩增其基因cDNA核心片段。PCR反应程序: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 30个循环; 72 °C终延伸5 min。然后分别设计3'和5' RACE特异性引物(表1)进行巢式PCR反应。Outer-PCR反应参数: 94 °C预变性3 min; 然后94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共25个循环; 最后72 °C再延伸10 min。Inner-PCR反应参数: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 共30个循环; 最后72 °C终延伸10 min。

### 1.4 序列分析

用DNASar软件将扩增得到的核心片段、3'和5'末端序列拼接, 从而获得基因cDNA全长。

表1 黄颡鱼*wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1* cDNA序列信息

Tab. 1 The information for *wnt2*, *wnt2bb*, *wnt3a*, *wnt8a* and *ctnnb1* cDNAs cloned from *P. fulvidraco*

基因 genes	长度/bp length	5'非翻译区/bp 5'-UTR	3'非翻译区/bp 3'-UTR	开放阅读框/bp ORF	氨基酸数量/个 number of amino acids
<i>wnt2</i>	1 743	205	486	1 052	351
<i>wnt2bb</i>	2 133	216	802	1 115	372
<i>wnt3a</i>	1 379	116	391	872	291
<i>wnt8a</i>	1 508	22	326	1 160	387
<i>ctnnb1</i>	2 636	217	47	2 372	791

获得的核苷酸序列经NCBI进行BLAST, 以确定该序列对应的基因亚型(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。同时, 运用DNASTar软件找出开放阅读框(ORF)并翻译成氨基酸序列。序列比对和氨基酸同源性分析使用Clustal-W软件。进化树用MEGA 5.0软件采用邻接法(NJ)构建<sup>[18]</sup>, 选择的最适进化模型为JTT+G<sup>[19]</sup>, 每个节点的可信值进行1 000次重复计算。

### 1.5 基因的组织分布和表达分析

参考文献[16-17]中的方法, 采用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)方法检测, 荧光定量引物见表2。qRT-PCR反应参数: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 57 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共40个循环。相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算<sup>[20]</sup>。选用双内参( *$\beta$ -actin*和*gapdh*)进行标准化。本研究预试验表明, 这2个内参组合在黄颡鱼不同组织及不同铜暴露浓度下的表达水平是稳定的。

### 1.6 数据分析

结果采用平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE)进行表示。统计分析之前, 采用Kolmogorov-Smirnov检验所有数据的正态分布性。不同处理间方差的同质性使用Bartlett检验。实验处理组之间进行单因素方差分析和Duncan氏多重比较检验。显著性水平取0.05。采用SPSS 19.0软件进行数据分析。

## 2 结果

### 2.1 *wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*序列的分子特征及进化分析

本研究通过RT-PCR和RACE方法获得*wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*基因的cDNA全长序列, 长度分别为1 743、2 133、1 379、1 508和2 636 bp (表1)。序列分析显示它们的cDNA序列ORF长度分别为1 052、1 115、872、1 160和2 372 bp, 翻译成蛋白所得到的氨基酸数分别为351、372、291、387和791。

多肽序列比对发现黄颡鱼WNT2、WNT2BB、WNT3A、WNT8A和CTNNB1氨基酸序列与其他鱼类和哺乳类的同源性分别为69.7%~85.7%、72.5%~87.6%、71.3%~89.0%、60.4%~74.4%和95.5%~97.4%(表2)。

黄颡鱼和其他脊椎动物*wnts*和*ctnnb1*基因的进化树见图1。在进化树中, 硬骨鱼WNT2BB、WNT3A、WNT8A与两栖类聚为一支, 哺乳类独立聚为另外一支。其中黄颡鱼WNT2BB和WNT8A与墨西哥丽脂鲤(*Astyanax mexicanus*)亲缘关系最近; 硬骨鱼WNT2独立聚为一支, 而两栖类和哺乳类WNT2与WNT2BB聚为另外一支; 与其他硬骨鱼类相比, 黄颡鱼WNT2与墨西哥丽脂鲤亲缘关系最近(图1-a); 哺乳动物CTNNB1单独聚为一支, 黄颡鱼CTNNB1与斑马鱼和墨西哥丽脂鲤聚为一支, 与其亲缘关系最近(图1-b)。

表2 黄颡鱼WNT2、WNT2BB、WNT3A、WNT8A和CTNNB1氨基酸序列与其他鱼类同源性分析

Tab. 2 Amino acid sequence identity of WNT2, WNT2BB, WNT3A, WNT8A and CTNNB1 between

*P. fulvidraco* and other species

序列 sequences	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>	犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	马 <i>Equus caballus</i>	人 <i>Homo sapiens</i>	%
WNT2	85.7	76.9	65.5	71.1	69.7	71.1	70.6	
WNT2BB	87.6	85.2	83.9	72.5	76.3	76.5	72.5	
WNT3A	89.0	86.6	71.3	82.4	82.8	74.7	81.7	
WNT8A	74.4	67.0	69.3	58.4	62.0	62.6	60.4	
CTNNB1	97.4	95.5	96.5	96.7	96.8	96.8	96.8	

注: Ensemble数据库登录物种顺序依次为斑马鱼、青鳉、热带爪蟾、小鼠、犬、马和人

Notes: EMBL databases accession numbers are WNT2 (ENSDARG00000041117; ENSORLG00000019570; ENSXETG00000031217; NSMUSG00000010797; ENSCAFP00000041532; ENSECAG00000024641; ENSG00000105989); WNT2BB (ENSDARG00000032234; ENSORLG00000008125; ENSXETP00000015100; ENSMUSP00000029429; ENSCAFP00000030487; ENSECAP00000004232; ENSP00000358698); WNT3A (ENSDARG00000058822; ENSORLG00000017597; ENSXETG00000025910; ENSMUSP00000010044; ENSCAFG00000001179; ENSECAG00000019704; ENSG00000154342); WNT8A (ENSODARP000000116057; ENSORLP00000009605; ENSXETP00000008323; ENSMUSP00000012426; ENSCAFP00000001653; ENSECAP00000012484; ENSP00000426653); CTNNB1 (ENSODARP00000032935; ENSORLP00000007357; ENSXETP00000030302; ENSMUSP00000007130; ENSCAFP00000007783; ENSECAP00000005466; ENSP00000344456). The order of accession numbers of each gene corresponds to *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Xenopus tropicalis*, *Mus musculus*, *Canis lupus familiaris*, *Equus caballus* and *Homo sapiens*, respectively

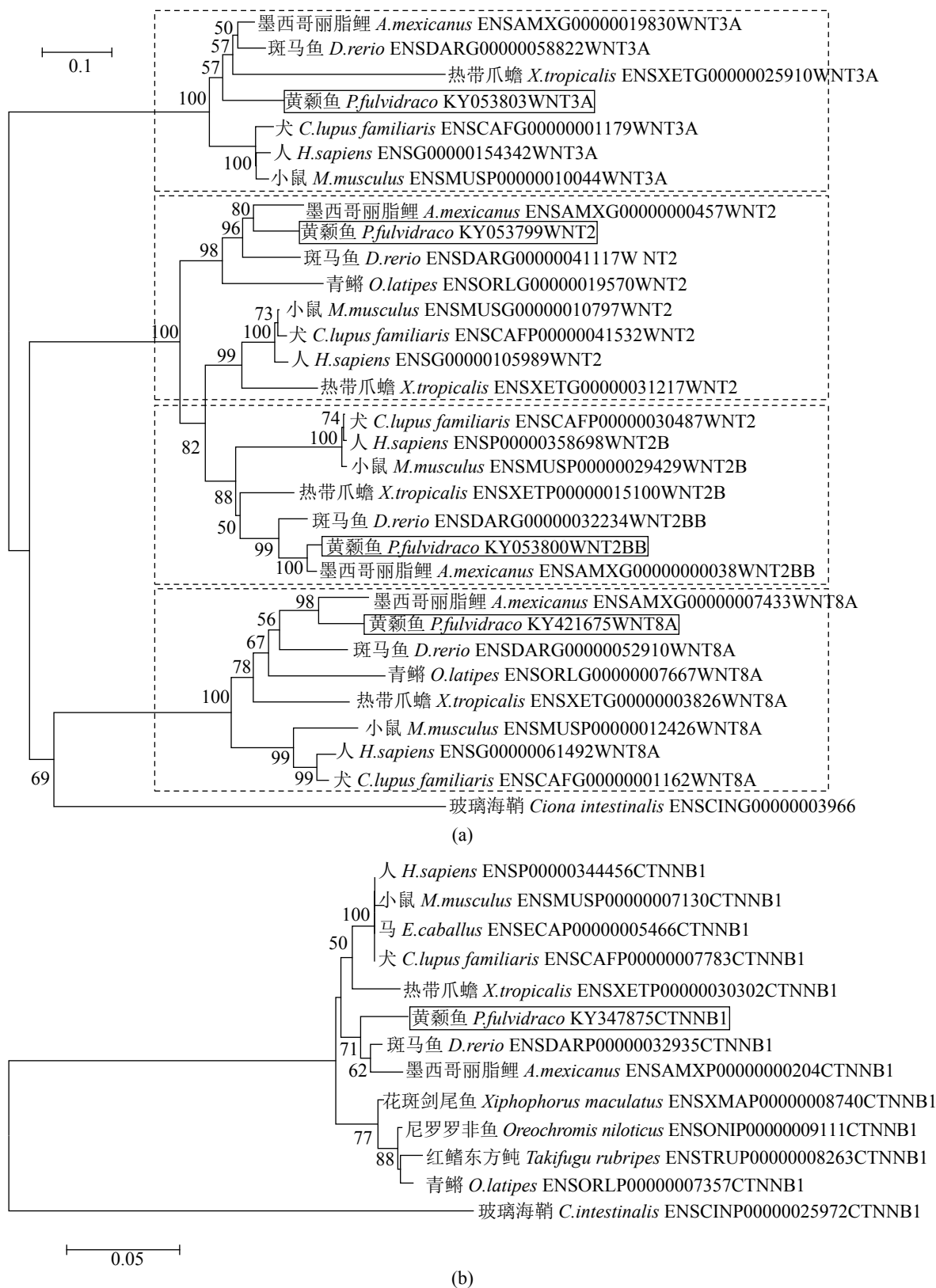


图 1 基于 NJ 法构建的脊椎动物 WNTs (a) 和 CTNNB1 (b) 氨基酸序列的系统发育树

Bootstrap 检验的重复次数为 1 000 次

Fig. 1 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences from vertebrate WNTs (a) and CTNNB1 (b)

The tree is based on a 1 000 bootstrap procedure

### 2.2 *wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*序列的mRNA组织表达模式

*wnt2* mRNA在肌肉中表达最高，其次是鳃和肠脂，而在其他组织中无显著差异(图2-a)；*wnt2bb* mRNA在肌肉中表达最高，其次是肠脂、脾脏、脑、鳃、肝脏，而在其他组织中无显著

性差异(图2-b)；*wnt3a* mRNA在肠脂中表达最高，其次是肌肉、鳃、脑，而在其他组织中无显著性差异(图2-c)；*Wnt8a* mRNA在肌肉中表达最高，其次是卵巢，在脑、脾脏、肾脏、鳃、心脏、肠脂、肝脏等组织中无显著性差异(图2-d)；*ctnnb1* mRNA在脑中表达最高，其次是卵巢，而

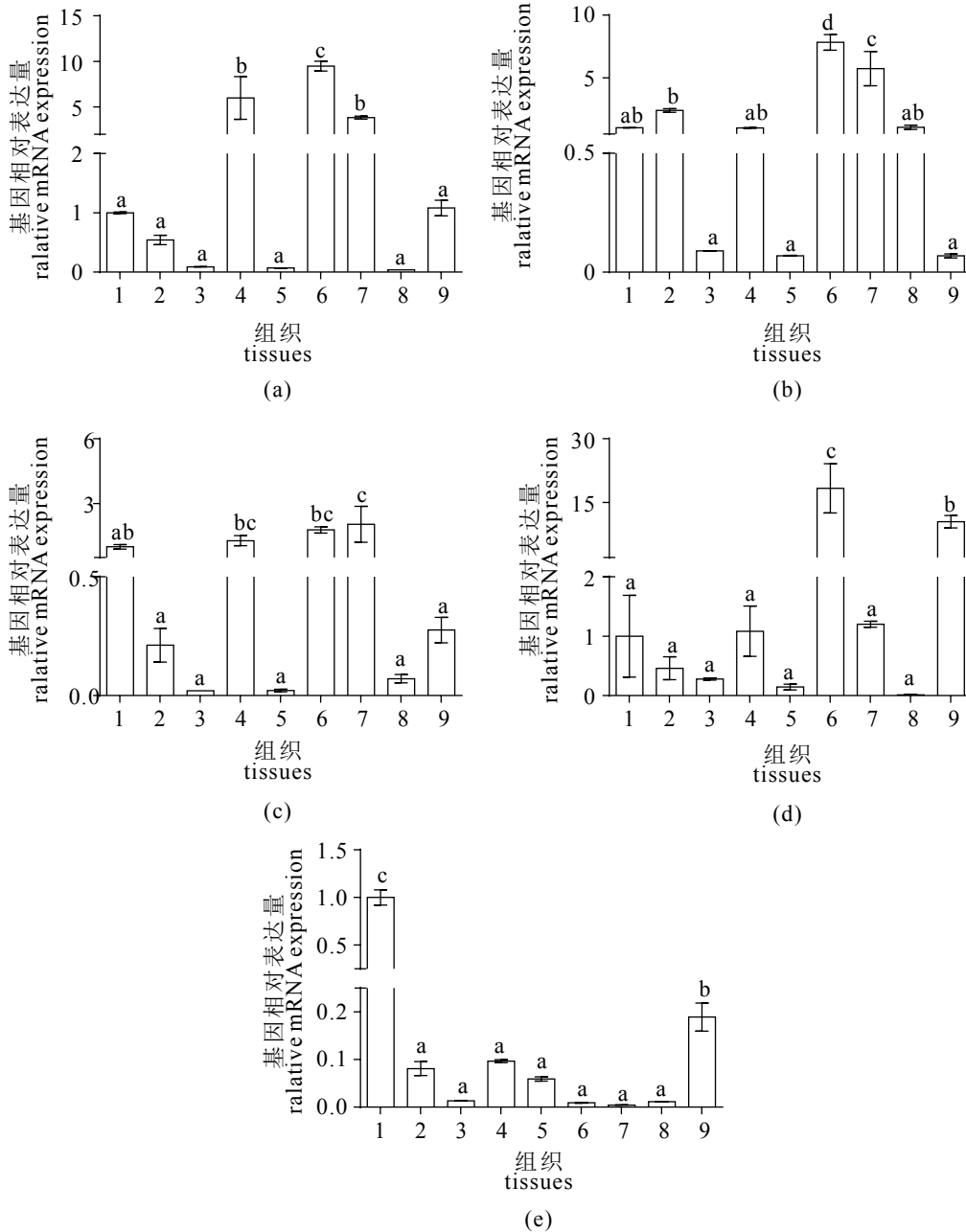


图2 黄颡鱼 *Wnts*和*ctnnb1*在不同组织中的表达情况

(a) *wnt2*, (b) *wnt2bb*, (c) *wnt3a*, (d) *wnt8a*, (e) *ctnnb1*; 1. 脑, 2. 脾, 3. 肾, 4. 鳃, 5. 心脏, 6. 肌肉, 7. 肠脂, 8. 肝脏, 9. 卵巢; 不同字母表示有显著性差异, 下同

Fig. 2 Relative expression of *P. fulvidraco wnts* and *ctnnb1* in different organs and tissues

(a) *wnt2*, (b) *wnt2bb*, (c) *wnt3a*, (d) *wnt8a*, (e) *ctnnb1*; 1. brain, 2. spleen, 3. kidney, 4. gill, 5. heart, 6. muscle, 7. fat, 8. liver, 9. ovary; different letters indicate significant difference, the same below



在脾脏、肾脏、鳃、心脏、肠脂和肝脏中无显著性差异(图2-e)。

### 2.3 水体铜暴露对黄颡鱼卵巢 *wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*基因表达水平的影响

在暴露28 d, *wnt3a* mRNA水平随着铜浓度的增加而降低, 而*wnt8a*则呈现相反的结果(图3-a)。在暴露56 d, 各个基因表达与对照组相比, 30  $\mu\text{g/L}$ 和60  $\mu\text{g/L}$ 铜暴露均无显著差异(图3-b)。

## 3 讨论

### 3.1 *wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*序列的分子特征与进化分析

本研究克隆得到了黄颡鱼*wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*基因的cDNA全长序列。分析这些基因的蛋白序列发现, 黄颡鱼CTNNB1和其他鱼类及哺乳类有相同的氨基酸残基和剪切位点, 4个WNT蛋白具有一些保守的结构域, 如具有N-糖基化位点和保守的半胱氨酸残基等<sup>[8, 21-22]</sup>。研究指出, WNT蛋白富含半胱氨酸, 这些半胱氨酸之间形成的二硫键对其正确折叠非常重要。N-糖基化是WNT蛋白的一个重要修饰, 它们对WNT的分泌和正常功能的行使至关重要<sup>[23]</sup>。进化树分析进一步发现黄颡鱼WNT2、WNT2BB、WNT3A、WNT8A和CTNNB1多肽与其他鱼类的亲近性和物种的分类地位相符, 与曹梅等<sup>[24]</sup>在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)中的研究结果相似。

### 3.2 *wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*序列的组织表达模式

研究基因的组织分布模式有助于了解该基

因潜在的生理功能。*Wnt*分子可激发细胞内多种信号途径, 参与生物体多种生理与病理学过程, 然而, 目前在鱼类中有关这些基因mRNA组织表达模式还未见报道。本研究表明, *wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*基因在黄颡鱼各组织中均有表达, 但不同组织间的表达水平差异较大, 表明Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路广泛地参与机体各个组织的生理活动; 另一方面不同组织差异性的表达模式可能反映了不同组织特有的生物学作用。相似的, Ricken等<sup>[22]</sup>指出*wnt2*和*wnt2b*在小鼠卵巢中均有表达, 表明*wnt2*和*wnt2b*在卵巢发育和成熟中起着重要的调控作用。

### 3.3 水体铜暴露对黄颡鱼卵巢组织 *wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*基因表达水平的影响

前言中已提及, 本研究的假设之一是铜对黄颡鱼卵巢发育和激素合成的影响与Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路有关。然而, 无论是陆生(包括哺乳动物)还是水生动物, 目前还没有有关铜影响Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路这些基因表达水平的报道; 而且, 目前仅见Wnt通路能通过激活 $\beta$ -catenin提高FSH的作用效果<sup>[12]</sup>, FSH可影响性腺合成和性激素分泌, 从而影响卵泡发育、成熟和排卵, 所以可以推断铜可直接或间接通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路来调节卵巢发育和激素合成。本研究表明, 在28 d时, *wnt3a* mRNA水平随着铜浓度的增加而降低, 而*wnt8a*则呈现相反的结果; 在56 d, 这几个基因的表达水平均无显著性差异。Wnt经典通路(Wnt/ $\beta$ -catenin)是通过 $\beta$ -catenin和其他分子的共同作用来调节细胞增殖、分化等<sup>[1, 25-26]</sup>。有

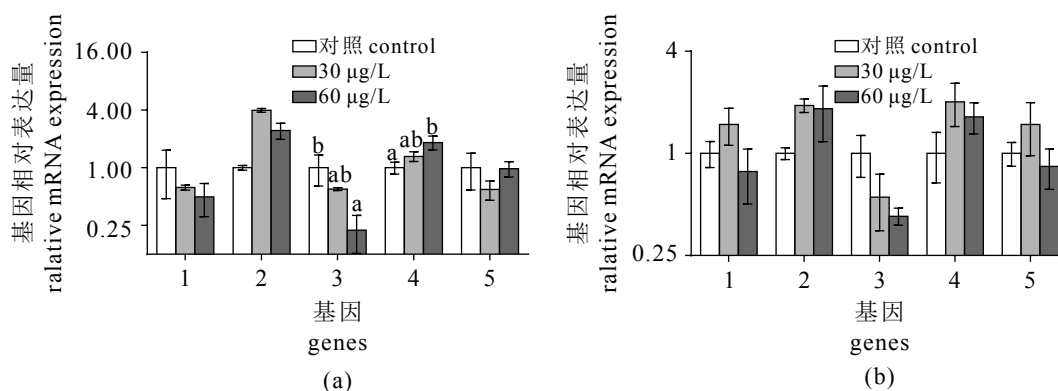


图3 第28天(a)和第56天(b)铜暴露对黄颡鱼卵巢中 *wnts*和*ctnnb1*基因mRNA表达的影响

Fig. 3 Effect of Cu exposure on the mRNA levels of genes in the ovary of *P. fulvidraco* on day 28(a) and day 56(b)

1. *wnt2*, 2. *wnt2bb*, 3. *wnt3a*, 4. *wnt8a*, 5. *ctnnb1*

研究指出, *wnt2*在未成熟小鼠卵泡发育各个时期的卵巢粒层细胞中均有表达<sup>[22]</sup>, 并且在添加FSH培养的牛粒层细胞中*wnt2*基因表达量上升<sup>[27]</sup>, 说明Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路参与并调控卵巢组织的生长与发育。本研究初步发现, 在低铜诱导下, Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路可能参与铜影响的黄颡鱼卵巢发育和激素合成的调节。最近的研究也发现, 作为Wnt通路的重要成员, FZD家族部分成员也介导了铜影响黄颡鱼卵巢发育的调控<sup>[28]</sup>。因此, 深入阐明Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在铜影响黄颡鱼卵巢发育和激素合成中的作用机制, 有助于揭示铜影响黄颡鱼卵巢发育和激素合成的机理, 这将为研究铜的繁殖营养和毒性效应提供新的思路。

本研究获得了黄颡鱼*wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*基因的cDNA全长序列, 为深入解析它们的功能奠定了基础; 研究发现这些基因在脑、脾脏、肾脏、鳃、心脏、肌肉、脂肪、肝脏及卵巢中都有表达, 但表达水平不尽相同, 表明它们广泛地参与黄颡鱼体内的生理过程; 铜暴露差异性影响了Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路*wnt2*、*wnt2bb*、*wnt3a*、*wnt8a*和*ctnnb1*基因的mRNA水平, 表明它们的基因功能发生了分化, 并可能介导了铜影响黄颡鱼卵巢发育的调控。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways[J]. *Organogenesis*, 2008, 4(2): 68-75.
- [ 2 ] Wu G C, Chang C F. Wnt4 is associated with the development of ovarian tissue in the protandrous black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(4): 1073-1082.
- [ 3 ] Shimizu H, Julius M A, Giarre M, *et al.* Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of  $\beta$ -catenin[J]. *Cell Growth & Differentiation*, 1997, 8(12): 1349-1358.
- [ 4 ] Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway[J]. *Journal of Cell Science*, 2002, 115(21): 3977-3978.
- [ 5 ] Harwood B N, Cross S K, Radford E E, *et al.* Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos[J]. *Developmental Dynamics*, 2008, 237(4): 1099-1111.
- [ 6 ] Logan C Y, Nusse R. The wnt signaling pathway in development and disease[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004, 20: 781-810.
- [ 7 ] Boerboom D, Paquet M, Hsieh M, *et al.* Misregulated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling leads to ovarian granulosa cell tumor development[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(20): 9206-9215.
- [ 8 ] Kelly G M, Greenstein P, Erezyilmaz D F, *et al.* Zebrafish *wnt8* and *wnt8b* share a common activity but are involved in distinct developmental pathways[J]. *Development*, 1995, 121(6): 1787-1799.
- [ 9 ] Blader P, Strähle U, Ingham P W. Three *Wnt* genes expressed in a wide variety of tissues during development of the zebrafish, *Danio rerio*: developmental and evolutionary perspectives[J]. *Development Genes and Evolution*, 1996, 206(1): 3-13.
- [10] Buckles G R, Thorpe C J, Ramel M C, *et al.* Combinatorial Wnt control of zebrafish midbrain-hindbrain boundary formation[J]. *Mechanisms of Development*, 2004, 121(5): 437-447.
- [11] 张丽哈, 罗智, 有文静, 等. 黄颡鱼Wnt家族4个基因的克隆、组织表达及对铜的响应研究[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(3): 463-472.  
Zhang L H, Luo Z, You W J, *et al.* Molecular characterization and tissue distribution of four Wnt genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their response to copper exposure[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(3): 463-472(in Chinese).
- [12] Fan H Y, O'connor A, Shitanaka M, *et al.*  $\beta$ -catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses LH-mediated ovulation and luteinization[J]. *Molecular Endocrinology*, 2010, 24(8): 1529-1542.
- [13] Sanchez A M, Viganò P, Quattrone F, *et al.* The WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway and expression of survival promoting genes in luteinized granulosa cells: endometriosis as a paradigm for a dysregulated apoptosis pathway[J]. *Fertility and Sterility*, 2014, 101(6): 1688-1696.
- [14] Watanabe T, Kiron V, Satoh S. Trace minerals in fish nutrition[J]. *Aquaculture*, 1997, 151(1-4): 185-207.
- [15] Zhang L H, Luo Z, Song Y F, *et al.* Effects and mechanisms of waterborne copper exposure influencing ovary development and related hormones secretion in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 178: 88-98.
- [16] Wu K, Zheng J L, Luo Z, *et al.* Carnitine palmitoyltrans-

- ferases I gene in *Synechogobius hasta*: cloning, mRNA expression and transcriptional regulation by insulin *in vitro*[J]. *Gene*, 2016, 576(1): 429-440.
- [17] Wei C C, Luo Z, Song Y F, *et al.* Identification of autophagy related genes LC3 and ATG4 from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their transcriptional responses to waterborne and dietborne zinc exposure[J]. *Chemosphere*, 2017, 175: 228-238.
- [18] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [19] Jones D T, Taylor W R, Thornton J M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences[J]. *Bioinformatics*, 1992, 8(3): 275-282.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Saitoh T, Hirai M, Katoh M. Molecular cloning and characterization of WNT3A and WNT14 clustered in human chromosome 1q42 region[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 284(5): 1168-1175.
- [22] Ricken A, Lochhead P, Kontogianna M, *et al.* Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(7): 2741-2749.
- [23] Mason J O, Kitajewski J, Varmus H E. Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1992, 3(5): 521-533.
- [24] 曹梅, 王兴强, 崔春辉, 等. 鲢鱼Wnt基因家族序列分析[J]. *淮海工学院学报(自然科学版)*, 2017, 26(1): 76-81.
- Cao M, Wang X Q, Cui C H, *et al.* Sequence analysis of Wnt gene family from catfish[J]. *Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Science Edition)*, 2017, 26(1): 76-81(in Chinese).
- [25] Willert K, Jones K A. Wnt signaling: is the party in the nucleus?[J]. *Genes & Development*, 2006, 20(11): 1394-1404.
- [26] Angers S, Moon R T. Proximal events in Wnt signal transduction[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(7): 468-477.
- [27] Castañón B I, Stapp A D, Gifford C A, *et al.* Follicle-stimulating hormone regulation of estradiol production: possible involvement of WNT2 and  $\beta$ -catenin in bovine granulosa cells[J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(11): 3789-3797.
- [28] 张丽晗, 罗智, 有文静, 等. 黄颡鱼FZD家族4个基因的克隆、组织表达及对铜的响应[J]. *水产学报*, 2018, 42(5): 625-632.
- Zhang L H, Luo Z, You W J, *et al.* Molecular characterization and tissue distribution of Frizzled (FZD) in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) by copper exposure[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(5): 625-632(in Chinese).



## Identification of five genes from Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and their mRNA expression in the ovary to waterborne copper exposure

ZHANG Lihan, LUO Zhi\*, YOU Wenjing, LI Dandan, XU Yihuan, PAN Yaxiong

(Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics Breeding and Reproduction, Ministry of Education, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Five complete cDNA sequences related to Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway, designated *wnt2*, *wnt2bb*, *wnt3a*, *wnt8a* and *ctnnb1*, were amplified by RT-PCR and RACE approaches from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). The validated cDNAs encoding *wnt2*, *wnt2bb*, *wnt3a*, *wnt8a* and *ctnnb1* were 1 743, 2 133, 1 379, 1 508 and 2 636 bp in length, encoding peptides of 351, 372, 291, 387 and 791 amino acid residues, respectively. The amino acid alignment and phylogenetic analysis revealed that these sequences were relatively conserved among vertebrates, and Wnt/ $\beta$ -catenin genes of *P. fulvidraco* were more closely related to those of *Astyanax mexicanus*. All Wnt/ $\beta$ -catenin mRNAs were expressed in nine tested tissues (brain, spleen, kidney, gill, heart, muscle, mesenteric fat, liver and ovary), but at variable levels. Effect of waterborne Cu exposure on ovarian mRNA levels of the five genes of *P. fulvidraco* were determined. On day 28, *wnt3a* mRNA levels in the ovary significantly decreased with increasing waterborne Cu concentration, but *wnt8a* showed the opposite trend. On day 56, mRNA levels of these five genes from the ovary of *P. fulvidraco* showed no significant differences among the three groups. The present study may be helpful to understand the physiological functions of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in fish.

**Key words:** *Pelteobagrus fulvidraco*; Wnt/ $\beta$ -catenin; gene cloning; tissue; copper exposure

**Corresponding author:** LUO Zhi. E-mail: luozhi99@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31422056)