

# 牦牛 *PIK3CB* 基因克隆及其在卵泡发育过程中的表达研究

马鸿程<sup>1</sup>,熊显荣<sup>1,2</sup>,王 晗<sup>3</sup>,海 卓<sup>3</sup>,闵星宇<sup>2</sup>,李 键<sup>1,2</sup>

(1. 西南民族大学 生命科学与技术学院,四川 成都 610041;2. 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室,四川 成都 610041;3. 动物科学国家民委重点实验室,四川 成都 610041)

**摘要:**旨在探讨磷脂酰肌醇-3 激酶催化亚基  $\beta$  (Phosphoinositide-3 kinase, PI3K, catalytic subunit  $\beta$ , PIK3CB/P110 $\beta$ ) 基因序列特征,比较分析其在牦牛不同发育阶段卵泡中的表达规律。通过 RT-PCR 技术从牦牛卵巢组织中克隆获得 *PIK3CB* 基因序列并对其进行生物信息学分析;采用 RT-qPCR 方法检测 *PIK3CB* 基因在牦牛不同组织中的表达水平;将采集的牦牛卵泡根据直径大小分为大( $\geq 7$  mm)、中(3.0~6.9 mm)、小( $\leq 2.9$  mm)3 组,分别收集各组卵泡中的壁颗粒细胞及卵母细胞提取总 RNA,采用 RT-qPCR 方法检测 *PIK3CB* mRNA 在各级别卵泡壁颗粒细胞及卵母细胞中的相对表达量。结果显示:克隆获得牦牛 *PIK3CB* 基因 CDS 区长 3 213 bp,共编码 1 070 个氨基酸。蛋白质分析显示,PIK3CB 蛋白为亲水酸性蛋白,无跨膜结构无信号肽,二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋和无规卷曲组成。*PIK3CB* 核苷酸同源性及遗传进化树分析显示,牦牛与野牦牛和黄牛亲缘关系最近。*PIK3CB* 基因在牦牛心脏、脾脏、肾脏、肌肉、肝脏、肺脏、子宫、胃、小肠、卵巢组织中均有表达,尤其在脾脏、子宫和卵巢组织中表达量显著高于其他组织( $P < 0.05$ )。RT-qPCR 结果显示,*PIK3CB* 基因在卵泡发育过程中均有表达,其中在各级别卵泡壁颗粒细胞中,mRNA 表达量随着卵泡发育进程呈现上升趋势,且大、中级别卵泡中的表达量极显著高于小卵泡组( $P < 0.01$ );但是卵母细胞中 mRNA 表达量差异不显著( $P > 0.05$ )。结果提示,mRNA 基因参与了牦牛卵泡发育调控,是 PI3K 信号通路在调节颗粒细胞的功能中不可或缺的催化亚基之一,具体调控机制有待进一步研究。本研究为深入探讨 PI3K-AKT 信号通路在卵巢发育中的调控机理提供基础资料。

**关键词:**牦牛;*PIK3CB*;组织表达;卵泡

中图分类号:S823.8<sup>+</sup>5;Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2021)01-0210-09

doi:10.7668/hbxb.20191376



## Cloning of Yak *PIK3CB* Gene and Its Expression During Follicular Development

MA Hongcheng<sup>1</sup>, XIONG Xianrong<sup>1,2</sup>, WANG Han<sup>3</sup>, HAI Zhuo<sup>3</sup>, MIN Xingyu<sup>2</sup>, LI Jian<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;  
2. Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Exploitation of Ministry of Education, Chengdu 610041, China; 3. Key Laboratory of Animal Science of State Ethnic Affairs Commission, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the sequence characteristics of phosphatidylinositol-3 kinase catalytic subunit  $\beta$  (PIK3CB/P110 $\beta$ ) gene and compare its expression profile in different developmental stages of yak follicles. The sequence of *PIK3CB* gene was cloned from yak ovary tissue by RT-qPCR and analyzed by bioinformatics. The expression level of *PIK3CB* gene in different tissues of yak was detected by RT-qPCR method. The collected yak follicles were divided into three groups according to their diameter: large ( $\geq 7$  mm), medium (3.0–6.9 mm) and small ( $\leq 2.9$  mm). The total RNA was extracted from the oocytes and parietal granulosa cells of each group. Then, the relative expression of *PIK3CB* gene mRNA was detected by RT-qPCR. The results showed that the full-length CDS region of yak *PIK3CB* gene was 3 213 bp, encoding 1 070 amino acids. Bioinformatics analysis showed that PIK3CB protein was a hydrophilic acidic protein with no transmembrane structure and signal peptide,

收稿日期:2020-10-09

基金项目:国家“十三五”重点研发专项(2018YFD0502304);西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(2020PTJS15005)

作者简介:马鸿程(1994-),男,甘肃临夏人,硕士,主要从事动物细胞与胚胎工程研究。

通讯作者:熊显荣(1984-),男,江西赣州人,副研究员,博士,硕士生导师,主要从事动物繁殖与胚胎工程研究。

李 键(1967-),男,四川理县人,研究员,博士,硕士生导师,主要从事牦牛细胞生物学研究。

and the secondary structure was mainly composed of  $\alpha$ -helix and random coil. The nucleotide homology and genetic tree analysis showed that yak *PIK3CB* gene was closely related to that of *Bos mutus* and *Bos taurus*. *PIK3CB* gene was expressed in heart, lung, kidney, liver, small intestine, stomach and muscle of yak, especially in spleen, uterus and ovary, the expression level was significantly higher than that in other tissues ( $P < 0.05$ ). The results of RT-qPCR showed that *PIK3CB* gene was expressed during follicular development, and in different follicular wall granulosa cells, the expression of mRNA increased with the development of follicles, and the expression in large and intermediate follicles was significantly higher than that in small follicles ( $P < 0.01$ ), but there was no significant difference in mRNA expression in oocytes ( $P > 0.05$ ). The results suggested that *PIK3CB* gene was involved in the regulation of yak follicular development, and it was one of the indispensable catalytic subunits of PI3K signal in regulating the function of granulosa cells. This study provides basic data for further study on the mechanism of PI3K-AKT signaling pathway in ovarian development.

**Key words:** Yak; *PIK3CB*; Tissue expression; Follicle

牦牛 (*Bos grunniens*) 主要活动于我国海拔 3 000 m 以上的高原地区, 其对低氧恶劣生存环境具有极强的适应性, 是当地牧民生产生活资料的重要来源之一。然而牦牛产业发展相对缓慢, 严重限制当地的经济发展速率, 其主要原因在于牦牛性成熟时间晚、繁殖周期长, 繁殖性能较普通黄牛低下<sup>[1]</sup>。因此, 开展牦牛繁殖方面的研究对丰富我国遗传资源多样性以及提高当地牧民的生活水平具有重要的价值。

卵巢是雌性哺乳动物重要的生殖器官, 其主要作用是支持卵泡发育以及卵母细胞的生长和成熟<sup>[2]</sup>。原始卵泡激活、发育以及排出优质卵母细胞是维持雌性牦牛生育力的必要条件<sup>[3]</sup>。研究发现, 包括磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-AKT) 信号通路在内的多种细胞内信号通路对卵巢相关活动具有重要调控作用<sup>[4]</sup>。PI3K 是一种特异性催化磷脂酰肌醇脂物质的激酶, 作为 PI3K-AKT 信号通路上游关键分子, 其主要有 Class I、Class II、Class III 3 型同工

酶, Class I 又分为 I A 和 I B 2 个亚类<sup>[5-6]</sup>。目前, 人们研究最广泛的是由调节亚单位 p85 与催化亚单位 p110 组成的 I A 型异二聚体蛋白, 其催化亚单位包括 p110 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$  3 种, 其中 p110 $\beta$  由 *PIK3CB* 基因编码<sup>[7-8]</sup>。当相应的配体将酪氨酸激酶受体 (RPTK) 激活后, 招募脂酶 PI3K 到细胞内膜下并将其激活, 激活的 PI3K 通过磷酸化磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP<sub>2</sub>) 产生第二信使磷脂酰肌醇三磷酸 (PIP<sub>3</sub>), 与细胞内 AKT 及 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1) 等含有 PH 结构域的蛋白结合, 促使 PDK1 磷酸化 AKT 蛋白的第 308 位苏氨酸 (Thr) 导致 AKT 的活化, 此外 mTORC2 也能在 473 位丝氨酸 (Ser) 磷酸化 AKT 进而使其到达完全活化的状态, 活化的 AKT 通过激活下游靶蛋白或者抑制下游靶蛋白活性, 包括 TSC2、FOXOs、P27 及 BAD 等, 进而调节细胞增殖、分化、存活及迁移等活动<sup>[9-10]</sup> (图 1)。研究发现, 条件性敲除 PI3K-AKT 通路反向因子磷酸酶-张力蛋白同源

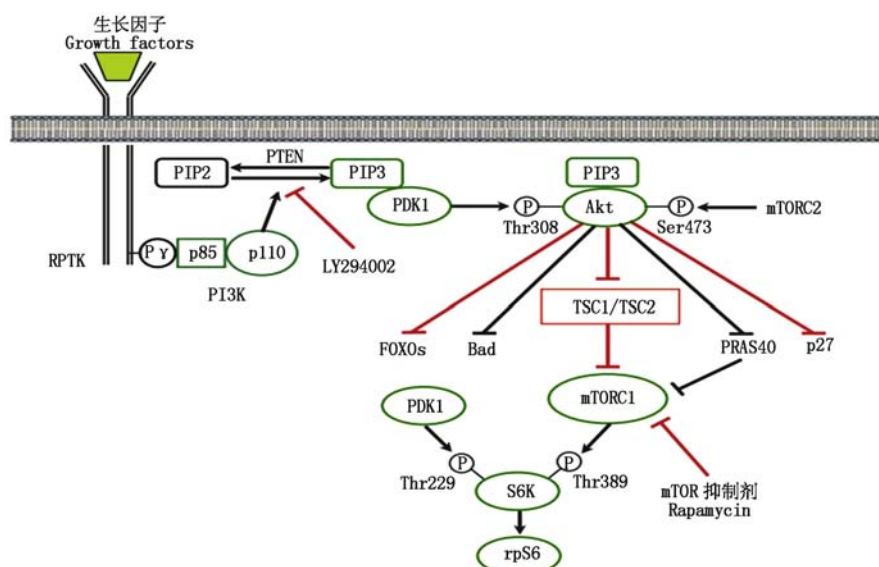


图 1 PI3K (Class I A) 信号通路示意图<sup>[10]</sup>

Fig. 1 Schematic diagram of PI3K (Class I A) signal pathway

物(PTEN)后,PI3K持续激活,使原始卵泡池中的卵泡过度激活,导致敲除小鼠卵巢早衰,证明该通路参与卵泡发育调控<sup>[11]</sup>。在关于PI3K催化亚基的研究中,李倩<sup>[12]</sup>发现,PI3K信号p110 $\delta$ 催化亚基在介导FSH及E2等外源性激素引起的小鼠卵泡发育中起重要作用,p110 $\delta$ 缺失后影响有腔卵泡中颗粒细胞的增殖分化;另有研究表明,PI3K催化亚单位p110 $\beta$ 通过与细胞分裂周期蛋白42(Cell division cycle 42,Cdc42)结合,调节卵母细胞中PTEN的表达,从而调控小鼠原始卵泡的激活过程<sup>[13]</sup>。

目前,关于PIK3CB基因的研究主要集中在癌症方面<sup>[14-15]</sup>,在卵巢组织及其功能中的研究较少。而其作为PI3K的催化亚单位之一,是否参与牦牛生长期卵泡发育调控仍未知。因此,本研究以牦牛为对象进行PIK3CB基因CDS区序列扩增,分析其在各组织中的相对表达量,同时对处于不同发育阶段牦牛卵泡壁层颗粒细胞及卵母细胞中的表达规律进行检测及分析,为深入研究PIK3CB基因在PI3K-AKT信号通路介导的卵泡发育等方面的作用机制提供数据支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

TRIzol Reagent从美国Invitrogen公司购入;核酸助沉剂购自百泰克公司;PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit反转录试剂盒、pMD19-T载体的生产公司为TaKaRa;ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒、2 $\times$ Phanta<sup>®</sup> Max Master Mix(Dye Plus)由南京诺唯赞提供;胶回收试剂盒购自康宁生命科学有限公司;感受态细胞DH5 $\alpha$ 从天根生化科技有限公司购入;0.5%透明质酸酶(0.5 g透明质酸酶粉末、100 mL Medium199)及卵母细胞成熟液(OM培养液)从赛默飞购入。

### 1.2 样本采集及处理

牦牛各组织样本均从四川省广汉市屠宰场采

集。3~5岁健康牦牛(雌性,n=6,随机分为3组,每一组2头牦牛组织样本混合为一个生物学重复),屠宰后立即无菌采集卵巢、子宫、胃、小肠、肌肉、心脏、肝脏、脾、肺脏、肾脏10个组织,剪成约1 cm<sup>3</sup>的组织块,迅速装入提前编号的冻存管中,并投入液氮罐中带回实验室保存备用。

用加有双抗(80 mg/L青霉素和100 mg/L链霉素)的生理盐水将采集到的部分卵巢冲洗干净投入保温瓶(含25℃生理盐水、双抗)中于3 h内带回实验室。用37℃生理盐水(含双抗)将卵巢冲洗数遍,根据卵泡直径大小将卵泡分为大( $\geq 7$  mm)、中(3.0~6.9 mm)、小( $\leq 2.9$  mm)3组,用12号针头注射器抽取卵泡液置于90 mm平皿,在体视显微镜下按组收集卵丘-卵母细胞复合物(Cumulus-oocyte complex,COCs),使用卵母细胞成熟液洗数遍后0.2%透明质酸酶脱颗粒分离出卵母细胞,每组15枚。各组卵泡液离心后得到卵泡壁颗粒细胞,用PBS洗涤数次后,-80℃保存备用。

### 1.3 总RNA提取及反转录

收集的各组卵母细胞严格按照Single Cell-to-CT<sup>TM</sup> Kit试剂盒说明书合成cDNA,-20℃保存备用。按照TRIzol法说明书步骤提取牦牛各组织以及卵泡壁颗粒细胞总RNA,使用核酸浓度仪检测所提取RNA OD值和浓度后,按照TaKaRa公司PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit反转录试剂盒说明书将范围在OD=1.8~2.0的RNA模板合成cDNA,保存于-20℃备用。

### 1.4 引物设计及合成

参考NCBI数据库所公布黄牛(*Bos taurus*)PIK3CB基因的mRNA序列(NM-001206047.1)及GAPDH基因mRNA序列(AC-000162.1),利用NCBI在线工具包设计PCR扩增引物和荧光定量引物,并交由金斯瑞生物科技有限公司(南京)合成,序列见表1。

表1 引物信息

Tab.1 Primer information

引物 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/℃ T <sub>m</sub>	产物长度/bp Product size	用途 Utilization
PIK3CB-1	F:GTCGGTTCGGTACGGCGG R:GCCTCTATGGCAACCATCTCC	59	1 226	基因扩增
PIK3CB-2	F:TGTGTAATGAACAGAACATT R:GTGCCAAAATAAAAACTGCCC	59	1 218	基因扩增
PIK3CB-3	F:GCCTTTCTTGATTGTGCCT R:AGAAGTATTACATCTTCCAG	60	1 608	基因扩增
PIK3CB	F:ACACTCCAAATGCTGCGCTT R:AGAGCGGTCTCCTGTTGCTA	60	99	RT-qPCR
GAPDH	F:TGCGTGCTGAGTAGTTGGTG R:TCTTCTGGGTGGCAGTGATGG	59	290	内参基因

注:F.正向引物;R.反向引物。

Note:F. Sense primer;R. Antisense primer.

### 1.5 牦牛 *PIK3CB* 基因扩增克隆

牦牛卵巢 cDNA 作为模板, *PIK3CB* 基因扩增体系 25  $\mu$ L: 12.5  $\mu$ L Premix Taq™ DNA 聚合酶, 分别 1  $\mu$ L 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L cDNA 模板, ddH<sub>2</sub>O 补足到 25  $\mu$ L。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性(4 min); 95  $^{\circ}$ C 变性(45 s), 60  $^{\circ}$ C 退火(45 s), 72  $^{\circ}$ C 延伸(1 min), 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸(7 min), 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增结果通过琼脂糖凝胶电泳进行检测, 将符合条件的目的条带使用胶回收试剂盒纯化回收, 对目的产物经过连接转化后, 筛选出至少 3 个阳性克隆。样品送上海生工生物工程有限公司(成都)测序。

### 1.6 牦牛 *PIK3CB* 基因生物信息学分析

使用 NCBI 中 Blast 以及 OFR Finder 工具包对测序得到的牦牛 *PIK3CB* 基因序列进行同源性以及开放阅读框分析, 通过 MEGA 7.0 构建系统进化树。ExPASy 在线软件 ProtParam、TMHMM、SignalP、ProtScale、SOPMA、SWISS-MODEL 工具包分别对牦牛 *PIK3CB* 蛋白的理化性质、跨膜区、信号肽、疏水性、二级结构及三级结构进行预测分析; NCBI 中在线程序 CDD 进行 *PIK3CB* 蛋白结构域预测。

### 1.7 牦牛 *PIK3CB* 基因组织表达谱分析

以 *GAPDH* 为内参基因, 采用 RT-qPCR 方法检测 *PIK3CB* 基因在牦牛卵巢、子宫、胃、小肠、肌肉、肝脏、心脏、脾、肾脏、肺脏中的表达情况。检测前将所有组织 cDNA 模板浓度调整一致(40 ng/ $\mu$ L), 以保证数据准确。反应体系为 15  $\mu$ L: SYBR® Premix Ex Taq™ II 7.5  $\mu$ L, 0.5  $\mu$ L 上游引物(10  $\mu$ mol/L), 0.5  $\mu$ L 下游引物(10  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L cDNA 模板, 5.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性(4 min); 95  $^{\circ}$ C 变性(45 s), 60  $^{\circ}$ C 退火(1 min), 72  $^{\circ}$ C 延伸(1 min), 38 个循环; 72  $^{\circ}$ C (7 min)。引物见表 1, 重复 3 次。

### 1.8 牦牛 *PIK3CB* 基因在卵泡发育过程中的表达

*GAPDH* 作为内参基因, 采用 RT-qPCR 方法检测不同大小牦牛卵泡壁颗粒细胞及卵母细胞中 *PIK3CB* 基因 mRNA 的表达。反应体系及反应条件同 1.7。

### 1.9 数据分析

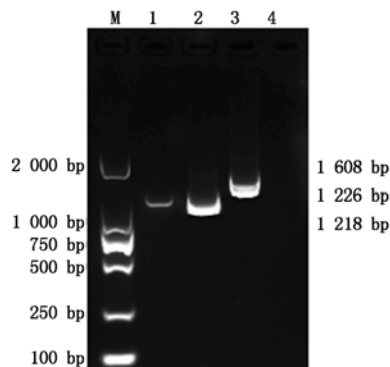
每组试验重复 3 次, 荧光定量结果用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  均一化处理, 通过 SPSS 18.0 软件进行方差分析, ANOVA 进行显著性差异分析。其中  $P > 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  分别为差异不显著、差异显著、差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 牦牛 *PIK3CB* 基因序列

牦牛 *PIK3CB* 基因经过 RT-PCR 法扩增, 并通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对扩增结果进行检测。结

果得到如图 2 所示条带, 与预期大小基本一致。筛出的阳性菌液测序后得到牦牛 *PIK3CB* 基因核苷酸序列 3 326 bp, 其中包括可编码 1 070 个氨基酸的 CDS 区 3 213 bp。



M. DL2000 DNA Marker; 1–3. PCR 产物; 4. 阴性对照(ddH<sub>2</sub>O)。  
M. DL2000 DNA Marker; 1–3. PCR product; 4. Negative control(ddH<sub>2</sub>O).

图 2 牦牛 *PIK3CB* 基因的 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 PCR amplification by electrophoresis of *PIK3CB* gene in yak

### 2.2 *PIK3CB* 基因核苷酸氨基酸比对

通过 NCBI 在线工具包对测定序列编码区与黄牛(NM-001206047.1)的 *PIK3CB* 基因编码区序列进行比对, 结果二者同源性为 99.8%, 且测得序列编码区与黄牛编码区序列相比, 有 4 处碱基发生突变, 引起密码子发生变化(AAG→CAG、TCC→TCA、AGG→GGA、ACT→ACC), 其中第 1, 3 个密码子改变导致第 147, 526 位氨基酸变化由 K→Q、R→G。与野牦牛(XM\_005908937.1)编码区对应序列相比, 同源性为 99.9%, 氨基酸序列无变化。

### 2.3 牦牛 *PIK3CB* 基因与其他物种同源性比对

使用 NCBI 在线工具包对所测核苷酸序列与黄牛(*Bos taurus*, NM-001206047.1)、野牦牛(*Bos mutus* XM\_005908937.1)、山羊(*Capra hircus*, XM\_018049899.1)、人(*Homo sapiens*, KJ891808.1)、大猩猩(*Pan troglodytes*, XM\_003950204.3)、欧洲野猪(*Sus scrofa*, XM\_021069524.1)、小鼠(*Mus musculus*, XM\_011242829.3)、骆驼(*Camelus*, XM\_031443314.1)、原鸡(*Gallus gallus*, XM\_015276908.2)、澳洲野犬(*Canis lupus dingo*, XM\_025449126.1)的 *PIK3CB* 对应核苷酸序列同源性进行比对。结果表明, 测序所得牦牛 *PIK3CB* 基因序列与野牦牛和黄牛的同源性最高, 分别为 99.9%, 99.8%; 与山羊、欧洲野猪、骆驼的同源性也较高(图 3)。表明 *PIK3CB* 基因在哺乳动物长期进化过程中具有较高的保守性。

利用 MEGA 7.0 对包括牦牛在内的 12 个物种 *PIK3CB* 基因 CDS 区进行遗传进化树构建分析。结

果显示,牦牛与野牦牛、黄牛的亲缘关系最近,其次是山羊;同时与大猩猩、欧洲野猪、小鼠、人、骆驼和

澳洲野犬形成一个分支;与原鸡的亲缘关系较远(图4)。

	同源性/% Identity											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
变异度/% Divergence	1	99.9	99.8	98.9	92.9	92.9	95.0	86.2	94.9	79.1	93.9	1 牦牛 <i>Bos grunniens</i>
	2	0.1	99.9	99.0	93.0	93.0	95.1	86.3	95.0	79.2	94.0	2 野牦牛 <i>Bos mutus</i>
	3	0.2	0.1	99.1	93.1	93.1	95.2	86.4	95.0	79.2	94.0	3 黄牛 <i>Bos taurus</i>
	4	1.1	1.0	0.9	93.2	93.2	95.0	86.6	95.0	79.4	94.1	4 山羊 <i>Capra hircus</i>
	5	7.4	7.3	7.2	7.2	99.8	94.3	87.9	94.3	79.6	93.9	5 人 <i>Homo sapiens</i>
	6	7.4	7.4	7.3	7.2	0.2	94.3	87.8	94.4	79.1	94.0	6 大猩猩 <i>Pan troglodytes</i>
	7	5.1	5.1	5.1	5.2	5.9	6.0	86.9	96.1	79.1	94.9	7 欧洲野猪 <i>Sus scrofa</i>
	8	14.9	14.9	14.8	14.5	12.8	13.0	14.1	87.2	78.2	86.6	8 小鼠 <i>Mus musculus</i>
	9	5.3	5.3	2.2	5.2	5.9	5.9	4.1	13.8	79.3	95.0	9 骆驼 <i>Camelus</i>
	10	24.2	24.1	24.0	23.8	23.4	23.3	24.2	26.3	23.9	79.4	10 原鸡 <i>Gallus gallus</i>
	11	6.3	6.3	6.3	6.2	6.4	6.3	5.4	14.4	5.3	23.7	11 澳洲野犬 <i>Canis lupus dingo</i>

图3 牦牛与其他物种 *PIK3CB* 基因的同源性对比

Fig.3 Alignment of *PIK3CB* gene sequences between yak and others species

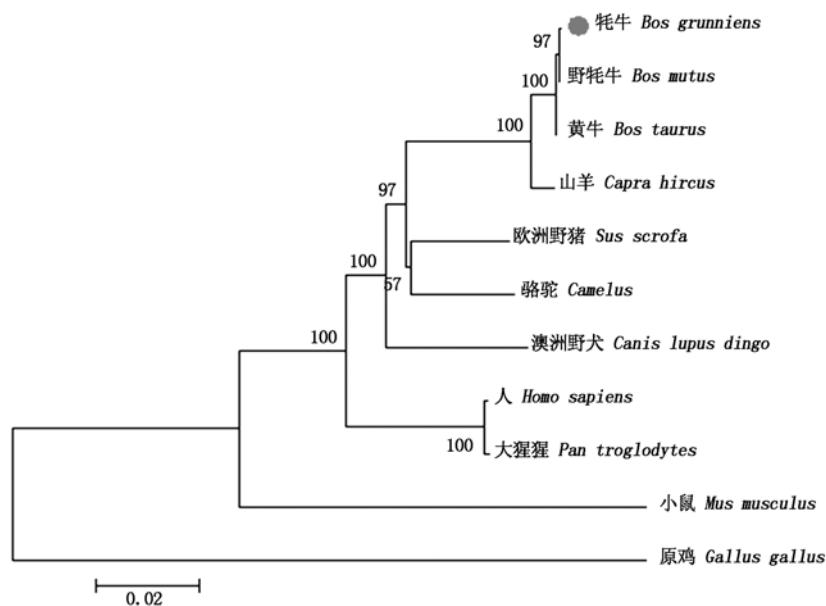


图4 不同物种间 *PIK3CB* 基因的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of *PIK3CB* of various species

#### 2.4 牦牛 *PIK3CB* 蛋白结构和功能预测

利用 ExPASy 在线工具包预测 *PIK3CB* 蛋白理化性质,结果表明,该蛋白原子总数为 17 340,分子量为 122.8 ku,分子式为  $C_{5537}H_{8708}N_{1458}O_{1580}S_{57}$ 。预计半衰期为 30 h,脂肪族指数、不稳定指数、理论等电点及亲水性平均值分别为 94.83,45.42,6.51 和 -0.205,因此推测牦牛 *PIK3CB* 蛋白为亲水酸性蛋白。*PIK3CB* 蛋白共包含有 20 种氨基酸,出现频率较高的有 Glu(8.4%)、Pro(8.2%)、Ser(8.0%)、Ale(7.5%)、Gly(7.0%)、Leu(7.0%)。所有氨基酸中带正电荷的残基总数(Arg + Lys)为 128 个,带负电荷的残基总数(Asp + Glu)为 134 个,由此知 *PIK3CB* 蛋白整体上带负电。

通过 ProtScale 在线进行亲疏水性预测,表明 *PIK3CB* 蛋白亲水性在第 1 003,1 004 位最大为 2.722,第 500 位氨基酸最小为 -2.678,且多数氨基酸的亲水性分值小于零,即具有亲水性,与理化性质分析结果一致。SignalP、TMHMM 工具包信号肽、跨膜区分析预测,结果表明,该蛋白无信号肽、无跨膜结构。NCBI 在线软件 CDD 工具包分析该蛋白结构域,预测得该蛋白共包含 5 个结构域,其中第 42 - 117 位氨基酸为 P85 结合域(ABD),第 180 - 288 位氨基酸为 Ras 结合域(RBD),第 324 - 501 位氨基酸为 C2 结构域,第 532 - 702 位氨基酸为 I 型 PI3K 辅助结构域,第 706 - 1 067 位氨基酸为 p110 $\beta$  催化结

构域(图5)。牦牛 *PIK3CB* 蛋白二级结构预测显示,该蛋白含 492 个  $\alpha$ -螺旋占 45.98%, 52 个  $\beta$ -折叠占 4.86%, 365 个无规卷曲占 34.11%, 161 个延

伸链占 15.05%, 可推测出,  $\alpha$ -螺旋和无规卷曲为该蛋白二级结构主要组成原件, 与该蛋白三级结构预测结果一致(图6)。

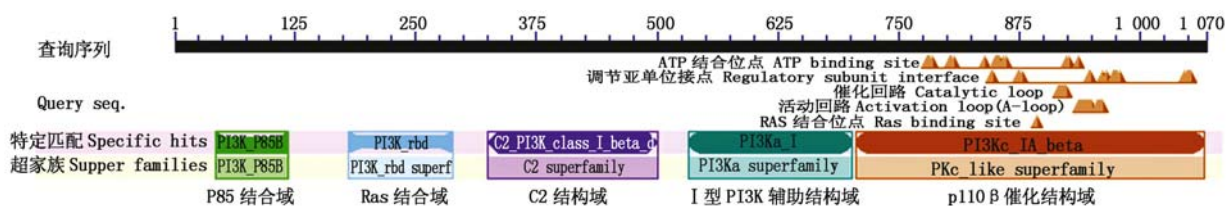


图5 牦牛 *PIK3CB* 蛋白结构域预测

Fig. 5 The domain prediction of *PIK3CB* protein in yak



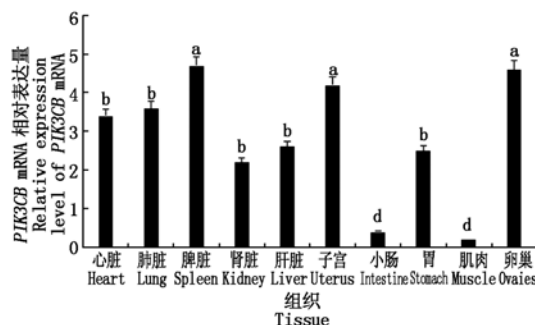
图6 牦牛 *PIK3CB* 蛋白三级结构预测

Fig. 6 Tertiary structure prediction of *PIK3CB* protein in yak

## 2.5 牦牛 *PIK3CB* 基因 mRNA 组织表达谱

利用 RT-qPCR 方法检测牦牛不同组织中 *PIK3CB* 基因 mRNA 的表达。结果显示, *PIK3CB* mRNA 在所检测牦牛相关组织中均有表达, 但各组织间表达量存在差异(图7)。其中, 脾脏、子宫以及卵巢组织中表达量较高, 显著高于小肠、肌肉、心脏、肾脏、肺脏、肝脏、胃组织( $P < 0.05$ )。

## 2.6 不同发育阶段牦牛卵泡中 *PIK3CB* mRNA 表达分析



不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ ; 相同小写字母表示差异不显著,  $P > 0.05$ 。图8同。

Different lowercase letters show significant difference,  $P < 0.05$ ; The same lowercase letters indicate that the difference is not significant,  $P > 0.05$ . The same as Fig. 8.

图7 牦牛 *PIK3CB* 基因的组织表达

Fig. 7 Tissues expression of *PIK3CB* gene in yak

以内参基因 *GAPDH* 作为参照, 利用 RT-qPCR 方法检测不同发育阶段牦牛卵泡中壁颗粒细胞及卵母细胞 *PIK3CB* 基因的表达情况(图8)。结果显示, 随着卵泡发育, 壁颗粒细胞中 *PIK3CB* 基因 mRNA 表达量呈上升趋势, 且大、中、级别卵泡中的表达量极显著高于小卵泡中的表达量( $P < 0.01$ )(图8-A); 卵母细胞中 *PIK3CB* 基因 mRNA 相对表达量整体随卵泡发育程度呈下降趋势, 但各级别卵泡中的相对表达量差异不显著( $P > 0.05$ )(图8-B)。

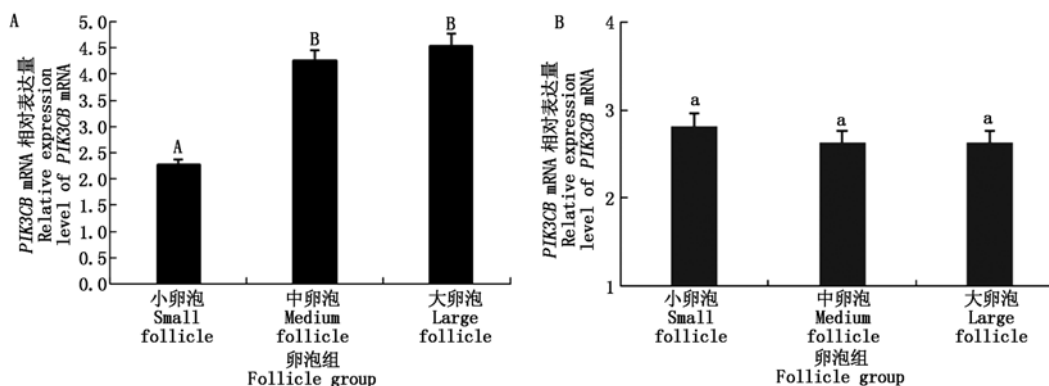


图8 *PIK3CB* 基因在牦牛不同发育阶段卵泡壁颗粒细胞(A)及卵母细胞(B)中的表达水平

Fig. 8 The expression of *PIK3CB* in the granular (A) and the oocyte (B) cells of the different development stages in yak follicle

### 3 讨论与结论

磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 作为一种特异性催化磷脂酰肌醇脂物质的激酶,同蛋白激酶 B (AKT) 形成 PI3K-AKT 信号通路,直接或间接参与细胞增殖、迁移、黏附等生物学过程<sup>[16]</sup>。研究发现,PI3K-AKT 信号通路参与雌性动物一系列生殖调控,包括卵子发生、原始卵泡激活、卵泡发育、卵母细胞减数分裂及早期胚胎发育过程<sup>[17-20]</sup>。*PIK3CB* 是组成 PI3K 的催化亚基之一,由受体蛋白酪氨酸激酶 (RPTK) 激活<sup>[21]</sup>,在该通路相关调控中起着重要的作用。目前,牦牛 *PIK3CB* 基因结构功能及其在雌性生殖中的作用依旧未知。本试验首次克隆了牦牛 *PIK3CB* 基因,并对其结构功能进行了预测。与黄牛 *PIK3CB* 基因编码区相比,牦牛对应序列出现 5 处碱基突变,致使 2 处氨基酸位点发生改变,但这种突变的具体影响有待进一步研究。预测得到牦牛 *PIK3CB* 蛋白具有典型的 I A 型 PI3K 结构域。其中 ABD 结构域与调节亚单位 p85 的 iSH2 结构域通过非常紧密的相互作用,结合形成异源二聚体蛋白 PI3K, RBD 结构域与 Ras 超家族 GTP 酶相互作用,发挥其相关功能,而 C2 结构域是  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性的膜靶向结构域,可结合包括磷脂、肌醇多磷酸酯及细胞内蛋白质在内的多种物质<sup>[22]</sup>;同时通过与 NCBI 上公布的多个物种进行 CDS 区同源性比对,发现牦牛与野牦牛 (99.9%) 和黄牛 (99.8%) 同源性较高,与进化树亲缘关系吻合,进一步表明 *PIK3CB* 催化亚单位在哺乳动物中具有较高的保守性。

组织表达谱的结果显示,*PIK3CB* mRNA 广泛表达在牦牛各组织器官中。研究发现 Class I 型 PI3K 催化亚基中除了 p110 $\gamma$  只在白细胞中特异性表达外,其余包括 p110 $\beta$  在内的几种亚基均在全身各组织中广泛表达,并在细胞内信号通路中发挥作用<sup>[23]</sup>,这与本研究结果相近。*PIK3CB* 在牦牛各组织中的相对表达量呈现不同程度的差异,尤其在脾脏、子宫及卵巢中高表达。研究表明 p110 $\beta$  在免疫复合物激活中性粒细胞中起关键作用<sup>[24]</sup>,而免疫器官脾脏中存在大量的中性粒细胞,因此 *PIK3CB* 基因在脾脏中高表达可能与其参与免疫调节活动有关,此问题有待进一步验证。同时大量研究证明,PI3K 信号通路在生殖活动中起重要作用,*PIK3CB* 在子宫及卵巢中高表达提示其在 PI3K 信号通路介导的卵巢相关功能中扮演重要角色。

哺乳动物卵泡发育起始于胎儿时期,这是一个连续的、选择性的过程,直到初情期后部分卵泡开始

逐渐成熟并排卵<sup>[25-26]</sup>。包括卵泡壁颗粒细胞在内的多种体细胞通过间隙连接,在各种激素、蛋白质、细胞因子及卵泡内外环境的共同调控下直接或间接的参与卵泡发育<sup>[27]</sup>。研究发现,PI3K 信号通路参与啮齿动物卵泡颗粒细胞增殖分化过程调控,小鼠颗粒细胞在 FSH 刺激后 AKT 被磷酸化激活,并在颗粒细胞分化为排卵前表型时达到高峰<sup>[28]</sup>。当 PTEN 从颗粒细胞中敲除时,PI3K-AKT 通路被过度激活导致结构性黄体溶解受到抑制,颗粒细胞增殖加强,卵泡生长并增加排卵率<sup>[29]</sup>。为了进一步探索 *PIK3CB* 参与的 PI3K-AKT 通路在牦牛生殖过程中的作用,本试验运用 RT-qPCR 方法对牦牛不同发育阶段卵泡中 *PIK3CB* 表达量进行了检测,结果表明, *PIK3CB* mRNA 在牦牛大、中、小各级卵泡壁颗粒细胞及卵母细胞中均有表达。在颗粒细胞中, *PIK3CB* 基因 mRNA 表达量随卵泡发育呈上升趋势,且大、中各级卵泡中的表达量极显著高于小卵泡中的表达量 ( $P < 0.01$ )。卵泡中颗粒细胞增殖分化是卵泡生长发育的必要前提<sup>[27]</sup>。Guillemet-Guibert 等<sup>[30]</sup>研究表明, p110 $\beta$  通过被 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 异源三聚体 ( $\text{G}\beta\gamma$ ) 激活来发挥其在 PI3K-AKT 信号转导中的作用。同时 Law 等<sup>[31]</sup>研究发现, G 蛋白偶联受体 (GPCR) 激动剂促卵泡激素 (FSH) 促进蛋白激酶 A (PKA) 依赖性的胰岛素受体底物 1 (IRS1) 在酪氨酸残基上的磷酸化,从而激活 PI3K,使 PI3K-AKT 信号通路活化进而促进颗粒细胞分化。因此,推测在大、中各级卵泡中 *PIK3CB* mRNA 高表达是由于其诱导壁颗粒细胞增殖分化的能力增强,加快卵泡发育进程。在各级别卵泡卵母细胞中 *PIK3CB* 基因 mRNA 同样均有表达,且整体随卵泡发育程度呈下降趋势,但其相对表达量差异不显著 ( $P > 0.05$ )。研究证实卵母细胞内的 PI3K 信号对原始卵泡的存活和激活是必不可少的<sup>[11-13]</sup>,但在生长期卵泡中并不是必需的,当 PTEN<sup>[18]</sup> 及 PDK1<sup>[32]</sup> 从生长期卵泡的卵母细胞中敲除时,卵泡发育、排卵、卵母细胞成熟和生育力均没有发生改变。因此,推测卵母细胞中 *PIK3CB* 表达是由于在原始卵泡激活过程中 mRNA 的储存,而对激活后生长长期卵泡的发育,颗粒细胞中的 *PIK3CB* 比卵母细胞内的 *PIK3CB* 更重要。综上所述, *PIK3CB* 基因参与诱导颗粒细胞增殖,其对卵泡发育过程至关重要。

本试验克隆获得了牦牛 *PIK3CB* 基因序列,其在哺乳动物进化过程中高度保守。*PIK3CB* 基因 mRNA 在牦牛不同大小级别卵泡壁颗粒细胞及卵母细胞中均有表达,其中颗粒细胞在中、大卵泡中高表

达, 卵母细胞在各级别卵泡中的表达差异不显著。表明 *PIK3CB* 基因参与 PI3K-AKT 介导的卵泡发育调控, 是 PI3K 信号通路在调节颗粒细胞的功能中不可或缺的催化亚基之一, 具体调控机制有待进一步研究。本研究为深入探讨 PI3K-AKT 信号通路在卵巢发育中的调控机理提供基础资料。

#### 参考文献:

- [1] 秦文昌, 殷实, 李泽沛, 王斌, 杨柳青, 周婧雯, 李键. 牦牛 *HDAC8* 基因特征及其在组织和卵母细胞成熟过程中的表达分析[J]. 华北农学报, 2020, 35(2): 210 – 216. doi:10.7668/hbxb.20190532.
- [2] Qin W C, Yin S, Li Z P, Wang B, Yang L Q, Zhou J W, Li J. The characteristic of yak *HDAC8* gene and analysis of their expression in different tissues and during the oocyte maturation[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2020, 35(2): 210 – 216.
- [3] Sakaguchi K, Yanagawa Y, Yoshioka K, Suda T, Katagiri S, Nagano M. Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2019, 17(1): 88. doi:10.1186/s12958-019-0534-3.
- [4] Liu Y X, Zhang Y, Li Y Y, Liu X M, Wang X X, Zhang C L, Hao C F, Deng S L. Regulation of follicular development and differentiation by intra-ovarian factors and endocrine hormones[J]. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2019, 24: 983 – 993. doi:10.2741/4763.
- [5] Xu S R, Wei P, Yang Q L, Jia G X, Ma S K, Yang Q E, Jun Z, Zhang R N. Transcriptome analysis revealed key signaling networks regulating ovarian activities in the domestic yak[J]. *Theriogenology*, 2020, 147: 50 – 56. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.02.023.
- [6] Bilanges B, Posor Y, Vanhaesebroeck B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(9): 515 – 534. doi:10.1038/s41580-019-0129-z.
- [7] Dou Z X, Chattopadhyay M, Pan J A, Guerriero J L, Jiang Y P, Ballou L M, Yue Z Y, Lin R Z, Zong W X. The class IA phosphatidylinositol 3-kinase p110 $\beta$  subunit is a positive regulator of autophagy[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 191(4): 827 – 843. doi:10.1083/jcb.201006056.
- [8] Dornan G L, Stariha J T B, Rathinaswamy M K, Powell C J, Boulanger M J, Burke J E. Defining how oncogenic and developmental mutations of *PIK3R1* alter the regulation of Class IA phosphoinositide 3-kinases[J]. *Structure*, 2019, 28(2): 145 – 156. doi:10.1016/j.str.2019.11.013.
- [9] Salloum G, Jakubik C T, Erami Z, Heitz S D, Bresnick A R, Backer J M. PI3K $\beta$  is selectively required for growth factor-stimulated macropinocytosis[J]. *Journal of Cell Science*, 2019, 132(16): 231639. doi:10.1242/jcs.231639.
- [10] Jiang N N, Dai Q J, Su X R, Fu J J, Feng X C, Peng J. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47: 4587 – 4629. doi:10.1007/s11033-020-05435-1.
- [11] Zheng W J, Nagaraju G, Liu Z L, Liu K. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 356(1 – 2): 24 – 30. doi:10.1016/j.mce.2011.05.027.
- [12] Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W L, Härmäläinen T, Peng S L, Lan Z J, Cooney A J, Huhtaniemi I, Liu K. Oocyte-specific deletion of *Pten* causes premature activation of the primordial follicle pool[J]. *Science*, 2008, 319(5863): 611 – 613. doi:10.1126/science.1152257.
- [13] 李倩. PI3K p110delta 催化亚基在小鼠卵巢卵泡生长中的功能研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2013.
- [14] Li Q. The p110delta Isoform of phosphoinositide 3-kinase catalytic subunits is key for hormonally stimulated ovarian follicle growth[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2013.
- [15] Yao H, Zhang J W, Wen J, Wang Y B, Niu W B, Teng Z, Zhao T T, Dai Y L, Zhang Y, Wang C, Qin Y Y, Xia G L, Zhang H. CDC42 controls the activation of primordial follicles by regulating PI3K signaling in mouse oocytes[J]. *Bmc Biology*, 2018, 16(1): 73. doi:10.1186/s12915-018-0541-4.
- [16] Zhang L, Li Y D, Wang Q C, Chen Z, Li X Y, Wu Z X, Hu C H, Liao D, Zhang W, Chen Z S. The PI3K subunits, P110 $\alpha$  and P110 $\beta$  are potential targets for overcoming P-gp and BCRP-mediated MDR in cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2020, 19(1): 10. doi:10.1186/s12943-019-1112-1.
- [17] Zhang Z, Zhang L Y, Wang B, Wei R, Wang Y X, Wan J P, Zhang C, Zhao L, Zhu X X, Zhang Y H, Chu C, Guo Q, Yin X Q, Li X. MiR-337-3p suppresses proliferation of epithelial ovarian cancer by targeting PIK3CA and PIK3CB[J]. *Cancer Letters*, 2020, 469: 54 – 67. doi:10.1016/j.canlet.2019.10.021.
- [18] Yang J, Nie J, Ma X L, Wei Y Q, Peng Y, Wei X W. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials[J]. *Molecular Cancer*, 2019, 18(1): 26. doi:10.1186/s12943-019-0954-x.
- [19] John G B, Gallardo T D, Shirley L J, Castrillon D H. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth[J]. *Developmental Biology*, 2008, 321(1): 197 – 204. doi:10.1016/j.ydbio.2008.06.017.
- [20] Jagarlamudi K, Liu L, Adhikari D, Reddy P, Idahl A, Ottander U, Lundin E, Liu K. Oocyte-specific deletion of *Pten* in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation[J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6186. doi:10.1371/journal.pone.0006186.
- [21] Han S J, Vaccari S, Nedachi T, Andersen C B, Kovacina K S, Roth R A, Conti M. Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation[J]. *Embo Journal*, 2006, 25(24): 5716 – 5725. doi:10.1038/sj.emboj.7601431.
- [22] Zheng W J, Liu K. The emerging role of maternal phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) signaling in manipulating mammalian preimplantation embryogenesis[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(2): 178 – 179. doi:10.4161/cc.10.2.14475.
- [23] Cantley L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655 – 1657. doi:10.1126/science.296.5573.1655.

- [22] Dornan G L, Burke J E. Molecular mechanisms of human disease mediated by oncogenic and primary immunodeficiency mutations in Class IA phosphoinositide 3-kinases [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 575. doi:10.3389/fimmu.2018.00575.
- [23] Bi L, Okabe I, Bernard D J, Nussbaum R L. Early embryonic lethality in mice deficient in the p110 $\beta$  catalytic subunit of PI 3-kinase [J]. *Mammalian Genome*, 2002, 13(3): 169 – 172. doi:10.1007/BF02684023.
- [24] Kulkarni S, Sitaru C, Jakus Z, Anderson K E, Damoulakis G, Davidson K, Hirose M, Juss J, Oxley D, Chessa T A M, Ramadani F, Guillou H, Segonds-Pichon A, Fritsch A, Jarvis G E, Okkenhaug K, Ludwig R, Zillikens D, Mocsai A, Vanhaesebroeck B, Stephens L R, Hawkins P T. PI3K plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes [J]. *Science Signaling*, 2011, 4(168): ra23-ra23. doi:10.1126/scisignal.2001617.
- [25] Sato E. Intraovarian control of selective follicular growth and induction of oocyte maturation in mammals [J]. *Proceedings of the Japan Academy Series B-physical and Biological Sciences*, 2015, 91(3): 76 – 91. doi:10.2183/pjab.91.76.
- [26] Hunt P A, Hassold T J. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? [J]. *Trends in Genetics*, 2008, 24(2): 86 – 93. doi:10.1016/j.tig.2007.11.010.
- [27] Shimizu T. Molecular and cellular mechanisms for the regulation of ovarian follicular function in cows [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2016, 62(4): 323 – 329. doi:10.1262/jrd.2016-044.
- [28] Gonzalez-Robayna I J, Falender A E, Ochsner S, Firestone G L, Richards J S. Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): Evidence for a kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells [J]. *Molecular Endocrinology*, 2000, 14(8): 1283 – 1300. doi:10.1210/mend.14.8.0500.
- [29] Fan H Y, Liu Z L, Cahill N, Richards J S. Targeted disruption of *Pten* in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells [J]. *Molecular Endocrinology*, 2008, 22(9): 2128 – 2140. doi:10.1210/me.2008-0095.
- [30] Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, Meek S, Smith A J H, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. The p110 $\beta$  isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 $\gamma$  [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(24): 8292 – 8297. doi:10.1073/pnas.0707761105.
- [31] Law N C, Hunzicker-Dunn M E. Insulin receptor substrate 1: the hub linking follicle-stimulating hormone to phosphatidylinositol-3 kinase activation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(9): 4547 – 4560. doi:10.1074/jbc.M115.698761.
- [32] Zheng W J, Gorre N, Shen Y, Noda T, Ogawa W, Lundin E, Liu K. Maternal phosphatidylinositol 3-kinase signalling is crucial for embryonic genome activation and preimplantation embryogenesis [J]. *Embo Reports*, 2010, 11(11): 890 – 895. doi:10.1038/embor.2010.144.