

综述

## 鱼类物种特征尺寸控制因素研究进展

孔祥会<sup>1,2</sup> 何舜平<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007)

### PROGRESS ON SPECIES CHARACTERISTICS SIZE CONTROL IN FISH

KONG Xiang-Hui<sup>1,2</sup> and HE Shun-Ping<sup>1</sup>

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;  
2. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007)

关键词: 物种特征尺寸; 控制因素; 细胞数目; 细胞大小; 鱼类

**Key words:** Species characteristic size; control factors; Cell number; Cell size; Fish

中图分类号: Q95 文献标识码: A 文章编号: 1003-207(2006)05-0614-07

早在 1927 年的时候, Haldane 就指出: 动物不同物种之间最明显的差异就是尺寸差异, 不知何故一直没有引起动物学家们的研究兴趣<sup>[1]</sup>。如果 Haldane 在当时提出这一问题有点超前的话, 那么现在重新提出这一问题就显得很适时宜。随着分子生物学技术、功能基因组学和蛋白质组学技术的发展和认识的深入, 人们已经能够对基因进行突变、重组、敲除和表达调控的研究, 以此来研究和弄清动物个体尺寸控制, 该研究对于揭示物种特征尺寸控制具有极其重要的意义。

特征尺寸是动物体在正常生理条件下最终达到的尺寸, 一般指物种特征尺寸。个体尺寸是指单个动物体生长停止时的最终尺寸, 主要是指在个体发育水平上的研究。搞清楚个体发育及其尺寸控制是研究物种特征尺寸控制的前提和基础。在模式动物中虽然对细胞、器官和个体尺寸控制进行了大量的研究<sup>[2]</sup>, 对动物体的个体尺寸控制有了初步的认识, 但不同物种特征尺寸控制仍然是一个谜<sup>[3]</sup>。因而, “大象为什么比老鼠大得多?”这个一直困扰着发育生物学家和动物学家的问题, 至今仍然不得其解。如果对于分布在较高分类阶元物种之间尺寸差异难以着手探索的话, 那么对于较低分类阶元物种之间尺寸差异是否可以试以研究? 在较低分类阶元探讨不同物种间特征尺寸差异时, 选择适宜的物种类型尤为重要。基于此, 鱼类是研究不同物种特征尺寸差异形成的绝好材料。

鱼类种类繁多, 在世界上分布很广。就鲤科鱼类而言,

包括 210 属, 2010 种<sup>[4]</sup>, 亚洲大约有 1200 种, 其中中国鲤科鱼类有 132 属 532 种; 而且中国特有物种 384 种, 约占总数的 74%<sup>[5]</sup>。中国许多重要的淡水经济鱼类, 如青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫(*Carassius auratus*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)等均属于鲤科鱼类。并且早已作为脊椎动物发育研究的模式生物斑马鱼(*Danio rerio*)也属于鲤科鱼类<sup>[6]</sup>。所以鲤科鱼类具有丰富的物种多样性和分布的广泛性。就鱼的特征尺寸而言, 鲤科鱼类中也是大小悬殊, 多种多样。鲤科中 Danioninae 鱼类一般个体较小, 如唐鱼(*Tanichthys albonubes*), 最大尺寸 2 cm; 雅罗鱼亚科鱼类一般较大, 如青鱼、草鱼、鳡(*Elopichthys bambusa*)等, 最大尺寸均在 1 m 以上。即使在同一雅罗鱼亚科中草鱼和赤眼鳟(*Squaliobarbus curriculus*)个体特征尺寸也存在较大的差异。所以鲤科鱼类是研究不同鱼类特征尺寸控制和形成格局的理想材料, 对于鱼类进化和系统发育研究也具有重要意义。鱼类特征尺寸差异如此之大是如何形成的呢? 这就要从动物个体遗传发育和物种进化中寻找答案。

#### 1 动物体特征尺寸的控制因素

多细胞后生动物一般是从受精卵开始发育, 形成胚胎, 分化出各种器官芽基, 然后进一步分化和发育成一个大的雏形, 通过细胞生长和细胞分裂逐渐增大, 形成幼体, 继而生长

收稿日期: 2005-09-30; 修订日期: 2006-04-09

基金项目: 国家 973 项目(2004CB117402); 中国博士后科学基金(2005037684)

作者简介: 孔祥会(1968—), 男, 汉, 河南虞城人, 教授, 博士, 从事水生动物环境效应与分子进化研究

通讯作者: 何舜平, E-mail: clad@ihb.ac.cn

至成体。大部分鱼类和其他动物,在发育过程中的某一点停止生长,形成物种特征尺寸差异明显的格局。一般而言,动物个体尺寸的形成受外部因子(extrinsic factors)和内部因子(intrinsic factors)共同调控的结果。

### 1.1 温度

温度对动物特征尺寸的影响主要是指对变温动物而言<sup>[7]</sup>。在低等无脊椎动物中,如果蝇(*Drosophila melanogaster*),当其幼虫饲养在高温时,成虫通常较小<sup>[8]</sup>。在不同温度下饲养数年后,其身体尺寸产生一个可遗传的变异,但变异品系饲养在高温下时仍比低温下明显变小。有关温度对鱼类的影响大多集中于温度对鱼类繁殖<sup>[9]</sup>和幼体生长<sup>[10]</sup>的影响。一般而言,鱼类在其适宜生长的温度范围内,随温度的升高而生长加快,温度主要是通过影响鱼的摄食率和代谢率从而对鱼类生长产生影响<sup>[11, 12]</sup>。温度对鱼类特征尺寸的影响还未见报道。

### 1.2 营养

营养水平对动物体尺寸的影响一般是营养丰富时生长快,个体大;营养贫乏时生长慢,个体小。因为动物体生长需要大分子物质不断合成,其合成需要营养成分的不断供应,所以营养不足是动物体生长的一个限制因子,但其分子机理并不清楚。细胞培养中发现氨基酸缺乏可导致蛋白质的合成受阻<sup>[13]</sup>。在许多哺乳动物细胞中,氨基酸缺乏可直接导致蛋白质翻译的抑制子4EBP1 和其启动子 eIF4E 结合,从而抑制蛋白质的合成,另一方面抑制核糖体蛋白 S6 激酶(ribosomal protein S6 kinase, S6K)活性<sup>[13]</sup>。在这些调控中,其中 TOR(target of rapamycin) 信号通路是一种重要的调节途径<sup>[14, 15]</sup>。

在营养调控中,TOR 信号通路把营养调控和细胞生长很好地联系起来,TOR 信号通路在酵母<sup>[15]</sup>和哺乳动物细胞<sup>[16]</sup>中都分别得以证实。TOR 存在两种不同功能的复合物(TOR1 和 TOR2),TOR1 介导雷帕霉素(Rapamycin)敏感通路,而 TOR2 介导雷帕霉素不敏感通路。果蝇最近研究表明,存在通路上的 TSC(tuberous sclerosis complex) 抑制因子,包括 TSC1 和 TSC2,和 Rheb(the small GTPase Ras homologue enriched in brain)为 TOR 通路上游调控元件<sup>[17, 18]</sup>。同时也表明 TSC1/TSC2 可以抑制 Rheb 活性,Rheb 可以激活 TOR,TOR 通过活化 S6K 促进蛋白质的合成。所以营养与细胞内因子 TSC, Rheb, TOR, S6K 协同调控细胞生长。

### 1.3 激素

鱼类的生长激素(growth hormone, GH)对其生长具有重要的调控作用。和其他脊椎动物一样,鱼类生长激素(GH)也是在下丘脑控制下由垂体分泌的<sup>[19]</sup>。鱼类生长激素通过与跨膜受体 GHR(GH receptor)结合,从而对细胞生长,代谢,渗透压调节和免疫等进行调控,同时与鱼的摄食和攻击也有一定关系<sup>[20]</sup>。鱼类 GH 的促生长作用一般是通过诱导肝脏和其他组织产生胰岛素类似物生长因子(insulin-like growth factor, IGF)来实现的。

鱼类胰岛素类似物生长因子是一类在结构上类似于胰

岛素原,并与胰岛素有近 50% 的氨基酸同源性,可促进细胞生长和代谢的蛋白质,对动物生长发育调控具有重要作用。主要有 IGF1 和 IGF2 两种,一般认为 IGF1(Insulin growth factor 1)主要是在出生后及成年期介导生长激素(GH)的促生长效应;IGF2 是重要的胚胎生长和发育的调节因子,几乎不受 GH 调节<sup>[21]</sup>。所以 GH 对鱼类生长的调控是通过诱导肝脏和其他组织产生 IGF1,从而激活 insulin/PI(3)K 信号通路,促进鱼类的生长<sup>[22]</sup>。目前在鲑鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)、虹鳟(*Salmo gairdneri*)、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、鲶鱼(*Clarias macrocephalus*)、鲷(*Acathopagrus schlegelii*)、鲮鱼(*Cirrhinus molitorella*)、鲨鱼(*Squalus acanthias*)、鲈鱼(*Lates calcarifer*)、大杜父鱼(*Cottus scorpius*)、鲤、草鱼、金鱼、团头鲂、斑马鱼等十几种鱼类中已克隆出 IGF1 基因。序列分析发现,同一科鱼类之间,胰岛素样生长因子基因序列具有高度的同源性<sup>[23]</sup>,但其对鱼类尺寸控制的研究还未见到报道。

### 1.4 遗传

鲤科鱼类中草鱼与唐鱼特征尺寸的惊人差异,生活在同一水体的草鱼和赤眼鳟大小悬殊,这些现象很难从环境和营养调控方面给出满意的回答。物种特征尺寸的最终决定不是外界因子,而是内部遗传因子。

#### DNA 含量

低等物种特征尺寸与细胞 DNA 含量密切关系。Gregory (2000) 研究扁形动物涡虫,甲壳动物桡足类时发现, DNA 含量与物种特征尺寸之间存在一定的正相关,DNA 含量高,细胞尺寸大,动物特征尺寸较大<sup>[24]</sup>。就细胞而言,在脊椎动物中也有类似现象,如不同脊椎动物中红细胞的细胞尺寸与 DNA 含量密切相关,即 N/C(nuclear volume: cytoplasm volume) 相对恒定<sup>[25]</sup>。动物染色体倍性高时,细胞尺寸也大<sup>[26]</sup>,如四倍体蝶螈细胞尺寸是二倍体的 2 倍。然而两个物种对应器官尺寸及个体特征尺寸却相同,原因是四倍体蝶螈细胞数量减少,大致是二倍体蝶螈的 1/2。此外,在果蝇发育中,如果细胞分裂循环被加速或阻止,则对应细胞就会变小或增大,但最后仍能发育成正常大小。显然染色体倍性不能决定器官和动物特征尺寸<sup>[2]</sup>。对鱼类而言,不同鱼类染色体核型及 DNA 含量表现出更大的多态性,多倍化现象在鱼类中普遍存在,但鱼类生长,特征尺寸与染色体倍性和 DNA 含量并无相关性<sup>[27]</sup>。

高等脊椎动物中 DNA 含量与个体特征尺寸也无相关性,如人类的基因组 DNA 为  $10^9$  bp,而两栖类却为  $10^{9\sim 11}$  bp,同时 DNA 含量(即 C 值)与动物进化程度之间并无相关性,即所谓的 C value 矛盾,而且还有些人武断地称这些基因为“无用基因(junk gene)”,<sup>[28]</sup>所以说动物特征尺寸并不是由 DNA 含量和染色体倍性决定的。

#### 基因调控

动物特征尺寸的形成是环境因子和遗传因子共同作用的结果,环境因子(如营养)对动物特征尺寸的形成虽然具有重要作用,但不是物种之间特征尺寸差异形成的主要原因,真正的原因应是调控生长发育的各遗传因子<sup>[2]</sup>。在基因水

平上, 基因表达何时启动? 何时关闭? 表达量如何控制? 细胞水平上, 细胞生长多大尺寸时进行细胞分裂? 细胞分裂多少次后进行停止? 细胞数目如何保持恒定? 组织水平上, 器官达至多大尺寸时停止生长? 停止生长的检验点如何操纵? 个体水平上, 各器官间生长如何协同达到合适尺寸? 在个体生长达到特征尺寸时如何停止? 这一系列的问题都必须从基因调控上进行解决。

尽管动物特征尺寸控制至今仍然是一个谜, 但可喜的是在模式生物线虫 (*Caenorhabditis elegans*), 果蝇和小鼠中, 许多学者已从个体发育和肿瘤形成方面对细胞、器官和个体尺寸控制进行了大量的研究工作<sup>[2, 3, 29]</sup>。从个体发育方面通过基因突变和敲除, 确定了多个基因对动物体的生长发育具有调控作用。研究最多的是 Insulin/PI(3) K 通路上的调节元件, 如 insulin/IGF1, InR (insulin receptors), IRS (Insulin receptor substrate proteins), PTEN (phosphatase and tensin homologue), PI(3) K (Phosphatidylinositol-3-OH kinase), PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1, PDK1), AKT/PKB (protein kinase B), S6K 等<sup>[30, 31]</sup>。TOR 信号通路中 TSC, Rheb, TOR, S6K 等对细胞尺寸和个体尺寸也有重要的调节作用<sup>[14]</sup>。

mitogen/cyclin D 信号通路中 mitogen, ras, myc, cyclin D, CDK 4/6, Rb, E2F 和 cyclin E 对于细胞数目调控具有重要作用。Trump *et al* 发现 *e-myc* 基因在哺乳动物尺寸控制中是通过控制细胞数量实现的, 而不是细胞尺寸<sup>[32]</sup>。另外细胞凋亡信号通路对于维持细胞数目的恒定也具有重要的作用。任何涉及动物特征尺寸控制的实质性探索都必须从发育、遗传和进化上对基因调控进行研究。

## 2 动物特征尺寸与细胞尺寸及数量

发育生物学家、进化生物学家和动物学家研究线虫、果蝇、小鼠等模式动物时发现相同物种或不同物种动物特征尺寸差异主要决定于细胞尺寸和细胞数目的不同<sup>[2]</sup>。细胞尺寸主要取决于细胞的生长, 而细胞数目主要决定于细胞分裂和细胞凋亡。细胞的任何活动均是依赖于细胞内外各种因子的调控。这些调控信号分子可以是溶解的或结合的, 可以是细胞内或细胞外的, 也可以是以内分泌、旁分泌或自分泌模式进行作用的。关键的问题是细胞内程序和细胞外信号是如何协同调节细胞生长和分裂, 以使动物生长到特征尺寸。

### 2.1 细胞生长

细胞生长就是通过细胞内生物大分子的合成, 使细胞质量增加, 细胞体积增大, 其中蛋白质合成是动物生长发育的核心。蛋白质的合成在核糖体中进行。核糖体是由核糖体蛋白和核糖体 RNA 组成, 所以调控核糖体蛋白和 RNA 的元件都能对蛋白质合成和细胞生长有调控作用。如果编码核糖体蛋白基因突变和编码核糖体 RNA 基因突变均可影响细胞生长, 使个体尺寸变小<sup>[33]</sup>。此外调控蛋白质合成的基因 *eIF4* 的突变也会导致同样的结果<sup>[34]</sup>, 因此, 蛋白质翻译体系中各调控因子对细胞生长具有重要调控作用。

Broglio *et al* (2001) 基于氨基酸序列的保守区, 发现果蝇

胰岛素类似物多肽基因 *dILP* (*Drosophila insulin-like peptide*)<sup>[35]</sup>。Oldham *et al* (2002) 发现其受体对生长和尺寸的调控是通过调控 PI(3) K 的水平实现的<sup>[36]</sup>。果蝇中胰岛素受体 (insulin/IGF receptor, INR) 与一种底物 IRS(CHICO) 结合, 从而激活 PI(3) K (dp110/p60), 然后间接激活下游的 dAKT1 和 dS6K, 这两种信号通路均可被脂磷酸酶 dPTEN (*Drosophila phosphatase and tensin homolog*) 抑制。在果蝇中, 通过基因敲除, 突变或缺失也证明 insulin/IGF 信号通路对生长调控具有重要作用<sup>[37, 38]</sup>。Montagne *et al* (1999) 最近报道果蝇 dS6K (*Drosophila S6 kinase*) 基因表达产物 dS6K 作为一个信号分子, 当其发生突变时, 阻止细胞生长, 细胞尺寸变小, 从而致使突变果蝇发育迟缓, 身体尺寸变小(体重大约缩小 60%, 细胞尺寸缩小 30%, 与纯合子雌性果蝇相比), 并且身体各部分受到相同的影响, 缩小比例一致<sup>[39]</sup>。

最近几年通过研究 insulin/PI(3) K 信号通路<sup>[40]</sup>, 对于该信号通路调控细胞生长的认识也越来越清晰。胰岛素及胰岛素类似物生长因子 1 是调控细胞生长的一个重要因子。与位于细胞膜的受体 (insulin receptors, InR) 结合并激活受体上的酪氨酸激酶活性, 一旦激活, 即可磷酸化受体底物蛋白 IRS, 然后激活 PI(3) K, PI(3) K 使PIP<sub>2</sub> 磷酸化生成PIP<sub>3</sub>, PIP<sub>3</sub> 继续磷酸化下游丝氨酸/苏氨酸激酶 PDK1, PDK1 再激活蛋白激酶 p70S6K 和 AKT/PKB, PKB 活化后可以与多种下游靶蛋白结合, 进行下游调节。而另一分支 p70S6K 活化后进而磷酸化核糖体蛋白 S6, S6 活化后可增加含有 5'-TOP (terminal oligopyrimidine tracts) mRNA 的翻译, 因为这些含有 5'-TOPs 的 mRNA 主要是编码核糖体蛋白的 mRNA, 其他蛋白的 mRNA 一般不含有 5'-TOP, 这样以来使核糖体蛋白生成增多, 从而使核糖体增多, 增大蛋白质合成的能力。对小鼠 IGF1, IGF-IR, PI(3) K 和 AKT 进行基因突变和敲除研究, 说明这些基因在 IGF 通路中是必需的<sup>[41]</sup>。脂磷酸酶 PTEN 在该通路中使 PI(3, 4, 5) P<sub>3</sub> (phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate) 去磷酸化生成 PI(4, 5) P<sub>2</sub> (phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate), 从而抑制通路上的级联反应, 使细胞生长受阻, 个体尺寸变小。

### 2.2 细胞数目

脊椎动物特征尺寸主要是细胞数目多少来决定<sup>[2]</sup>。而细胞数目是由细胞分裂和细胞凋亡来决定。二者共同作用维持细胞恒定的数目和动物体特征尺寸。细胞分裂使细胞数目增加, 分裂素 (mitogens) 启动细胞循环过程, 至少部分是通过促进 *e-myc* 和 cyclin D 来实现<sup>[2]</sup>。cyclin D 和 CDK 4/6 磷酸化, 抑制 Rb, 释放 E2F 来促进 cyclin E 基因转录 (促进细胞从 G1 进入 S 期)。

Trump *et al* (2001) 报道 *e-myc* 基因在哺乳动物尺寸控制中是通过控制细胞数量而不是控制细胞尺寸<sup>[32]</sup>。其研究主要是通过对 *e-myc* 基因的改造培养出 5 种携带不同 *e-myc* 基因纯合或杂合鼠, 通过研究个体尺寸、细胞数量、细胞尺寸和 *e-myc* 基因的关系而发现: *e-myc* 基因调控动物个体大小主要是通过调控细胞数量, 而不是调控细胞尺寸, 从而说明脊椎动物是通过控制细胞数量来调控个体尺寸的。然而还不清

楚 *e myc* 是如何启动细胞循环过程, 来控制细胞数量, 因为另有一些信号分子, 如 PDGF 也能活化这个信号通路。

动物细胞需要细胞外信号(如生长因子)调控细胞内物质合成; 如细胞分裂素蛋白调控细胞数目增多, 同时也需要细胞存活因子(survival factors)来延长细胞寿命。如果没有足够的存活因子, 它们就要启动细胞内的凋亡(apoptosis)程序, 即程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)。除受精卵分裂球不需要额外的信号来存活或分裂, 其他细胞, 均依赖于存活因子确保特定时间和地点的存活, 存活因子的作用是通过调节细胞内控制凋亡的蛋白数量和活性来实现的, 尤其是Bcl2家族和IAPs(inhibitors of apoptosis)蛋白<sup>[42]</sup>, 如Bad(脊椎动物细胞)和Hid(果蝇细胞)去磷酸化。Bad通过抑制Bcl2(凋亡抑制因子)启动PCD; Hid通过抑制IAPs(凋亡抑制因子)启动PCD。凋亡自身主要依赖于细胞内级联的蛋白水解, 以丝氨酸蛋白酶caspase家族介导<sup>[43]</sup>。

而细胞数目主要取决于细胞的分裂和细胞凋亡。细胞分裂与细胞生长密不可分, 所以细胞生长, 细胞分裂和细胞凋亡是决定细胞、器官和动物体特征尺寸的关键, 体内调控细胞生命活动的信号通路构成了复杂的调控网络。确定物种特征尺寸的关键调控基因和弄清这些基因的表达调控及在不同物种间的进化差异, 对于研究物种特征尺寸的控制和形成具有重要的意义。

### 3 尺寸控制基因在鱼类中的研究

动物尺寸调控基因可以分为两大类, 一类是基因表达产物可加速细胞生长, 促进细胞分裂, 如 *e myc*, *ras*, *S6K* 基因等, 其基因突变, 变为无效基因时可使细胞数目变少, 动物尺寸变小; 另一类是基因表达产物可抑制细胞生长, 阻止细胞分裂的基因, 如 *PTEN*, *Lats* 等, 其基因突变成为无效基因时, 可使细胞生长加速, 动物尺寸变大。这些基因在鱼类中也有一些研究。

#### 3.1 *e myc* 基因

*e myc* 是控制细胞增生的一个重要基因<sup>[44]</sup>, 对于细胞的分裂和分化具有重要的调控作用, *e myc* 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 第 1 个外显子不编码, 只对 *e myc* 基因的转录起调控作用。Van beneden *et al.* (1986) 从虹鳟(*Salmo gairdneri*)中分离出的 *e myc* 基因与哺乳动物和鸟类相比较, 发现该基因编码区高度保守<sup>[45]</sup>。斑马鱼中发现 *e myc* 表达总是与 *max*(a basic helix-loop-helix/leucine zipper, bHLH/LZ)同步, 并指出只有与 *max* 结合成为异源二聚体 *myc/max* 复合物时, 才能对基因表达起调控作用<sup>[46]</sup>。四倍体普通鲤鱼中, 分离到两个 *e myc* 基因(*CAM1* 和 *CAM2*)<sup>[47]</sup>, 并且发现 *CAM1* 比 *CAM2* 进化快, 后来确定了两种不同来源的 *e myc* 基因转录起始点。鲤鱼 *e myc* 基因第 1 个外显子比第 2 和第 3 个快, 但两种 *e myc* 基因比较, 第 1 外显子和启动子结构上的差异说明 *CAM1* (AB103397, DNA, 2945bp, *e myc1*, 5'上游区和 5'UTR) 和 *CAM2* (AB103398, DNA, 2765 bp, *e myc2*, 5'上游区和 5'UTR) 在基因加倍后进化获得不同的功能。Futami, *et al*

(2001) 在四倍体鲤鱼中分离出 *max* 基因, 发现 *max* 表达与 *CAM2* 同步, 并不与 *CAM1* 同步<sup>[48]</sup>。这一结果说明 *CAM1* 可能通过进化而获得其他新的功能。鱼类 *e myc* 基因在 NCBI 数据库 Genbank 中注册还有斑马鱼(XM\_683744, mRNA, 1224bp), 金鱼(D31729, DNA, 3840bp), 虹鳟(M13048, 1614bp, DNA, exons 2 and 3)等, 但 *e myc* 基因对鱼类特征尺寸调控的机理目前还不清楚。

#### 3.2 *ras* 基因

*ras* 基因在动物个体发育中也是一个重要的调节因子, 它可直接调控细胞的生长。人类中有 3 个 *ras* 基因(H-ras, K-ras 和 N-ras)负责编码 4 个含有 188—189 氨基酸的 p21 蛋白(H-ras, N-ras, K-rasA 和 K-rasB), 它们主要负责调控 GDP/GTP 转换。它具有 5 个外显子, 具有 1 个可变剪接外显子 4a/4b<sup>[49]</sup>。*ras* 蛋白定位于质膜内表面, 充当细胞外分子进入细胞内的转换, 当其与 GTP 结合时被激活, GTP 水解后, 与 GDP 结合时失活。这种 GTP/GDP 的转换可以调控细胞的生长, 分化和凋亡<sup>[50]</sup>。Nemoto *et al.* (1986) 首先从金鱼中获得 *ras* 相关序列, 发现与哺乳动物 *ras* 基因, 尤其是人的 K-ras 基因非常相似<sup>[51]</sup>。在研究癌组织 *ras* 基因时发现癌变的发生是由于发生在第 1 和第 2 外显子上的点突变, 或其蛋白第 12, 13 和 61 位密码子发生突变, 从而导致 *ras* 基因激活, *ras*-GTPase 活性失控, 致使 *ras* 信号连续活化, 从而导致细胞增生。Liu *et al.* (2003) 发现青鳉(*Oryzias latipes*)暴露于 DEN(Diethylnitrosamine)中时, *ras* 极易发生点突变, 导致肿瘤发生, 点突变 12 密码子由 Gly 突变为 Asp, 并且发现有时还会导致第 16 位密码子突变<sup>[52]</sup>。

鱼类的 *ras* 基因一般由四个外显子组成, 分别对应着 *ras* 蛋白的重要功能位点。*ras* 过度表达可产生与 *e myc* 相同的特征<sup>[53]</sup>。虹鳟至少存在两个不同的 *ras* 基因(*ras1* and *ras2*)<sup>[54]</sup>。外显子与哺乳动物有 76.8%—87.1% 的同源性, 比 *e myc* 基因高(*e myc* 外显子 2 和 3 与哺乳动物同源性为 52.9%)。在斑马鱼中 *ras* 基因与哺乳动物 N-ras 基因密切相关<sup>[55]</sup>。Vincent-Hubert(2000) 在比目鱼 *Platichthys flesus* 中也已克隆出与人类 Ki-rasB 高度同源的 *ras1* and *ras2* 基因<sup>[56]</sup>。鱼类在 NCBI 注册的 *ras* 基因有 *D. rerio* (NM\_131145, mRNA, 2638 bp, N-ras; XM\_691782, mRNA, 459 bp, K-ras); *C. auratus* (AH002484, DNA, ras); *C. carpio* (U53782, mRNA, 1705 bp, K-ras); *O. latipes* (AF030545, mRNA, 567bp e-Ki-ras1; AF032713, mRNA, 692bp, e-Ki-ras2); *P. flesus* (Y17188, mRNA, 1665bp, Ki-ras, exons 1 to 4); *Mullus barbatus* (X82182, mRNA, 236 bp ras); *Oncorhynchus mykiss* (M73690, M73692, M73694, mRNA, ras-1; M73691, M73693, M73695, mRNA, ras-2)。

#### 3.3 *S6K* 基因

*S6K* 是激活 40S 核糖体蛋白的一种激酶, 在哺乳动物中 p70 S6K(又称 S6K1, 与 S6K2 非常相似)是调控细胞生长的一个重要元件<sup>[57]</sup>。果蝇中 dS6K 对细胞生长的调控也已证明, 在果蝇中 dS6K 的突变导致个体尺寸变小, 但主要是细胞尺寸变小, 而不是细胞数目<sup>[39]</sup>, 它不同于 S6 基因的突变, S6 的

突变仅使生长发育延迟。鱼类 *S6K* 基因序列在国际 NCBI 数据库 Genbank 中注册的仅有 *D. rerio* XM\_680440, mRNA 部分序列, 983bp。相似于 *S6K-alpha 2*)。关于对鱼类尺寸调控的研究还未见报道。

### 3.4 PTEN 基因

*PTEN*(phosphatase and tensin homologue) 是一种脂类磷酸酶, *PTEN* 作用可以使  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  脱磷酸生成  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ , 从而抑制动物的生长发育, 并且在肿瘤发生中, 可以抑制肿瘤细胞中多种激酶传导通路, 从而抑制肿瘤生长, 反过来, *PTEN* 突变也可导致多种肿瘤细胞的发生<sup>[58]</sup>。小鼠特定组织 *PTEN* 敲除后, 细胞尺寸增大<sup>[59]</sup>。Oldham, et al(2002) 在果蝇中也发现 *PTEV* 突变时, 细胞尺寸增大, 成体果蝇比正常大 50%<sup>[36]</sup>。斑马鱼 *PTEV* 基因 cDNA 序列在国际 NCBI 数据库 Genbank 中已有注册(NM\_001001822, mRNA, 3380bp), 另外注册的还有 *Fundulus heteroclitus* (CV822280), 但关于 *pten* 基因对鱼类特征尺寸调控的研究还未见报道。

### 3.5 *Lats* 基因

*Lats*(large tumour suppressors) 基因是一个肿瘤抑制基因, 它主要调控细胞增生, 控制 *CDC2* 和 *cyclin A* 的表达。肿瘤细胞中一般 *CDC2* 和 *cyclin A* 表达增多<sup>[60]</sup>。*Lats1* 缺陷的小鼠经常发生肉瘤, 卵巢瘤和垂体增生, 并可使个体尺寸增大<sup>[61]</sup>。*Lats* 基因对于动物生长调控具有重要作用。果蝇中 *Lats* 基因突变时生长失控, 导致个体尺寸增大<sup>[62]</sup>。斑马鱼 *Lats* 基因的 cDNA 已由中科院水生所克隆出来, 其完整 mRNA 序列在 NCBI 国际数据库 Genbank 中注册(NM\_001020510, 1, mRNA, 3207bp)。但对于鱼类尺寸控制的相关论文还未见报道。

## 4 研究展望

物种特征尺寸控制是内外多种因子作用和调控的结果, 在调控过程中有多个信号通路参与, 在多个水平上对细胞、器官和个体尺寸进行调控。关于尺寸控制的研究, 直至目前, 虽然从个体发育水平上, 通过调控生长基因的突变或敲除, 对于个体尺寸控制有了初步的认识, 但对于不同物种之间动物特征尺寸的形成还不得其解。基于此, 也引起了越来越多的发育学家、遗传学家和进化学家的研究兴趣, 对动物尺寸控制之谜进行不懈的探索。就种类繁多, 个体特征尺寸差异悬殊的鱼类而言, 是研究尺寸控制形成和进化的绝好材料。

关于鱼类特征尺寸控制的主要研究任务是揭开特征尺寸调控的模式信息和信号通路, 调控基因及其表达的时空变化, 基因缺失或信号通路阻断时的补偿调节。然后在不同鱼类间(如草鱼和唐鱼之间)比较调控基因组成及表达的差异, 内外因子的作用效率, 调控网络的异同, 只有这样才能够对不同鱼类特征尺寸控制和形成给出一定的解释。随着分子生物学技术的发展和不同鱼类基因组测序的完成, 鱼类尺寸控制的研究也就有了物质基础和信息储备。但由于鱼类特征尺寸调制的复杂性, 其研究还必须做到:(1)充分开展基因组测序和功能蛋白质组学研究, 实行信息资源共享和整合。对特征尺寸差异较大, 亲缘关系较近的鱼类, 开展基因

组测序和功能蛋白表达的比较研究, 提炼出对于尺寸控制有用的信息。(2)开展系统生物学研究, 把基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学、相互作用组学和表型组学等整合在一起研究, 在整体上揭示鱼类尺寸控制的机制。(3)各类实力型的生物研究机构和生物公司开展合作, 从发育、遗传和进化到生理、生化和生态各学科专家密切配合, 协同研究, 对鱼类不同物种特征尺寸控制进行全面探讨, 必将揭开鱼类特征尺寸控制的神秘面纱。

## 参考文献:

- [1] Haldane J B S. On being the right size [A]. In: Possible worlds and other essays[M]. London: Chatto and Windus press. 1927, 10—15
- [2] Conlon I and Raff M. Size control in animal development [J]. *Cdl*, 1999, **96**: 235—244
- [3] Hochledinger K and Wagner E F. The puzzle of size control in organisms [J]. *Science, B I F. futura*, 2000, **15**: 81—90
- [4] Nelson J S. Fishes of the world(3<sup>rd</sup>) [M]. New York: Wiley press, 1994: 1—20
- [5] Chen Y Y. Fauna sinica, Osteichthyes, Cypriniformes(Ⅱ) [M]. Beijing: Science press, 1998, 1[陈宜瑜, 中国动物志, 硬骨鱼纲, 鲤形目(中卷)]. 北京: 科学出版社, 1998, 1]
- [6] Driever W, Stemple D, Schier A, et al. Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development[J]. *Trends in Genetics*, 1994, **10**: 152—159
- [7] Atkinson, D. Temperature and organism size: a biological law for ectotherms[J]. *Adv. Ecol. Res.* 1994, **25**: 1—58
- [8] Partridge L, Barrie B, Fowler K, et al. Evolution and development of body size and cell size in *Drosophila melanogaster* in response to temperature[J]. *Evolution*, 1994, **48**: 1269—1276
- [9] Suquet M, Normant Y, Gaignon J L, et al. Effect of water temperature on individual reproductive activity of pollack (*Pollachius pollachius*) [J]. *Aquaculture*, 2005, **243**: 113—120
- [10] Person-Le R J, Buchet V, Vincent B, et al. Effects of temperature on the growth of pollack (*Pollachius pollachius*) juveniles [J]. *Aquaculture*, 2005, (in press)
- [11] Yang Z C, Xie X J and Sun R Y. The resting metabolism rate of the common catfish (*silurus asotus*) as a function of body weight, temperature and sex[J]. *Acta hydrobiologica sinica*, 1995, **19**(4): 368—373 [杨振才, 谢小军, 孙儒泳. 鮰鱼的静止代谢率及其与体重、温度和性别的关系. 水生生物学报, 1995, 19(4): 368—373]
- [12] Dasa T, Pala A K, Chakraborty S K, et al. Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry (Hamilton, 1822) acclimated to four temperatures[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2005, **30**: 378—383
- [13] Kimball S R and Jefferson L S. Regulation of translation initiation in mammalian cells by amino acids [A]. In: Translational Control of Gene Expression [C], Sonenberg N, Hershey J W and Mathews M B, eds, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, 561—579
- [14] Schmelzle T and Hall M N. TOR, a central controller of cell growth [J]. *Cell*, 2000, **103**: 253—262

- [15] Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control [J]. *Mol. Cell.*, 2002, **10**: 457—468
- [16] Kim D H, Sarbassov D D, Ali S M, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery [J]. *Cell*, 2002, **110**: 163—175
- [17] Stocker H, Radimerski T, Sdhindelholz B, et al. Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila* [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 559—566
- [18] Zhang Y, Gao X, Saucedo L J, et al. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 578—581
- [19] Lin Haoran, 1996. The regulation of growth and growth hormone secretion in fish [J]. *Acta zoologica sinica*, 1996, **42**(1): 69—79 [林浩然. 鱼类生长和生长激素分泌活动的调节(综述). 动物学报, 1996, **42**(1): 69—79]
- [20] Reinecke M, Björnsson B T, Dickhoff W W, et al. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, **142**: 20—24
- [21] Zhang L, Huang X G and Wang D S. Progress in the Studies on the IGF System in Fishes [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2005, **40**(2): 99—105 [章力, 黄希贵, 王德寿. 鱼类胰岛素样生长因子(IGF)系统的研究进展. 动物学杂志, 2005, **40**(2): 99—105]
- [22] Butler A A, and Le Roith D. Control of growth by the soma tropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles [J]. *Annu. Rev. Physiol.*, 2001, **63**: 141—164
- [23] Zhang D C. Research progress on insulin-like growth factors in fishes [J]. *Journal of shanghai fisheries university*, 2005, **14**(1): 66—71 [张殿昌. 鱼类胰岛素样生长因子研究进展. 上海水产大学学报, 2005, **14**(1): 66—71]
- [24] Gregory T R, Hebert P D N and Kolasa J. Evolutionary implications of the relationship between genome size and body size in worms and copepods [J]. *Heredity*, 2000, **84**: 201—208
- [25] Umen J G. The elusive sizer [J]. *Current opinion in cell biology*, 2005, **17**: 1—7
- [26] Galitski T, Saldanha A J, Styles C A, et al. Ploidy regulation of gene expression [J]. *Science*, 1999, **285**: 251—254
- [27] Zan R, Song Z and Liu W. Studies on karyotypes and nuclear DNA contents of some cyprinoid Fishes, with Notes on fish polyploids in China [A], In: Uyeno T, Arai R, Taniuchi T et al. (Eds), Indo-pacific fish biology. Proceedings of the second international conference on Indo-pacific fishes, 29 July—3 August 1985, Tokyo, Japan [C], 1886, 877—885
- [28] Pagel M and Johnstone R A. Variation across species in the size of the nuclear genome supports the junk-DNA explanation for the G-value paradox [J]. *Proc. R. Soc. B*, 1992, **249**: 119—124
- [29] Pan D. Size matters [J]. *EMBO J*, 2004, **5**: 136—139
- [30] Nijhout H F. The control of growth [J]. *Development*, 2003, **130**: 5863—5867
- [31] Coelho C M and Leevers S J. Do growth and cell division rates determine cell size in multicellular organisms [J]. *Journal of Cell Science*, 2000, **113**: 2927—2934
- [32] Trump A, Refaeli Y, Oskarsson T, et al. e-myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature*, 2001, **414**: 768—773
- [33] Lambertsson A. The minute genes in *Drosophila* and their molecular functions [J]. *Adv Genetics*, 1998, **38**: 69—134
- [34] Galloni M and Edgar B A. Cell-autonomous and non-autonomous growth defective mutants of *Drosophila melanogaster* [J]. *Development*, 1999, **126**: 2365—2375
- [35] Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, et al. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control [J]. *Curr. Biol.* 2001, **11**: 213—221
- [36] Oldham S, Stocker H, Laffargue M, et al. The *Drosophila* insulin/IGF receptor controls growth and size by modulating PtdIns P3 levels [J]. *Development*, 2002, **129**: 4103—4109
- [37] Garofalo R S. Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila* [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, **13**: 156—162
- [38] Saucedo L J, Gao X, Chiarelli D A, et al. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 566—571
- [39] Montagne J, Stewart M J, Stocker H, et al. *Drosophila* S6 Kinase: A regulator of cell size [J]. *Science*, 1999, **285**: 2126—2129
- [40] Rameh L E and Cantley L C. The Role of Phosphoinositide 3-Kinase Lipid Products in Cell Function [J]. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**: 8347—8350
- [41] Shioi T, McMullen J R, Kang P M, et al. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 2799—2809
- [42] Martinou J C, Dubois-Dauphin M, Staple J K, et al. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia [J]. *Neuron*, 1994, **13**: 1017—1030
- [43] Nicholson D W and Thromberry N A. Caspases: killer proteases [J]. *Trends Biochem Sci*, 1997, **22**: 299—306
- [44] Roy A L, Carruthers C, Gutjahr T, et al. Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TF I $\beta$  iv [J]. *Nature*, 1993, **365**: 359—361
- [45] Van Beneden R J, Watson D K, Chen T T et al. Cellular myc (e-myc) in fish (rainbow trout): Its relationship to other vertebrate myc genes and to the transforming genes of the MC29 family of viruses [J]. *Proc Natl Acad Sci* 1986, **83**: 3698—3702
- [46] Schreiber-Agus N, Horner J, Torres R, et al. Zebra Fish myc Family and max Genes: Differential Expression and Oncogenic Activity throughout Vertebrate Evolution [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, **13**: 2765—2775
- [47] Zhang H, Okamoto N and Ikeda Y. Two e-myc genes from a tetraploid fish, the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Gene*, 1995, **153**: 231—236
- [48] Futami K, Komiyata T, Zhang H, et al. Differential expression of max and two types of e-myc genes in a tetraploid fish, the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Gene*, 2001, **269**: 113—119
- [49] Barbacid M. ras genes [J]. *Ann Rev Biochem*, 1987, **56**: 779—827
- [50] Khosravi-Far R and Der C J. The Ras signal transduction pathway [J]. *Cancer metastasis Rev*, 1994, **13**: 67—89

- [ 51] Nemoto N, Kodama K, Tazawa A, *et al.* Extensive sequence homology of the goldfish *ras* gene to mammalian *ras* genes [J]. *Differentiation*, 1986, **32**: 17—23
- [ 52] Liu Z, Kullman S W, Bencic D C, *et al.* *ras* oncogene mutations in diethylnitrosamine induced hepatic tumors in medaka (*Oryzias latipes*), a teleost fish[J]. *Mutation Research*, 2003, **539**:43—53
- [ 53] Probe D A and Edgar B A. *Ras* 1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing[J]. *Cell*, 2000, **100**: 435—446
- [ 54] Mangold K, Chang Y J, Mathews C, *et al.* Expression of *ras* genes in rainbow trout[J]. *Mol Carcinog*, 1991, **4**: 97—102
- [ 55] Cheng R, Bradford S, Barnes D, *et al.* Cloning, sequencing, and embryonic expression of an N-*ras* proto-oncogene isolated from an enriched zebrafish (*Danio rerio*) cDNA library [J]. *Mol Mar Biol Biotech*, 1997, **6**: 40—47
- [ 56] Vincent-Hubert F. cDNA cloning and expression of two K+ *ras* genes in the flounder, *Platichthys flesus*, and analysis of hepatic neoplasms [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2001, **126**(B): 17—27
- [ 57] Jefferies H B, Fumagalli S, Dennis P B, *et al.* Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70S6K[J]. *EMBO J*, 1997, **16**: 3693—3704
- [ 58] Li J, Yen C, Liaw D, *et al.* *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. *Science*, 1997, **275**: 1943—1947
- [ 59] Backman S, Stambolic V and Mak T. *PTEN* function in mammalian cell size regulation[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2002, **12**: 516—522
- [ 60] Keyomarsi K and Pardee A. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cell[J]. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1993, **90**: 1112—1116
- [ 61] St. John M A R. Mice deficient for *Lats* 1 develop soft tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction[J]. *Nature Genet*, 1999, **21**: 182—186
- [ 62] Tao W, Zhang S, Turenhalk G S, *et al.* Human homologue of the *Drosophila melanogaster lats* tumour suppressor modulates CDC2 activity[J]. *Nature genetics*, 1999, **21**: 176—180