

论著·基础研究

pro-1 基因通过 DAF-16 调控秀丽隐杆线虫的寿命

毛玉琴¹, 韩三峰², 王立顺¹

1. 上海交通大学 医学院附属瑞金医院分子医学中心, 上海 200025; 2. 复旦大学附属闵行医院, 上海 201100

[摘要] **目的** · 用秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)作为模式生物,观察 *pro-1* 基因对寿命的影响,并初步探究其影响寿命的机制。**方法** · 在线虫上以 RNAi 技术定向干扰 *pro-1* 基因的表达,随后对 *pro-1* 沉默表达后的线虫进行寿命分析,检测其在生长发育、运动、饮食以及生殖能力等方面的变化。进一步用 RNAi 方法结合线虫体内荧光定位技术以及 RT-PCR 技术等探究 *pro-1* 影响寿命可能的分子机制。**结果** · 与对照组线虫相比,干扰 *pro-1* 表达后,沉默组线虫平均寿命延长了 14.58% ($P=0.002$);在 TJ356 线虫中干扰 *pro-1* 表达后,DAF-16 明显进入细胞核,且 DAF-16 下游靶基因如 *old-1*、*sod-3*、*hsp-16.1*、*mtl-1*、*ctl-2* 等的 mRNA 水平被上调。**结论** · *pro-1* 基因通过促进 DAF-16 进入细胞核并上调其下游靶基因的 mRNA 水平,从而延长秀丽隐杆线虫的寿命。

[关键词] 秀丽隐杆线虫;*pro-1*;*daf-16*;寿命

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2016.10.003

[中图分类号] Q291

[文献标志码] A

Pro-1 regulates the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through DAF-16

MAO Yu-qin¹, HAN San-feng², WANG Li-shun¹

1. Center for Molecular Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Minhang Hospital, Fudan University, Shanghai 201100, China

[Abstract] **Objective** · To observe the effects of *pro-1* gene on the lifespan of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) and preliminary explore the molecular mechanisms. **Methods** · RNAi technique was used to intervene the expression of *pro-1* gene in *C. elegans*. The lifespan of *C. elegans* with silent *pro-1* was analyzed and changes in growth, development, motion, diet, and reproduction were detected. The molecular mechanisms of *pro-1* to affect the lifespan were explored using RNAi technique, fluorescence localization technology, and RT-PCR. **Results** · The lifespan of silence group *C. elegans* was significantly increased by 14.58% after the expression of *pro-1* intervened as compared with controls ($P=0.002$). DAF-16 translocated into nucleus in *C. elegans* of TJ356 strain after intervening the expression of *pro-1* and mRNA expressions of downstream target genes such as *old-1*, *sod-3*, *hsp-16.1*, *mtl-1* and *ctl-2* were up-regulated. **Conclusion** · *pro-1* prolongs the lifespan of *C. elegans* via promoting the translocation of DAF-16 into nucleus and up-regulating the mRNA expressions of downstream target genes.

[Key words] *Caenorhabditis elegans*; *pro-1*; *daf-16*; lifespan

衰老是众多疾病发生的关键因素之一。目前认为生理功能的丧失会导致疾病的易感性增加,衰老是影响冠状动脉粥样硬化、脑血管疾病、恶性肿瘤、感染、糖尿病和内脏退行性疾病发生的危险因素之一^[1]。随着年龄的增长,衰老引起的相关疾病发病率也明显上升,所以衰老和衰老相关的疾病成为我们必须面对的问题,健康长寿也是人类追求的目标。自从分离出来第一个长寿的线虫品系,衰老的研究开启了一个新的时代^[2-4]。生物学界目前关于衰老遗传学的大部分知识和信息都来源于对秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的研究。目前研究表明,衰老是被一些经典的信号通路以及转录

因子调控^[3]。例如,我们熟知的外界压力和营养因子可调节寿命^[5];温度变化^[6-8]、氧化应激^[9]、化学物质^[10]、性腺以及呼吸速率或翻译水平的高低都会影响寿命^[11-14]。有趣的是,这些信号通路与寿命的关系多数都是在秀丽隐杆线虫上被首次发现的。由于衰老调控的基因具有高度的保守性,所以在秀丽隐杆线虫中的一些遗传学方面的研究结果可以为哺乳动物相关研究提供很有价值的线索。

核糖体是一种负责翻译的细胞器,它的合成对细胞的生长和增殖至关重要^[15]。在转录的过程中,核糖体 RNA 基因位于核仁中,在 RNA 聚合酶 I 的作用下进

[基金项目] 国家自然科学基金(81472758, 31170783) (National Natural Science Foundation of China, 81472758, 31170783)。

[作者简介] 毛玉琴(1992—),女,硕士生;电子信箱:myq110813@163.com。

[通信作者] 王立顺,电子信箱:jywangls@shsmu.edu.cn。



行。在阿尔茨海默病的患者中,成熟的核糖体 RNA 28S/18S 的比例严重降低^[16-17]。蛋白质组学分析显示在长寿的秀丽隐杆线虫中,核糖体蛋白大幅度下降。最近研究^[18]发现,在秀丽隐杆线虫中,线粒体的核糖体蛋白降低可延长寿命。核糖体中的长链非编码 RNA 也被发现是延长寿命所必需的^[19]。除此之外,雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR)信号通路以及核糖体的合成在长寿中也扮演着重要的角色^[20]。这些研究发现表明,与核糖体生物合成以及 RNA 编辑相关的遗传因素可能参与了衰老的调控。

核糖体的生物合成受核糖体 RNA (rRNA) 的生成和加工、核糖体的组装以及核糖体的运输所调控。*pro-1* 基因属于 WD 重复蛋白亚群,与主要的真核生物的基因组同源。在酵母中,*pro-1* 与酿造酵母的 rRNA 加工蛋白前体同源;在酿造酵母中,rRNA 加工蛋白前体是生殖所必需的,rRNA 加工蛋白前体也参与核糖体生物合成和 rRNA 加工^[21-23]。有报道称,*pro-1* 也参与了 rRNA 的加工^[23-24],也是生殖细胞增殖和分化所必需的^[25]。性腺对寿命的影响以及 JNK 信号通路调控寿命都通过 DAF-16 的作用^[26-28]。本文主要想探讨在秀丽隐杆线虫中沉默 *pro-1* 基因后对其寿命的影响及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 线虫株系及菌株

野生型线虫 N2、*daf-16* (mu86) 基因突变型线虫株系、TJ356 线虫 (*daf-16p::daf-16a/b::GFP + rol-6*)、大肠埃希菌 OP50 购自美国秀丽线虫遗传中心 (Caenorhabditis Genetics Center)。

1.2 主要仪器及试剂

氨苄青霉素 (上海 BBI, A610028); 羧苄青霉素 (美国 Sigma, A6140); L4440 质粒 (美国 Addgene)。体式解剖显微镜 (厦门 Motic); 低温高速离心机 (德国 Hettich); 激光共聚焦成像系统 (日本 Nikon)。

1.3 实验方法

1.3.1 线虫生长培养基 (NGM) 的配制 称取 3 g NaCl、20 g 琼脂、2.5 g 蛋白胨,加入 975 mL ddH₂O 于 2 L 锥形瓶中,用锡箔纸封口,121 °C 高压处理 20 min。待其冷却后,加入 1 mol/L CaCl₂ 1 mL, 5 mg/mL 胆固醇 1 mL, 1 mol/L MgSO₄ 1 mL 和 1 mol/L KPO₄ 缓冲液 25 mL,混匀后倒入细菌培养皿中。室温放置 2 d 后,铺上 OP50 菌,室温再放置 2 d 后即可进行线虫培养。

1.3.2 RNAi 菌的制备 *pro-1* 质粒的制备:以正向引物 5'-cgagctc GGTGACGAGCATAACACGAA-3' (含有 *Sac* I 限制性内切酶酶切位点) 和反向引物 5'-gggtacc TTT GCTTCCAGATTCCAACA-3' (含有 *Kpn* I 限制性内切酶酶切位点) 扩增 N2 线虫的 cDNA,将 PCR 产物酶切后转入 L4440 载体中,再转化至改良的大肠埃希菌感受态细胞中,进行单克隆扩增。

daf-2 质粒的制备:以正向引物 5'-cgagctc TCTA CTTTTTCGGCTTTTTCCTT-3' (含有 *Sac* I 限制性内切酶酶切位点) 和反向引物 5'-gggtacc TCTCTGAAAAAGTT GGCAAAATC-3' (含有 *Kpn* I 限制性内切酶酶切位点) 扩增 N2 线虫的 cDNA,将 PCR 产物酶切后转入 L4440 载体中,再转化至改良的大肠埃希菌感受态细胞中,进行单克隆扩增。

1.3.3 线虫寿命分析 在 20 °C 条件下,将同步化好的 N2 线虫在 NGM 板中培养至 L4 期,然后喂食 RNAi 菌,分别含有沉默 *pro-1* 基因的质粒 (沉默组) 和空载质粒 (对照组),每隔 1 日转 1 次 RNAi 板。RNAi 板需要新鲜配制,每次挑单克隆 RNAi 菌摇菌扩增^[29]。线虫产卵多的时候最好每日转 1 次板,防止孵化出来的幼虫影响成虫寿命的分析,同时保证充足的 RNAi 菌,避免线虫处于饥饿的状态。判断线虫是否死亡需要将线虫挑至板子中没有菌的地方,若其头部及身体没有明显的摆动,则认为其死亡。

1.3.4 线虫发育、饮食、运动以及生殖能力的检测 在 20 °C 培养条件下,同步化 N2 线虫在 NGM 板中培养至 L4 期,然后喂食 RNAi 菌,48 h 后在解剖显微镜下计数线虫,并测量线虫身体长度,观察 30 s 内线虫身体某一个部位在液体中摆动一个来回的次数、10 s 咽部肌肉跳动次数,以及产卵 24 h 后的子代数^[30-31]。

1.3.5 线虫 *pro-1* 基因沉默后对 DAF-16 入细胞核的影响 在 20 °C 条件下,将同步化好的 TJ356 品系线虫在 NGM 板中培养至 L4 期,然后喂食 RNAi 菌。48 h 后,在载玻片上滴一滴 1 mol/L NaN₃,将处理过的线虫挑至液滴中,待其死后盖上盖玻片,用封片剂进行封片;在激光共聚焦显微镜下进行拍照,观察 DAF-16 入细胞核的情况^[26-27]。

1.3.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 在 20 °C 培养条件下,同步化 N2 线虫在 NGM 板中培养至 L4 期,然后喂食 RNAi 菌,48 h 后将约 800 条线虫用 M9 缓冲液从培养皿中洗至 1.5 mL EP 管中,然后按照 TRIzol 试剂提取 RNA 的方法提取线虫 RNA,将其反转录为 cDNA,最后进行 RT-PCR^[32]。引物序列见表 1。

表 1 荧光 PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequences for fluorescence RT-PCR

基因名称	正向引物	反向引物
<i>hsp-16.1</i>	5'-CAGAGGCTCTCCATCTGAATC-3'	5'-TCTTGTCTCCTTGAATTGATAATG-3'
<i>old-1</i>	5'-TTCGAATTGCAGACTTTTGA-3'	5'-TACTTTCAGGTGCCATCCAG-3'
<i>acs-19</i>	5'-CCGACTTATCCGACTCCTTC-3'	5'-TTTCCGAGAAGAGCTTTCAA-3'
<i>hsp-16.49</i>	5'-AAATTGAATTGGATGGAAGAGAA-3'	5'-TCGAAATTGCAGATTGACAG-3'
<i>sod-3</i>	5'-CGAGCTCGAACCTGTAATCAGCCATG-3'	5'-GGGGTACCGTGATATTCTTCCAGTTG-3'
<i>mtl-1</i>	5'-ATGGCTTGCAAGTGTGACTG-3'	5'-TTCTCACTGGCCTCCTCAC-3'
<i>ctl-2</i>	5'-ACACGGTGATTACCCACTGA-3'	5'-TCCTTGGAGCATCTTGTCTG-3'
<i>act-1</i>	5'-CCAGGAATTGCTGATCGTATGCAGAA-3'	5'-TGGAGAGGGAAGCGAGGATAGA-3'

2 结果

2.1 *pro-1* 基因沉默表达后对 N2 线虫寿命的影响

在 20 ℃ 条件下沉默组 ($n = 259$) 的平均寿命为 (17.88 ± 0.34) d, 而对照组 ($n = 236$) 的平均寿命为 (15.56 ± 0.51) d, 沉默组的线虫平均寿命延长了 14.58% ($P = 0.002$) (图 1)。

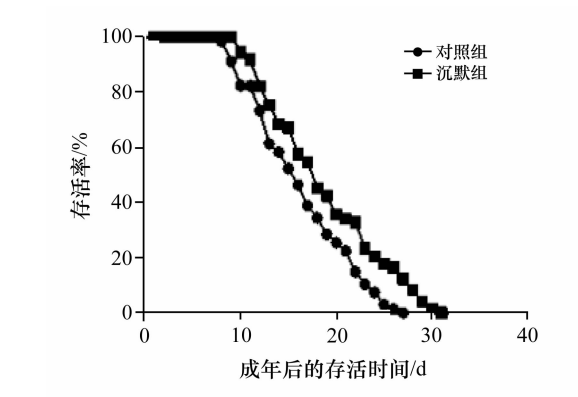


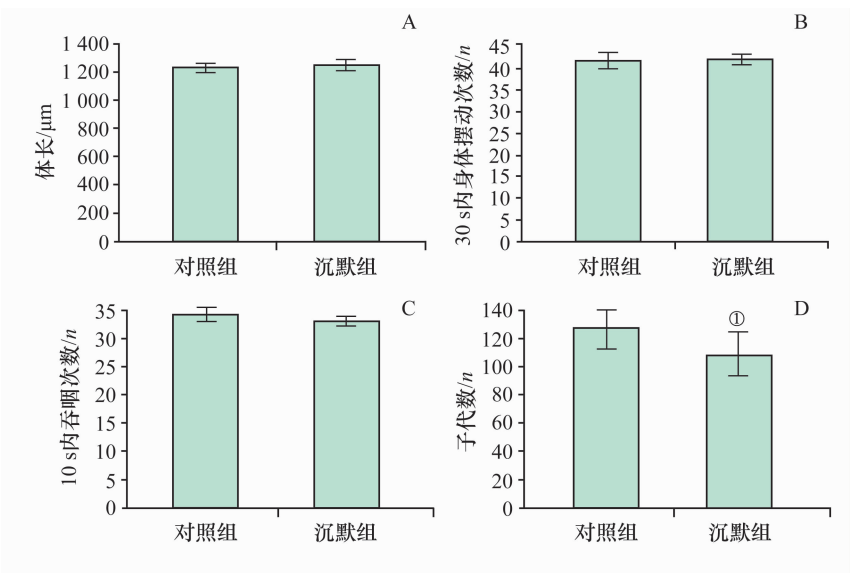
图 1 *pro-1* 沉默表达后 N2 秀丽隐杆线虫的生存曲线
Fig 1 Survival curves for N2 *C. elegans* with silent *pro-1*

2.2 *pro-1* 基因沉默后对秀丽隐杆线虫发育、饮食、运动及生殖能力的影响

为检测 N2 线虫 *pro-1* 基因沉默后对线虫的发育、饮食、运动及生殖能力的影响^[26,30-31], 我们分别检测了 RNAi 表达 48 h 后线虫的 4 项指标。沉默组线虫 ($n = 62$) 的平均体长为 $(1\ 251.75 \pm 35.33)$ μm , 30 s 身体摆动平均次数为 (42.18 ± 1.67) 次, 10 s 咽部肌肉跳动的平均次数为 (32.61 ± 0.65) 次, 这些指标均与对照组 ($n = 60$) 差异无统计学意义。而沉默组线虫 ($n = 45$) 子代数为 108 ± 15 , 而对照组 ($n = 48$) 子代数为 126 ± 12 , 差异具有统计学意义 ($P = 0.009$) (图 2)。

2.3 *pro-1* 基因对 DAF-16 入细胞核的影响

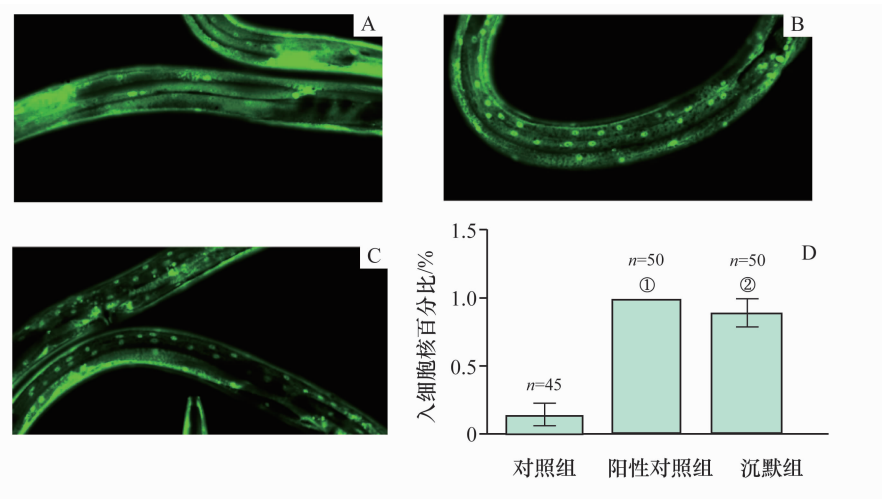
20 ℃ 培养条件下, 干扰表达 48 h 后, 对照组线虫中的 DAF-16 几乎不入细胞核; 而干扰 *daf-2* 表达后, DAF-16 明显入细胞核, 这与已知报道一致^[27]。而沉默 *pro-1* 基因后同样可以明显观察到 DAF-16 入细胞核。经统计分析, 沉默 *daf-2* 和 *pro-1* 表达后 DAF-16 入细胞核比例近 100%, 而对照组仅约 10% (图 3)。



注: A. 线虫身体的长度; B. 线虫 10 s 内吞咽的次数; C. 线虫 30 s 内身体摆动的次数; D. 线虫产卵 24 h 后子代数。^① $P = 0.009$, 与对照组比较。
图 2 *pro-1* 沉默表达对线虫生长发育、饮食、运动和生殖能力的影响

Fig 2 Effects of silencing *pro-1* on growth, development, motion, diet, and reproduction of *C. elegans*





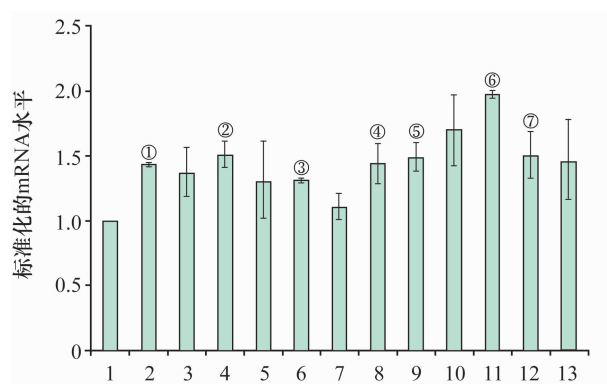
注: A. 对照组; B. 阳性对照组; C. 沉默组; D. DAF-16::GFP 进入细胞核百分比。^① $P = 0.005$, ^② $P = 0.001$, 与对照组比较。

图3 *pro-1* 沉默表达后对 DAF-16::GFP 入细胞核的影响

Fig 3 Effects of silencing *pro-1* on the translocation of DAF-16::GFP into nucleus

2.4 *pro-1* 基因沉默表达对 *daf-16* 下游基因 mRNA 水平的影响

为了检测 DAF-16 进入细胞核后的转录活性,我们进一步检测了其下游靶基因的 mRNA 水平^[28,33-35]。沉默组 ($n = 2100 \sim 2400$) 较对照组 ($n = 2100 \sim 2400$) 显著上调了 DAF-16 下游一些靶基因的 mRNA 水平,如 *old-1*、*sod-3*、*hsp-16.1*、*mtl-1* 和 *ctl-2* 等(图4)。



注: 1. *act-1*; 2. *hsp-16.1*; 3. *sod-3*; 4. *old-1*; 5. *dod-1*; 6. *acs-19*; 7. *ctl-1*; 8. *hsp-16.49*; 9. *sod-3*; 10. *hsp-16.2*; 11. *mtl-1*; 12. *ctl-2*; 13. *hsp-16.11*。^① $P = 0.000$, ^② $P = 0.011$, ^③ $P = 0.007$, ^④ $P = 0.036$, ^⑤ $P = 0.014$, ^⑥ $P = 0.004$, ^⑦ $P = 0.040$, 与内参 *act-1* 比较。

图4 *pro-1* 基因沉默表达对 DAF-16 下游基因 mRNA 水平的影响

Fig 4 Effects of silencing *pro-1* on mRNA expressions of downstream genes of DAF-16

2.5 *pro-1* 基因沉默表达对 *daf-16* (mu86) 线虫寿命的影响

为确定 *daf-16* 在 *pro-1* 基因对线虫寿命影响中的作用,我们将 *daf-16* (mu86) 线虫在 20℃ 条件下培养至 L4 期,然后喂食含有沉默表达 *pro-1* 基因质粒或空载质粒的细菌,看是否能延长 *daf-16* (mu86) 线虫的寿命。*daf-16* (mu86) 线虫喂食空载质粒 ($n = 157$) 的平均寿命为 (13.67 ± 0.23) d,而 *daf-16* (mu86) 线虫沉默 *pro-1* 基因

($n = 185$) 后平均寿命为 (13.80 ± 0.19) d,两者差异无统计学意义(图5)。

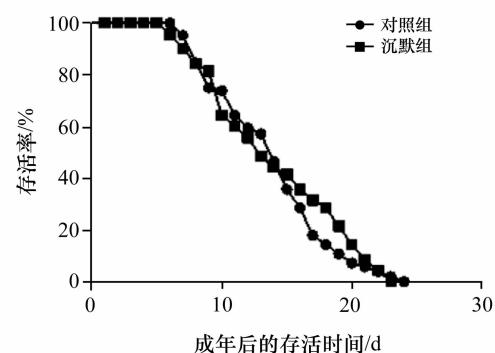


图5 *pro-1* (RNAi) 对 *daf-16* (mu86) 突变线虫寿命的影响

Fig 5 Effects of *pro-1* (RNAi) on the lifespan of *C. elegans* with *daf-16* (mu86) mutant

3 讨论

本研究经过一系列的实验证明 *pro-1* 是通过 DAF-16 延长秀丽隐杆线虫寿命的。我们首先发现在野生型线虫中将 *pro-1* 基因沉默表达后,与对照组相比,寿命显著延长。为了进一步确认,我们做了 3 次独立试验,每次试验重复 3 次,结果一致。由于目前科学家对于长寿的研究不仅仅局限于寿命的延长,还需要健康的身体,所以我们进一步探究 *pro-1* 基因沉默表达对线虫生长发育、饮食能力、运动能力以及生殖能力是否有影响,结果发现 *pro-1* 基因沉默表达后仅对生殖能力受到影响,这一现象也与文献中报道一致^[25]。为了探讨 *pro-1* 基因被干扰后延长寿命的机制,我们以表达 DAF-16::GFP 的线虫作为背景进行研究,发现 *pro-1* 沉默表达后通过促进 DAF-16 入细胞核,上调其下游靶基因 mRNA 水平,延长了野生型线虫的寿命。

根据文献报道,已知延长寿命的信号主要是 insulin 信号通路^[36]、线粒体通路以及节食通路^[3,18],切除性腺也可延长寿命^[11,37]。切除性腺对寿命的影响主要通过调节 DAF-12、DAF-16 和 NHR80^[11],所以综合文献的相关知识,我们想探究一下沉默表达 *pro-1* 延长 N2 寿命是否与 DAF-16 转录因子的作用有关^[27]。核糖体的生物合成和 rRNA 加工对衰老的影响在很大程度上都是未知的。在我们的研究中,发现 *pro-1* 沉默表达后可以延长秀丽隐杆线虫的寿命。*pro-1* 基因参与核糖体的生物合成以及 rRNA 的加工^[23-24],所以本研究结果证实了核糖体的生物合成与长寿之间的关系。在秀丽隐杆线虫中,遗传学研究表明衰老被高度保守的信号通路上的许多基因控制,其中 DAF-16 所在信号通路是最重要的一个。DAF-16 是 FOXO 家族的一个因子,FOXO 家族也

被广泛报道与长寿人群紧密相关^[38-40]。激活一个保守的磷脂酰肌醇 3-激酶信号通路或者生活压力都可以调节 *daf-16* 的活性^[41]。DAF-16 本身在细胞质中,当其发挥转录活性时,其会进入细胞核,进而调节大量转录因子的活性,包括压力抵抗、脂肪代谢、对抗病原体、休眠的形成和寿命调节的因子等^[36]。

本研究表明,*pro-1* 基因沉默表达后通过 DAF-16 延长了线虫的寿命,提示其可能介入了长寿信号通路;且当 *daf-16* 缺失时,*pro-1* 基因沉默表达并不能继续延长线虫寿命,提示 *daf-16* 是 *pro-1* 基因延长线虫寿命所必需的。目前的研究发现一系列 DAF-16 下游的靶基因 mRNA 水平均被上调,这些靶基因如何调控 *pro-1* 基因沉默表达后延长 N2 寿命的有待进一步研究和证实。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] 毛玉琴,韩三峰,王立顺. 秀丽隐杆线虫中与衰老相关的 DAF-2/IGF-1 信号通路研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2014, 34(6): 929-933.
- [2] Klass MR. A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results[J]. Mech Ageing Dev, 1983, 22(3-4): 279-286.
- [3] Kenyon CJ. The genetics of ageing[J]. Nature, 2010, 464(7288): 504-512.
- [4] Kenyon C, Chang J, Gensch E, et al. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type[J]. Nature, 1993, 366(6454): 461-464.
- [5] Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys[J]. Science, 2009, 325(5937): 201-204.
- [6] Furuhashi T, Sakamoto K. Heat shock factor 1 prevents the reduction in thrashing due to heat shock in *Caenorhabditis elegans*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 462(3): 190-194.
- [7] Lithgow GJ, White TM, Melov S, et al. Thermotolerance and extended lifespan conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(16): 7540-7544.
- [8] Lee SJ, Kenyon C. Regulation of the longevity response to temperature by thermosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*[J]. Curr Biol, 2009, 19(9): 715-722.
- [9] Heidler T, Hartwig K, Daniel H, et al. *Caenorhabditis elegans* lifespan extension caused by treatment with an orally active ROS-generator is dependent on DAF-16 and SIR-2.1[J]. Biogerontology, 2010, 11(2): 183-195.
- [10] Andreou AM, Tavernarakis N. Protein metabolism and homeostasis in aging. Preface[J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 694: vii-viii.
- [11] Hsin H, Kenyon C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*[J]. Nature, 1999, 399(6734): 362-366.
- [12] Kenyon C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants[J]. Cell, 2005, 120(4): 449-460.
- [13] Copeland JM, Cho J, Lo T Jr, et al. Extension of *Drosophila* life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain[J]. Curr Biol, 2009, 19(19): 1591-1598.
- [14] Pan KZ, Palter JE, Rogers AN, et al. Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*[J]. Aging Cell, 2007, 6(1): 111-119.
- [15] Grummt I, Pikaard CS. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(8): 641-649.
- [16] da Silva AM, Payão SL, Borsatto B, et al. Quantitative evaluation of the rRNA in Alzheimer's disease[J]. Mech Ageing Dev, 2000, 120(1-3): 57-64.
- [17] Payão SL, Smith MA, Winter LM, et al. Ribosomal RNA in Alzheimer's disease and aging[J]. Mech Ageing Dev, 1998, 105(3): 265-272.
- [18] Houtkooper RH, Mouchiroud L, Ryu D, et al. Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism[J]. Nature, 2013, 497(7450): 451-457.
- [19] Essers PB, Nonnekens J, Goos YJ, et al. A long noncoding RNA on the ribosome is required for lifespan extension[J]. Cell Rep, 2015. [Epub ahead of print]
- [20] Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, et al. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*[J]. Nature, 2003, 426(6967): 620.
- [21] Saka Y, Esashi F, Matsusaka T, et al. Damage and replication checkpoint control in fission yeast is ensured by interactions of Crb2, a protein with BRCT motif, with Cut5 and Chk1[J]. Genes Dev, 1997, 11(24): 3387-3400.
- [22] Giaever G, Chu AM, Ni L, et al. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(8): 4569-4574.
- [23] Killian DJ, Hubbard EJ. *C. elegans* pro-1 activity is required for soma/germline interactions that influence proliferation and differentiation in the germ line[J]. Development, 2004, 131(6): 1267-1278.
- [24] Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, et al. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(12): 4494-4499.
- [25] Mukhopadhyay A, Oh SW, Tissenbaum HA. Worming pathways to and from DAF-16/FOXO[J]. Exp Gerontol, 2006, 41(10): 928-934.
- [26] Murphy CT. The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries[J]. Exp Gerontol, 2006, 41(10): 910-921.
- [27] Pinkston JM, Garigan D, Hansen M, et al. Mutations that increase the life span of *C. elegans* inhibit tumor growth[J]. Science, 2006, 313(5789): 971-975.
- [28] Zhang J, Lu L, Zhou L. Oleonic acid activates daf-16 to increase lifespan in *Caenorhabditis elegans*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 468(4): 843-849.
- [29] Croll NA, Smith JM, Zuckerman BM. The aging process of the nematode *Caenorhabditis elegans* in bacterial and axenic culture[J]. Exp Aging Res, 1977, 3(3): 175-189.
- [30] Hill AA, Hunter CP, Tsung BT, et al. Genomic analysis of gene expression in *C. elegans*[J]. Science, 2000, 290(5492): 809-812.
- [31] Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2003, 424(6946): 277-283.
- [32] Tullet JM. DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future[J]. Biogerontology, 2015, 16(2): 221-234.
- [33] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [34] Ching TT, Chiang WC, Chen CS, et al. Celecoxib extends *C. elegans* lifespan via inhibition of insulin-like signaling but not cyclooxygenase-2 activity[J]. Aging Cell, 2011, 10(3): 506-519.

(下转第 1424 页)



77%)。由此推测, CUL3 $\Delta 9$ 很可能是由于缺少上述必要的区域导致与 CSN 结合受阻, 无法正常去类泛素化修饰而导致其类泛素化修饰增加。但 CUL3 $\Delta 9$ 所缺少的 9 号外显子是否是 CSN 的结合部位, 需要通过构建包含 CUL3 各种片段的真核表达载体并利用免疫共沉淀的方法探索其与 CSN 的结合强弱进一步验证。

综上所述, CUL3 致病突变体 CUL3 $\Delta 9$ 类泛素化修饰异常的原因可能是其与 CSN 结合减弱, 使得 CSN 无法正常对 CUL3 $\Delta 9$ 进行去类泛素化修饰。结合之前的

研究结果, 我们对 CUL3 致病突变体 CUL3 $\Delta 9$ 导致 FHHt 的发病机制提出一个新的观点: 由于 CUL3 $\Delta 9$ 与 CSN 的结合减弱, 导致其无法正常去类泛素化修饰, 故其类泛素化修饰处于高水平, 使得 KLHL3 被过度降解而导致底物 WNK 积累, 通过 SPAK/OSR1 途径激活 NCC 导致 FHHt。由于种种原因限制, 本研究仅局限于体外研究, 如能构建 CUL3-FHHt 小鼠模型, 可以对该机制进行进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Pathare G, Hoenderop JG, Bindels RJ, et al. A molecular update on pseudohypoaldosteronism type II [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(11): F1513 – F1520.
- [2] Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases[J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1107 – 1112.
- [3] Boyden LM, Choi M, Choate KA, et al. Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities[J]. *Nature*, 2012, 482(7383): 98 – 102.
- [4] McCormick JA, Yang CL, Zhang C, et al. Hyperkalemic hypertension-associated cullin 3 promotes WNK signaling by degrading KLHL3[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(11): 4723 – 4736.
- [5] Enchev RI, Schulman BA, Peter M. Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(1): 30 – 44.
- [6] Zhang C, Meermeier NP, Terker AS, et al. Degradation by Cullin 3 and effect on WNK kinases suggest a role of KLHL2 in the pathogenesis of familial hyperkalemic hypertension[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(1): 44 – 48.
- [7] Vidal-Petiot E, Elvira-Matlot E, Mutig K, et al. WNK1-related familial hyperkalemic hypertension results from an increased expression of L-WNK1 specifically in the distal nephron[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(35): 14366 – 14371.
- [8] Chavez-Canales M, Zhang C, Soukaseum C, et al. WNK-SPAK-NCC cascade revisited: WNK1 stimulates the activity of the Na-Cl cotransporter *via* SPAK, an effect antagonized by WNK4[J]. *Hypertension*, 2014, 64(5): 1047 – 1053.
- [9] Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, et al. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension[J]. *Cell Rep*, 2013, 3(3): 858 – 868.
- [10] Susa K, Sohara E, Rai T, et al. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(19): 5052 – 5060.
- [11] Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(1): 9 – 20.
- [12] Lai F, Orelli BJ, Till BG, et al. Molecular characterization of KLHL3, a human homologue of the *Drosophila kelch* gene[J]. *Genomics*, 2000, 66(1): 65 – 75.
- [13] Ohta A, Schumacher FR, Mehellou Y, et al. The CUL3-KLHL3 E3 ligase complex mutated in Gordon's hypertension syndrome interacts with and ubiquitylates WNK isoforms; disease-causing mutations in KLHL3 and WNK4 disrupt interaction[J]. *Biochem J*, 2013, 451(1): 111 – 122.
- [14] Shibata S, Zhang J, Puthumana J, et al. Kelch-like 3 and Cullin 3 regulate electrolyte homeostasis *via* ubiquitination and degradation of WNK4[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(19): 7838 – 7843.
- [15] Pintard L, Kurz T, Glaser S, et al. Neddylation and deneddylation of CUL-3 is required to target MEI-1/Katanin for degradation at the meiosis-to-mitosis transition in *C. elegans*[J]. *Curr Biol*, 2003, 13(11): 911 – 921.
- [16] Duda DM, Borg LA, Scott DC, et al. Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation[J]. *Cell*, 2008, 134(6): 995 – 1006.
- [17] Lyapina S, Cope G, Shevchenko A, et al. Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome[J]. *Science*, 2001, 292(5520): 1382 – 1385.
- [18] Cope GA, Suh GS, Aravind L, et al. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1[J]. *Science*, 2002, 298(5593): 608 – 611.
- [19] Wei N, Chamovitz DA, Deng XW. Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development[J]. *Cell*, 1994, 78(1): 117 – 124.
- [20] Wei N, Deng XW. The COP9 signalosome[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 261 – 286.
- [21] Sharon M, Mao H, Boeri Erba E, et al. Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality[J]. *Structure*, 2009, 17(1): 31 – 40.
- [22] Echaliier A, Pan Y, Birol M, et al. Insights into the regulation of the human COP9 signalosome catalytic subunit, CSN5/Jab1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(4): 1273 – 1278.
- [23] Min KW, Kwon MJ, Park HS, et al. CAND1 enhances deneddylation of CUL1 by COP9 signalosome[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(3): 867 – 874.

[收稿日期] 2016-03-15

[本文编辑] 吴 洋

(上接第 1419 页)

- [37] Syntichaki P, Troulinaki K, Tavernarakis N. eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 922 – 926.
- [38] Flachsart F, Caliebe A, Kleindorp R, et al. Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(8): 2700 – 2705.
- [39] Li Y, Wang WJ, Cao H, et al. Genetic association of FOXO1A and FOXO3A

with longevity trait in Han Chinese populations[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(24): 4897 – 4904.

- [40] Wilcox BJ, Donlon TA, He Q, et al. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(37): 13987 – 13992.
- [41] Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals[J]. *Science*, 2003, 299(5611): 1346 – 1351.

[收稿日期] 2016-04-05

[本文编辑] 瞿麟平

