

牙鲆变态中两种 *HSP90* 基因的不同表达及其与甲状腺激素的关系

张俊玲, 施志仪*, 程琦, 贾亮

(上海海洋大学农业部水产种质资源和养殖生态重点开放实验室, 上海 201306)

摘要: 热休克蛋白 90 (heat shock protein90, HSP90) 是细胞内主要的伴侣蛋白, 在激素信号转导、细胞分化、细胞增殖与凋亡、形态发生与进化、变态发育及应激防御等多重调节路径中发挥关键作用。采用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测了牙鲆两种 *HSP90* 基因在仔鱼发育和在成年组织中的表达变化。结果表明, *HSP90 α* 在成鱼骨骼肌、肠和胃中有较高的表达, 而 *HSP90 β* 在成鱼脑、脾脏和肾脏中有较高的表达。*HSP90 α* mRNA 水平在仔鱼变态期间迅速增加, 至变态高峰 G 期达到最高水平; 相反, *HSP90 β* 转录在仔鱼整个变态期间变化不是特别明显。鉴于甲状腺激素 (thyroid hormone, TH) 在牙鲆变态中的重要作用, 还运用外源的 TH 及硫脲 (thiourea, TU) 处理牙鲆仔鱼来确定 TH 对 *HSP90* 基因转录的调节。与未处理组相比, *HSP90 α* 转录在 TH 处理 8 d 和 13 d 的仔鱼中显著增加, 而在 TU 处理仔鱼中明显减少; 但 *HSP90 β* mRNA 水平不受药物处理影响。从上述结果分析, 牙鲆中 *HSP90 α* 的转录很可能被甲状腺激素上调, 而且其在牙鲆的变态发育中发挥了重要作用。

关键词: 牙鲆; 变态发育; 热休克蛋白 90; 基因表达; 甲状腺激素; 硫脲; 荧光定量 RT-PCR
中图分类号: Q 785; S 917
文献标识码: A

热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 是一组具有重要生理功能、结构上高度保守的蛋白质, 在细胞受到热诱导、渗透压、重金属污染、组织创伤及微生物感染时大量合成^[1-4]。根据分子量大小和同源程度可分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和低分子量 HSP 等几个家族, 其中 HSP90 是细胞内主要的伴侣蛋白 (chaperone proteins)^[5-7], 在大多数细胞中普遍存在, 占细胞总蛋白的 1% ~ 2%^[8]。在脊椎动物中 HSP90 主要包括胞浆型的 HSP90 α 和 HSP90 β , 内质网型的 HSP90B (即 Grp94) 以及线粒体 HSP90 同源物 TRAP^[9-10], 它们能特异地与多种细胞功能蛋白如类固醇激素受体、蛋白激酶、逆转录蛋白、细胞骨架蛋白等结合而改变这些蛋白的功能状态^[11-13], 由此广泛参与和调控激素信号转导、细胞分化、细胞增殖与凋亡、形态发生与进化、免疫

反应以及应激防御等众多的细胞过程^[14-16], 是目前研究机体生长发育和应激防御及免疫机制的热点之一。

HSP90 蛋白与多种生物的变态发育有关, 在海鞘中, 如果抑制 HSP90 的作用可促进其变态期间尾的退化^[17]。在果蝇中, HSP90 与蜕皮激素受体 (ecdysteroid receptor, EcR) 结合能诱发变态^[18]。而在鱼类中, 最新研究表明 *HSP90* 基因在塞内加尔鲷 (*Solea senegalensis*) 变态前后出现了不同的基因表达^[19]。但是, 有关 HSP90 在牙鲆变态中的作用, 目前国内外很少有报道。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 隶属鲽形目 (Pleuronectiforms), 是重要的海水经济鱼类。在它的早期生活史中有一个非常奇特的变态发育过程, 不仅右眼迁移至身体的左侧, 变态前后其肌纤维结构、食性、体位、生活方式等都发生了剧烈的

收稿日期: 2010-02-25 修回日期: 2010-04-19

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30571420); 上海市重点学科水生生物学建设项目 (S30701); 上海海洋大学青年基金项目 (05-151)

通讯作者: 施志仪, Tel: 021-61900051, E-mail: zyshi@shou.edu.cn

变化^[20],经过变态其两侧对称的仔鱼转变为不对称的稚鱼。牙鲆的这种变态发育主要由甲状腺激素(thyroid hormone, TH)调控,其作用主要通过与其专一性类固醇激素受体(thyroid hormone receptor, TR)结合调节特定基因转录而实现的^[21]。一些与牙鲆变态相关的基因也陆续被报道,如碱性磷酸酶^[22]、*Sox9*、*Bmp2* 和 *Bmp4*^[23]等,但至今仍不能清楚阐述牙鲆变态的详细机制。最近,牙鲆两种 HSP90 基因的分子序列已被克隆,即胞浆型的 HSP90 α (GI:110226521) 和 HSP90 β (GI:110226523)。但是有关 HSP90 基因表达在牙鲆中的组织分布、变态前后的发育变化及 TH 对其基因转录的影响未见报道。鉴于 HSP90 在激素信号转导、细胞分化、细胞增殖与凋亡以及多种生物变态发育中的重要作用,本研究采用实时荧光定量 RT-PCR(real-time PCR)技术检测了牙鲆两种 HSP90 基因在仔鱼发育和在成年组织中的表达,同时运用 TH 及其合成抑制剂硫脲(thiourea, TU)处理牙鲆仔鱼来确定 TH 对 HSP90 基因转录的调节,为探讨 HSP90 在牙鲆变态中的作用,进一步阐述牙鲆变态的机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验所用的牙鲆成鱼($n=3$ 尾)购自上海市铜川路水产品市场,解剖取其肝脏、心脏、脾脏、肾脏、胃、肠、骨骼肌、脑和鳃组织,用 DEPC 水冲洗干净后在液氮中速冻,然后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

所用牙鲆仔鱼取自中国水产科学研究院北戴河中心实验站。经人工授精的卵子在 $15\sim 16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的过滤天然海水中孵化 3 d 后出膜。孵化后 3~20 d 投喂经小球藻液培养的轮虫,从孵化后 14 d 开始增加投喂初孵卤虫无节幼体至实验结束。整个养殖期间水温保持在 $14\sim 16\text{ }^{\circ}\text{C}$,每天吸污换水 2 次,每次换 1/2 水量。样品的采集分别在孵化后 17、21、24、29、33 和 36 d 进行,对应于 Minami^[24] 的 D~I 期:(1) D 期即变态前,仔鱼眼睛还没有开始移动,两只眼睛左右完全对称;(2) E 期眼睛刚刚开始移动,仔鱼开始变态;(3) F 期即变态早期,从左侧可以看见右侧的眼睛,右眼上缘还没有到达头顶;(4) G 期即变态高峰期,右眼上缘超过头顶;(5) H 期即变态后期,

右眼刚好位于头顶;(6) I 期眼睛移动结束,仔鱼完成变态,之后进入稚鱼期。样品鱼先用 DEPC 水冲洗干净,在 RNastore 中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2 d 以去除内源的 RNase,之后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

为了研究两个 HSP90 基因的表达是否依赖 TH 的调控,分别采用 TH 和 TU 处理牙鲆仔鱼。将孵化后 15 d 的牙鲆仔鱼转移到 3 个 300 L 水体的圆形槽中,其中 1 个作为对照组,2 个在孵化后 17 d 时分别添加 0.1 mg/L 的 TH 和 30 mg/L 的 TU,方法参照 Inui 等^[25],吸污换水后及时补充药物,使整个处理期间保持药物浓度不变。样品的采集分别在药物处理后 8 和 13 d 进行,方法同上。

以上所有仔鱼的取样均分为 3 个平行的样品组,即 $n=3$ 。

1.2 主要药品和试剂

甲状腺激素(TH)、硫脲(TU)购自 Sigma 公司, RNastore 样品保存液、大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、胶回收试剂盒和质粒小抽试剂盒购自天根公司, TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, DNase I 购自 Qiagen 公司, PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis kit, SYBR[®] Premix Ex TaqTM, pMD-18 载体购自 TaKaRa 公司。

1.3 RNA 提取和逆转录

所有样品组总 RNA 的提取均采用 TRIzol 法,步骤按照试剂盒说明书的指导进行。实验所用器材及操作中严格防止 RNase 的污染。为了除去少量的基因组 DNA,所有 RNA 样品均用 DNase I 处理 30 min。RNA 的浓度和纯度采用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测, OD_{260/280} 值均在 $1.90\sim 2.05$, RNA 完整性良好。所有 RNA 样品各取 500 ng,按照 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis kit 说明合成 cDNA 第一条链。

1.4 实时荧光定量 PCR

定量引物采用 Primer 5.0 设计,为了检测两个 HSP90 基因的扩增特异性,将 HSP90 α 和 HSP90 β 的普通 PCR 产物纯化,连接到 pMD-18 载体,转化、克隆后抽提质粒,然后以 HSP90 α 和 HSP90 β 质粒为模板,分别用 HSP90 α 和 HSP90 β 的引物进行 PCR 扩增,由此确认引物是否存在非特异性退火。

使用 iCycler PCR 仪(Bio-Rad)进行 RT-PCR

反应。首先以 10 倍梯度稀释的仔鱼 cDNA 为模板制作两个 *HSP90* 目的基因和参照基因 β -actin 的标准曲线。PCR 反应体系总体积为 25 μ L, 包括 10 ng RNA 逆转录得到的 cDNA, 400 nmol/L 基因特异性的正反向引物(表 1), 12.5 μ L SYBR[®] Premix Ex Taq[™]。PCR 反应采用两步法, 程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火~延伸 30 s, 共 40 个循环, 实时采集荧光; 55 $^{\circ}$ C 30 s 上升到 95 $^{\circ}$ C, 共 81 个循环获得熔解曲线。各基因的熔解曲线均只有一个特异性单峰, 标准曲线显示 *R* 值均大于 0.998, 相应的扩增效率(*E*)高于 0.95, 而且目的基因和参照基因的 *M* 值相差小于 0.1。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物

Tab.1 Primer sequences for real-time quantitative PCR

基因 gene	引物序列 primer sequence(5'→3')	片段大小(bp) size
<i>HSP90α</i>	F: AGCGTTCAGAAGTAGTGT	158
<i>HSP90α</i>	R: GTTCTAAAGGAATGACTA	
<i>HSP90β</i>	F: TCGTGCCAGAGCATTAC	161
<i>HSP90β</i>	R: ACCATTCCCATGTTCCAC	
β -actin	F: GGAAATCGTGCATGACATTAAG	155
β -actin	R: CCTCTGGACAACGGAACCTCT	

注: F. 正向引物; R. 反向引物。

Notes: F. forward primer; R. reverse primer.

采用上述条件进行所有实验样品的目的基因定量, 设 3 次重复。为了标准化 PCR 反应中加入的样品 RNA 或 cDNA 量, 采用相同反应体系和条件, 在不同的 PCR 管中同时进行参照基因 β -actin 的 PCR 反应。

1.5 数据分析

两个 *HSP90* 基因的相对 mRNA 水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[26] 计算, 其数值用平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示, $n=3$ 。统计分析时不同组织以肝脏中的相对 mRNA 量为对照, 不同发育阶段和药物处理实验以孵化后 17 d 仔鱼中的相对 mRNA 量为对照, 采用 One-Way 方差分析, 用 SAS 软件中 Duncan's Multiple Range Test 比较两个 *HSP90* 基因在不同组织、不同发育时期以及药物处理组和对照组的相对表达, 当 $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 引物的特异性

以 *HSP90 α* 和 *HSP90 β* 质粒为模板, 分别用 *HSP90 α* 和 *HSP90 β* 引物对进行扩增(图 1-A 和图 1-B), 表明引物无非特异性退火, 能将两个基因区分开。图 1-C 是来自牙鲆仔鱼和成鱼部分样品 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图谱, 结果显示无引物二聚体和非特异性产物出现。

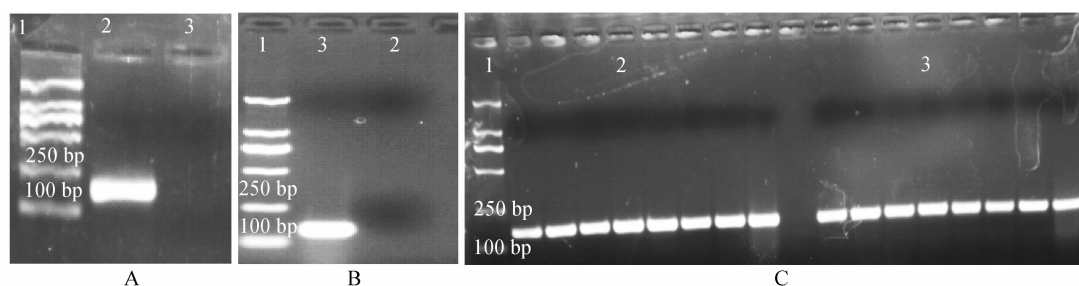


图 1 引物特异性的确认

A) 以 *HSP90 α* 质粒为模板的扩增图谱; B) 以 *HSP90 β* 质粒为模板的扩增图谱; C) 仔鱼和成鱼部分样品 RT-PCR 产物的电泳图谱。

1. Marker; 2. *HSP90 α* 基因; 3. *HSP90 β* 基因。

Fig. 1 Confirmation of the specificity of primers

A) Electrophoresis pattern amplified by *HSP90 α* plasmid templates; B) Electrophoresis pattern amplified by *HSP90 β* plasmid templates;

C) Electrophoresis pattern from RT-PCR product from the part samples of larvae and adult fish. 1. Marker; 2. *HSP90 α* gene; 3. *HSP90 β* gene.

2.2 *HSP90* 基因在成鱼不同组织的表达水平

HSP90 α 和 *HSP90 β* 在成鱼不同组织的表达水平如图 2 所示。*HSP90 α* 和 *HSP90 β* 在检测的 9 种组织中均有表达, 二者在肝脏和心脏中的表达量最低, 在鳃中均有较高的表达; 而在其它组织中

的表达量有明显的不同。其中 *HSP90 α* 在成鱼骨骼肌、肠和胃中有相对较高的表达, 分别达到肝脏的 102、115、104 倍 ($P < 0.05$); 而 *HSP90 β* 在成鱼脑、脾脏和肾脏中有相对较高的表达, 分别是肝脏的 317、220、137 倍 ($P < 0.05$)。

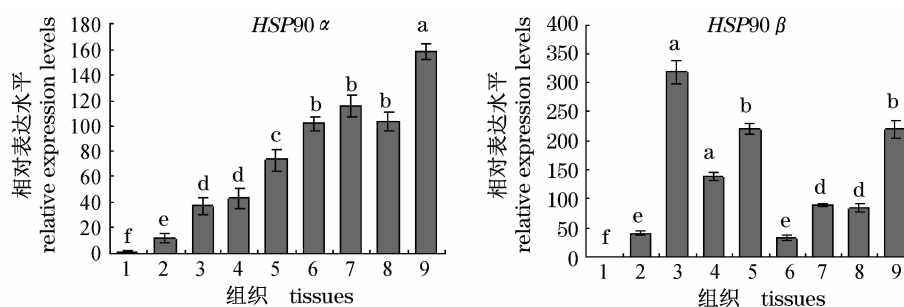


图2 HSP90 基因在成鱼不同组织的相对表达水平

1. 肝脏; 2. 心脏; 3. 脑; 4. 肾脏; 5. 脾脏; 6. 骨骼肌; 7. 肠; 8. 胃; 9. 鳃; a, b, c, d, e, f 字母相同者表示无显著差异, 不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 2 Relative expression levels of HSP90 gene in different tissues of adult fish

1. liver; 2. heart; 3. brain; 4. kidney; 5. spleen; 6. skeletal muscle; 7. intestine; 8. stomach; 9. gills; it has no significant difference when the letter (a, b, c, d, e, f) is the same, and indicates significant difference when the letter is different ($P < 0.05$).

2.3 HSP90 基因表达在仔鱼发育不同阶段的变化

图3显示了HSP90 α 和HSP90 β 基因表达在牙鲈变态前后的发育变化。HSP90 α mRNA水平在变态前的D期仔鱼中较低,在变态的F期仔鱼中其表达量逐渐增加,至变态高峰G期仔鱼中HSP90 α mRNA水平达到最高值,是变态前仔鱼中的2.54倍 ($P < 0.05$),而在变态的H和I期仔鱼中又恢复到较低的表达水平。而HSP90 β mRNA水平在仔鱼变态的F和G期也有所升高,但变化不是特别显著。

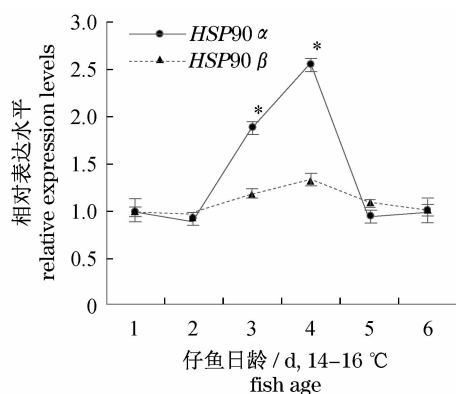


图3 HSP90 基因表达在仔鱼不同阶段的发育变化

1, 2, 3, 4, 5, 6 分别表示孵化后 17, 21, 24, 29, 33, 36 d, 对应于仔鱼发育的 D~I 期 (Minami^[24]), * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Developmental expression changes of HSP90 gene in larvae at different stages

1, 2, 3, 4, 5, 6 indicate 17, 21, 24, 29, 33, 36 d after hatching respectively, corresponding to larval development stages D - I (Minami^[24]), significant difference is indicated by a star (*).

2.4 甲状腺激素对 HSP90 基因转录的影响

通过添加外源的 TH 及其抑制剂 TU 处理牙鲈仔鱼, HSP90 的相对表达水平如图4所示。与未处理的对照组比较,在添加 TH 后 8 和 13 d 的仔鱼中 HSP90 α 转录明显增加,而 TU 处理 8 和 13 d 的仔鱼中其 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$);但是, HSP90 β mRNA 水平不受药物处理影响。结果表明 HSP90 α 的基因转录可能受 TH 的正向调控。

3 讨论

在较高等的真核生物中,尽管两种胞浆型的 HSP90 基因具有较为相近的功能,但 HSP90 α 主要与生长促进、细胞周期调控和应激诱导的细胞自身保护过程密切联系;而 HSP90 β 则主要在早期胚胎发育、精细胞成熟、细胞骨架稳定以及长期细胞适应中发挥作用^[27]。在本研究中,两种 HSP90 基因在所检测的牙鲈成鱼组织中均有转录,但在不同组织中存在表达量上的显著差异 (图2)。HSP90 α 在骨骼肌、肠和胃中比 HSP90 β 具有较高的表达水平,而 HSP90 β 在脑、脾脏和肾脏中具有较高的表达水平。这与塞内加尔鳎中 HSP90 β 在骨骼肌中表达量很低,而 HSP90 α 在骨骼肌和皮肤中表达量却很高^[19] 较为一致。同样在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中, HSP90 β 和两个 HSP90 α (即 HSP90 α 1 和 HSP90 α 2) 在组织分化中也展现出不同的表达模式, HSP90 β 在表皮和中枢神经系统优先表达^[28], 而 HSP90 α 1 和 HSP90 α 2 在发育的体节、骨骼肌和心肌表现出重叠的表达^[28]。HSP90 α 1 似乎在肌球蛋白折叠,促

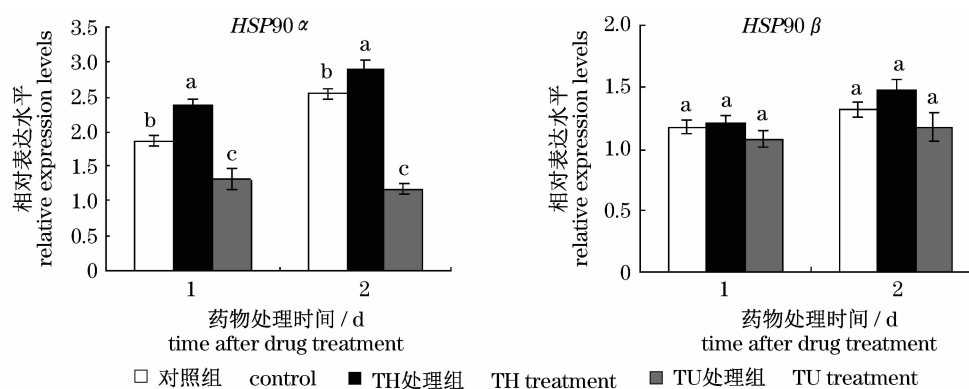


图4 HSP90基因在TH和TU处理仔鱼中的表达变化

1,2 分别表示药物处理后 8 和 13 d, 对应于孵化后 24 和 29 d。a, b, c 字母相同者表示无显著差异, 不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Expression changes of HSP90 gene in larvae after TH and TU treatment

1, 2 are indicated 8 and 13 d after drug treatment, corresponding to 24 and 29 d after hatching; it has no significant difference when the letter (a, b, c, d, e, f) is the same, and indicates significant difference when the letter is different ($P < 0.05$).

进肌原纤维形成中发挥重要作用^[29]。因此, HSP90 α 和 HSP90 β 可能具有不同的组织特异性, 发挥不同的生理功能。除此之外, 不同的细胞类型、细胞条件、不同的刺激及刺激强度, 也可使 HSP90 产生不同的表达。

本研究发现, 两种 HSP90 基因在牙鲆仔鱼不同发育阶段表达不同。HSP90 α mRNA 水平在仔鱼变态期间迅速增加, 至变态高峰期达到最高水平; 而 HSP90 β 的转录在仔鱼变态前后变化不是特别明显。在塞内加尔鳎中, HSP90 β mRNA 在仔鱼变态前后没有大的变化, 与本文结果相同; 而 HSP90 α mRNA 水平在仔鱼变态期间却降低^[19], 差异原因可能与检测的技术方法、仔鱼养殖环境条件不同以及不同种类的鱼有关。在本实验中所采用的各时期仔鱼均处于同样的饵料和环境条件下, 取材和检测方法也一致, 可基本消除外在因素的影响。另外, 在平鲷 (*Sparus sarba*) 中, HSP90 在孵化后 1 d 仔鱼中即能检测到, 在孵化后 21 ~ 35 d 仔鱼中突然上升到较高的水平, 而此期正是仔鱼向稚鱼转变的关键时期^[30], 与本文结果一致。很多文献表明牙鲆仔鱼变态期间肌质中的 TH 水平突然升高^[31-33]; 外源的 TH 能诱发牙鲆仔鱼变态, 而其抑制剂 TU 则使变态停滞^[25]。本文中 HSP90 α 基因表达在变态期间的升高与牙鲆仔鱼体内 TH 水平的变化较为一致。牙鲆仔鱼变态期间 HSP90 α mRNA 水平的升高由内源性的 TH 水平上升所导致, 本研究运用外源的 TH 及

TU 处理牙鲆仔鱼的结果表明, TH 促进了 HSP90 α 的转录, TU 却抑制其基因转录; 而 HSP90 β mRNA 水平不受药物处理的影响; 这与本文上述实验结果相符。因此, 本研究认为是 HSP90 α , 而不是 HSP90 β , 在牙鲆仔鱼变态发育中可能发挥了重要作用, 而且甲状腺激素水平的升高导致了 HSP90 α 基因表达的上升。

HSP90 是鱼类应激反应系统中的关键成分, 在细胞受到如热休克、渗透压、环境污染等各种胁迫时, 其表达迅速上升^[3], 本研究结果则进一步表明 HSP90 基因表达对甲状腺激素的变化也能做出响应。除 TH 外, 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中外源的皮质醇也能促进 HSP90 基因表达^[34]。作为分子伴侣, HSP90 能与多种类固醇激素受体包括糖皮质激素受体 (GR)、雄激素受体 (AR)、雌激素受体 (ER)、盐皮质激素受体 (MR) 和孕激素受体 (PR), 以及维甲酸受体 (RAR)、蜕皮激素受体 (EcR) 相互作用^[13, 35]。但是 Dalman 等^[36]报道甲状腺激素受体 (TR) 并不与 HSP90 形成复合物。因此, 甲状腺激素对 HSP90 α 的促进可能是一种间接的或下游调控机制。如果能进一步应用 HSP90 抑制剂如格尔德霉素 (geldanamycin, GA) 或新生霉素 (novobiocin, NB) 处理牙鲆仔鱼, 有望能够详细阐述 HSP90 基因在牙鲆仔鱼变态中的作用机制。

感谢中国水产科学研究院资源与环境研究中

心刘海金研究员以及北戴河中心实验站的工作人员对牙鲆仔鱼养殖的指导和帮助。

参考文献:

- [1] Iwama G K, Thomas P T, Forsyth R B, *et al.* Heat shock protein expression in fish [J]. *Rev Fish Biol Fish*, 1998, 8(22) :35 - 56.
- [2] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61 :243 - 282.
- [3] Basu N, Todgham A E, Ackerman P A, *et al.* Heat shock protein genes and their functional significance in fish [J]. *Gene*, 2002, 295(2) :173 - 183.
- [4] Robert J. Evolution of heat shock protein and immunity [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27 (6 - 7) :449 - 464.
- [5] Jill L, Elizabeth A C. Protein folding *in vivo*: unraveling complex pathways [J]. *Cell*, 1997, 90 (2) :201 - 204.
- [6] Young J C, Moarefi I, Hartl F U. HSP90: a specialized but essential protein folding tool [J]. *Cell Biol*, 2001, 154(2) :267 - 274.
- [7] Zhao R, Davey M, Hsu Y C, *et al.* Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the HSP90 chaperone [J]. *Cell*, 2005, 120(5) :715 - 727.
- [8] Csermely P, Schnaider T, Soti C, *et al.* The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications [J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 79 (2) :129 - 168.
- [9] Chen B, Piel W H, Gui L, *et al.* The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution [J]. *Genomics*, 2005, 86 (6) :627 - 637.
- [10] Chen B, Zhong D, Monteiro A. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7(1) :156 - 174.
- [11] Caplan A J. Hsp90 ' s secrets unfold: new insights from structural and functional studies [J]. *Trends Cell Biol*, 1999, 9(7) :262 - 268.
- [12] Picard D. Chaperoning steroid hormone action [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17(6) :229 - 235.
- [13] Brown M A, Zhu L, Schmidt C, *et al.* Hsp90— from signal transduction to cell transformation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363 (2) : 241 - 246.
- [14] Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review [J]. *Cell Prolif*, 2000, 33 (6) : 341 - 365.
- [15] Rutherford S L, Lindquist S. Hsp90 as capacitor for morphological evolution [J]. *Nature*, 1998, 396 (6709) :336 - 342.
- [16] Rutherford S, Knapp J R, Csermely P. Hsp90 and developmental networks [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 594 :190 - 197.
- [17] Bishop C D, Brandhorst B P. NO/cGMP signaling and HSP90 activity represses metamorphosis in the sea urchin *Lytechinus pictus* [J]. *Biol Bull*, 2001, 201 :394 - 404.
- [18] Arbeitman M N, Hogness D S. Molecular chaperones activate the *Drosophila ecdysone* receptor, an RXR heterodimer [J]. *Cell*, 2000, 101(1) :67 - 77.
- [19] Manchado M, Salas-Leiton E, Infante C, *et al.* Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) [J]. *Gene*, 2008, 416(1) :77 - 84.
- [20] 张俊玲,施志仪. 牙鲆早期阶段的变态发育及其机制 [J]. *上海水产大学学报*, 2003, 12 (4) : 348 - 352.
- [21] Inui Y, Yamano K, Miwa S. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder [J]. *Aquaculture*, 1995, 135(3) :87 - 98.
- [22] 陈晓武,施志仪. 牙鲆发育中 ALP 基因表达图式及功能分析 [J]. *中国海洋大学学报*, 2007, 40 (6) : 945 - 952.
- [23] 曾宣,施志仪,陈晓武,等. 牙鲆变态期间骨骼发育及其相关基因 *Sox9*, *Bmp4* 和 *Bmp2* 的克隆与表达分析 [J]. *海洋渔业*, 2009, 31(4) :337 - 346.
- [24] Minami T. The early life history of a flounder *Paralichthys olivaceus* (in Japanese) [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1982, 48(11) :1581 - 1588.
- [25] Inui Y, Miwa S. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1985, 60(3) :450 - 454.
- [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4) : 402 - 408.
- [27] Sreedhar A S, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2004, 101 (3) :

- 227 - 257.
- [28] Krone P H, Sass J B. HSP 90 alpha and HSP 90 beta genes are present in the zebrafish and are differentially regulated in developing embryos [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 204 (2): 746 - 752.
- [29] Du S J, Li H, Bian Y, *et al.* Heat-shock protein 90 {alpha} 1 is required for organized myofibril assembly in skeletal muscles of zebrafish embryos [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105(2): 554 - 559.
- [30] Deane E E, Woo N Y. Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, hsp70 and hsp90 during silver sea bream larval development [J]. *Life Sci*, 2003, 72 (7): 805 - 818.
- [31] Tagawa M, Miwa S, Inui Y, *et al.* Changes in thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis of the flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Zool Sci*, 1990, 7 (1): 93 - 96.
- [32] Miwa S, Tagawa M, Inui Y, *et al.* Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1988, 70(1): 158 - 163.
- [33] De Jesus E G, Hirano T, Inui Y. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in Japanese flounder [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1991, 82(3): 369 - 376.
- [34] Vijayan M M, Raptis S, Sathiyaa R. Cortisol treatment affects glucocorticoid receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 132 (2): 256 - 263.
- [35] Baker M E. Evolution of metamorphosis: role of environment on expression of mutant nuclear receptors and other signal-transduction proteins [J]. *Integr Comp Biol*, 2006, 46(6): 808 - 814.
- [36] Dalman F C, Koenig R J, Perdew G H, *et al.* In contrast to the glucocorticoid receptor, the thyroid hormone receptor is translated in the DNA binding state and is not associated with hsp90 [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(7): 3615 - 3618.

欢迎订阅 2011 年《水产学报》

《水产学报》是由中国科协主管、中国水产学会主办、上海海洋大学承办、科学出版社出版的以反映我国水产科学技术成果为主的学术类核心期刊(中国科学引文数据库 CSCD 核心库和中信所核心库), 1964 年创刊, 是中国水产界历史最为悠久的刊物之一。2002 - 2009 年连续荣获“百种中国杰出科技期刊”称号, 2006 - 2008 年获得中国科协“精品期刊工程项目(C 类)”资助, 2009 - 2010 年获得中国科协“精品科技期刊示范项目(B 类)”资助。

本刊主要刊载水产基础研究、水产养殖和增殖、水产品病害防治、渔业水域环境保护、渔业资源与管理、水产品保鲜加工与综合利用等方面的研究论文、研究简报和综述。

本刊为月刊, 每期 160 页, 国内每期订价 49.00 元, 全年订价 588.00 元(含邮费)。国内统一刊号: CN 31 - 1283/S, 国际标准刊号: ISSN 1000 - 0615, 国内邮发代号: 4 - 297, 国外发行代号: Q - 387。读者可在当地邮局办理订阅, 破季、漏订或补订均可直接与编辑部联系。个人订户可享受 6 折优惠。

编辑部地址: 上海市临港新城沪城环路 999 号 201 信箱

邮政编码: 201306

联系人: 张美琼

联系电话与传真: 021 - 61900227

E-mail: mqzhang@shou.edu.cn; jfc@shou.edu.cn

Website: www.scxuebao.cn

Differential expression of *HSP90* genes and its relation with thyroid hormone during metamorphosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

ZHANG Jun-ling, SHI Zhi-yi*, CHENG Qi, JIA Liang

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystems, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract: HSP90 proteins are major chaperones that play pivotal roles in controlling multiple regulatory pathways such as hormone signaling, cell differentiation, cell proliferation and apoptosis, morphogenesis and morphological evolution, metamorphosis and stress defense. Using real-time fluorescent quantitative RT-PCR approach, expression profiles of *HSP90* genes were examined during larval development and in adult tissues in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. In adult tissues, *HSP90 α* was mainly expressed with higher transcript levels in skeletal muscle, intestine and stomach; but *HSP90 β* exhibited higher mRNA levels in brain, spleen and kidney. During metamorphosis, *HSP90 α* transcript increased distinctly with the highest mRNA levels at the metamorphosis climax; whereas *HSP90 β* mRNA levels did not change. Due to the important role of thyroid hormone (TH) for the flounder metamorphosis, the transcriptional regulation of *HSP90* genes by TH was evaluated using exogenous TH and thiourea (TU) treatment. Compared with untreated control, *HSP90 α* transcript increased significantly in larvae sampled 8 and 13 days after TH treatment, and TU-treated larvae exhibited lower *HSP90 α* mRNA levels. In contrast, the transcript levels of *HSP90 β* did not vary after TH and TU treatment. Overall, these results demonstrate that *HSP90 α* transcription is up-regulated by thyroid hormone and plays an important role during metamorphosis in Japanese flounder.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; metamorphosis; HSP90; gene expression; thyroid hormone; thiourea; fluorescent quantitative RT-PCR

Corresponding author: SHI Zhi-yi. E-mail: zyshi@shou.edu.cn