

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.01083

斑马鱼窖蛋白-1 基因 cDNA 克隆及功能初步研究

王璐 莫赛军 厉洁 李青 崔宗斌

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 窖蛋白-1(Cav-1)是胞膜窖的主要结构蛋白,可与多种信号分子相互作用,调节细胞的增殖、分化和凋亡,其异常表达与多种人体疾病的发生和发展密切相关,而在斑马鱼发育中的功能尚不很清楚。研究克隆出斑马鱼窖蛋白-1 基因两个亚型的全长 cDNA,与其他物种窖蛋白-1 的氨基酸序列进行比较,发现该蛋白在脊椎动物中非常保守。利用逆转录多聚酶链反应检测发现,在斑马鱼多个成年组织中窖蛋白-1 的两个亚型均有转录表达。利用胚胎整体原位杂交检测组织或器官特异基因的时空表达变化发现,过表达或利用 Morpholino 反义寡聚核苷酸(MO)抑制 *cav-1α* 的表达可影响脊索和体节的发育,而过表达或 MO 抑制 *cav-1β* 可导致肝脏发育的异常;此外,过表达或 MO 抑制 *cav-1α* 或 *-1β* 均可影响斑马鱼神经系统的发育。因此,斑马鱼 Cav-1 在维持组织器官的生理功能和调控胚胎的正常发育中起着重要作用。

关键词: 窖蛋白-1; 脊索; 体节; 肝脏; 神经发育

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)06-1083-08

胞膜窖是细胞膜上的特异内陷微区^[1],直径约 50—100 nm。20 世纪 50 年代被发现后,胞膜窖引起了研究者的广泛关注,但直到窖蛋白的发现,对其功能的研究才深入开展起来。窖蛋白是位于胞膜窖细胞质一侧的膜整合蛋白,分子量为 21—25 kD^[2]。窖蛋白家族成员包括:窖蛋白-1(Caveolin-1, Cav-1)、窖蛋白-2(Caveolin-2, Cav-2)和窖蛋白-3(Caveolin-3, Cav-3);其中, Cav-1 和 Cav-2 具有不同的亚型^[3]。Cav-1 的分子量为 22 kD,分为 α 和 β 两个亚型,是胞膜窖的标志性膜蛋白^[4]。

研究发现, Cav-1 可调控细胞内的信号传导、物质转运、胆固醇和脂类平衡,因而参与细胞增殖、分化、凋亡、细胞周期的调控等。因此, Cav-1 表达异常与多种疾病的发生和发展密切相关。例如, Cav-1 可参与肿瘤细胞侵蚀与转移作用,并与多药耐药作用密切相关^[5]。近年来的研究表明,敲除 *cav-1* 基因的小鼠能够成活和繁殖后代^[6];而抑制 *cav-1* 基因的表达导致斑马鱼胚胎死亡,表现为 12hpf 胚胎的胞膜窖缺失,眼、体节、侧线神经丘等

的严重发育缺陷等。此外, Cav-1 α 和 Cav-1 β 在斑马鱼发育中发挥了不同的作用,这种不同是由 Cav-1 α 的第 14 位酪氨酸磷酸化位点决定的^[7,8]。这些结果显示, Cav-1 可能在脊椎动物发育过程中发挥着重要作用。

目前,国内外重点研究 Cav-1 在肿瘤等疾病发生和发展中的作用,对其在胚胎发育中的作用知之甚少,利用斑马鱼这一理想的发育和遗传研究模型,可系统地分析 *cav-1* 基因的结构进化及其生物学功能^[8]。为此,本文克隆了斑马鱼 *cav-1* 的全长 cDNA,对其组织特异性表达和在斑马鱼胚胎发育中的作用进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 PCR 扩增 *cav-1α* 和 *cav-1β* 的全长 cDNA

依据 NCBI 数据库斑马鱼 *cav-1* cDNA 的预测序列,设计两对 PCR 引物, *cav1α*UF1/*cav1R* 和 *cav1β*UF1/*cav1R*,分别扩增 *cav-1α* 和 *cav-1β* 的全长 cDNA,扩增片段连接在 pEGM-T 载体中,命名为 pEGM-T/*cav-1α* 和 pEGM-T/*cav-1β*,然后进行测序。

收稿日期: 2009-08-14; 修订日期: 2010-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671602 和 30871442)资助

作者简介: 王璐(1982—),女,河南南阳人;硕士研究生;主要研究方向为遗传学。E-mail: wanglu1101@126.com

通讯作者: 崔宗斌, E-mail: zbcui@ihb.ac.cn

1.2 RT-PCR

提取成体斑马鱼的精巢、卵巢、肝脏、肠道、肾脏、心脏、鳃、脾脏和肌肉组织的总 RNA, 用 T18 引物合成 cDNA, 再以此 cDNA 为模板, 设计两对特异性引物 *cav1 α* UF1/*cav1 α* UR1 和 *cav1 β* UF1/*cav1 β* UR1, 进行半定量 RT-PCR 分析 *cav-1 α* 和 *cav-1 β* 在上述组织中的表达。

1.3 *cav-1 α* 和 *cav-1 β* 的突变体和超表达载体的构建

分别以 pEGM-T/*cav-1 α* 或 pEGM-T/*cav-1 β* 为模板, 以 *C α -sb-F/C-sb-R* 或 *C β -sb-F/C-sb-R* 为引物, 扩增得到 *cav-1 α* 或 *cav-1 β* 的编码区, *Kpn* 和 *EcoR* 双酶切后, 克隆到 pSBRNAX 载体的相应酶切位点上, 获得超表达载体 pSBRNAX/*cav-1 α* 和 pSBRNAX/*cav-1 β* 。

cav-1 α 基因的 N 端包含两个 ATG, 过表达 *cav-1 α* 时有可能从第二个 ATG 开始翻译, 产生 *cav-1 β* 。为了避免过表达 *cav-1 α* 时第二个 ATG 的干扰, 我们以 pSBRNAX/*cav-1 α* 为模板, 设计突变引物 *Cav1 α -A100T-F* 和 *Cav1 α -A100T-R*, 将第二个 ATG 编码的蛋氨酸突变为 TTG 编码的亮氨酸。

Cav-1 α 的 Y14 (TAC) 发生突变, 对于该基因的功能影响很大甚至导致该基因功能的缺失^[7,9,10]。为了研究 Y14 突变是否影响斑马鱼 *Cav-1 α* 的功能, 以 pSBRNAX/*cav-1 α* 为模板, 设计引物 *Cav1 α -Y14F/C-sb-R* 进行第一次 PCR 扩增并引入突变位点, 然后以该 PCR 产物作为模板, *C α -sb-F/C-sb-R* 为引物进行第二次 PCR, PCR 产物采用 *KpnI* 和 *EcoRI* 酶切后, 克隆到 pSBRNAX 载体中, 转化鉴定后进行测序分析得到的突变体命名为 pSBRNAX/*cav-1 α* (Y14F)。用 *BamH* 酶切显性化转录用载体, 用 Ambion 公司的转录 capped mRNA 试剂盒进行转录。实验用 PCR 引物名称和序列(表 1)。

1.4 *cav-1 α* 和 *cav-1 β* 特异 MO 的设计及抑制效率分析

对 *cav-1 α* 和 *cav-1 β* 进行序列分析, 若要分别抑制二者的表达, 需采用在翻译水平上进行封闭。将 *cav-1 α* 的 5'UTR 序列+翻译起始位点 ATG 之后的一段序列以及 *cav-1 β* 的 5'UTR 提交至 www.genetools.com, 进行 Morpholino(MO)反义寡聚核苷酸的设计和合成。

根据 MO 反义寡聚核苷酸序列, 设计引物将

MO 的靶序列克隆入 pEGFP-F 载体中 EGFP 阅读框的 N 端, 得到载体 pEGFP/MO-1 α 和 pEGFP/MO-1 β ; 分别将获得载体以及载体与 MO 的混合物注射到斑马鱼胚胎中, 统计 EGFP 的胚胎数, 测定 MO 抑制 *cav-1* 基因表达的效率。

表 1 实验用引物名称及其序列
Tab. 1 Names and sequences of primers used

引物名称 Names of primers	引物序列(5'-3') Sequences of primers
<i>Cav1α</i> UF1	act ctg tgc cgt gag agt ctt caa g
<i>Cav1α</i> UR1	ctt cag gtg tcc cgt cct tgt atc
<i>Cav1β</i> UF1	agg gct gtg ctg agt tgc
<i>Cav1β</i> UR1	gcg gtt cca aag aaa aca g
<i>Cav1R</i>	tta cac aca ctt agt agc agt gac c
<i>Cα-sb-F</i>	gtc ccg gta ccg cca cca tga cta gcg gat aca ag
<i>C-sb-R</i>	cgc gaa ttc tta cac cac ctt agt agc agt gac
<i>Cβ-sb-F</i>	gtc ccg gta ccg cca cca tgg ata acg aca gca tca ac
<i>Cav1α-Y14F</i>	atg act agc gga tac aag gac ggg aca cct gaa gag gaa ttc gct cac tc
<i>Cav1α-A100T-F</i>	caa acc aaa caa taa aga att gga taa cga c
<i>Cav1α-A100T-R</i>	tct tta ttg ttt ggt ttg taa atg ttc ccc

1.5 显微注射

利用刚受精的鱼卵进行显微注射。mRNA 的注射浓度为 100 ng/ μ L, 注射体积约为 2 nL。MO 的注射浓度为 5 μ g/ μ L, 注射体积约为 2 nL。将注射好的胚胎置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中, 实时观察胚胎的表型变化、拍照并在适当时间收集胚胎。

1.6 整体原位杂交

收集并固定相应时期的胚胎, 按照 Thisse, *et al.*^[11,12]的方法进行杂交, 用 BCIP/NBT 染色液染色, 显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 斑马鱼 *cav-1 α* 和 *cav-1 β* 的进化分析

Cav-1 分布广泛, 从低等动物的果蝇到高等哺乳动物的人类, 均检测到了 *Cav-1* 的存在^[8,13,14]。与人和小鼠的 *Cav-1* 非常相似, 斑马鱼 *Cav-1* 亦包括 *Cav-1 α* 和 *Cav-1 β* 两个异构体, 二者均具有 N 末端区域、脚手架结构域和 C 末端区域。*Cav-1 α* 在 N 末端长出 33 个氨基酸, 而其余氨基酸序列与 *Cav-1 β* 的完全一致(图 1)。哺乳动物的 *Cav-1 α* 和 *Cav-1 β* 分别包括 178 和 147 个氨基酸残基; 爪蟾 *Cav-1* 为 180 个氨基酸残基; 斑马鱼 *Cav-1 α* 和 *Cav-1 β* 分别由 181 和 148 个氨基酸残基组成; 鲎类 *Cav-1* 为 181 个

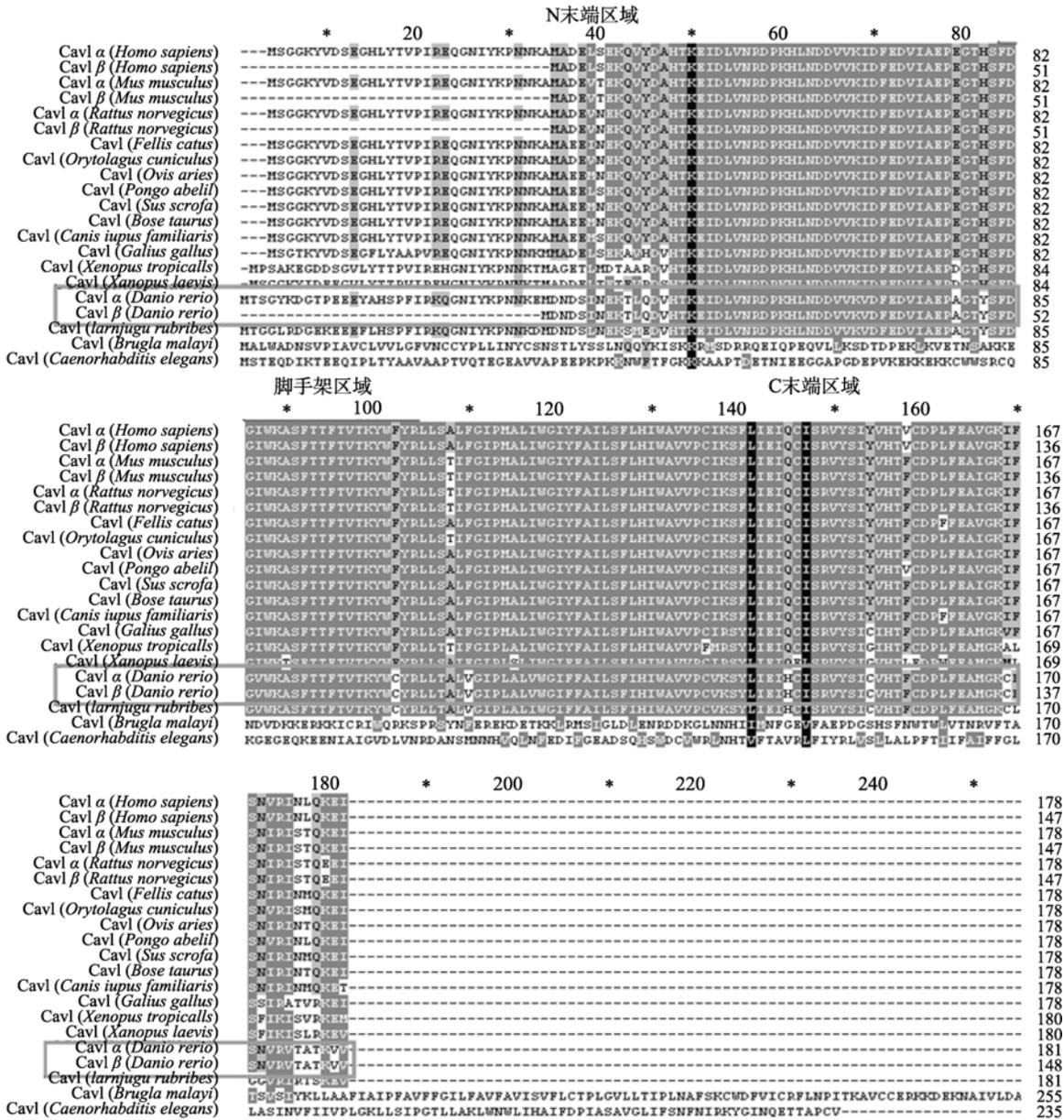


图 1 Caveolin-1 的氨基酸序列比对结果

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of Caveolin-1s

一致的 AA 用黑底白字表示, 相似的 AA 用灰底白字 AA 表示, 间隙用破折号“-”表示, 斑马鱼 Cav-1 α 和 Cav-1 β 用方框标记。物种的 GenBank 登录号分别为: 人 Cav-1 α 和 Cav-1 β 分别为 NP_001744 和 ABW22626; 小鼠 Cav-1 α 和 Cav-1 β 分别为 AAR16290 和 BAA89462; 大鼠 Cav-1 α 和 Cav-1 β 分别为 NP_113744 和 NP_598412; 猫, NP_001019334; 兔, NP_001104542; 绵羊, NP_001009477; 猩猩, ABC87459; 猪, AAR16300; 牛, NP_776429; 狗, NP_001003296; 鸡, AAR16266; 爪蟾, AAH70672; 斑马鱼 Cav-1 α 和 Cav-1 β 分别为 NM_212651 和 NM_001024162; 红鳍东方鲀, AAL40364; 马来丝虫, XP_001898703; 线虫, NP_501743

Identical amino acids are shown in black color and similar amino acids are presented in gray color; gaps in the sequences are indicated by dashes; zebrafish Cav-1 α and Cav-1 β marked with pane. The GenBank numbers include *Homo sapiens* (NP_001744 for Cav-1 α and ABW22626 for Cav-1 β), *Mus musculus* (AAR16290 for Cav-1 α and BAA89462 for Cav-1 β); *Rattus norvegicus* (NP_113744 for Cav-1 α and NP_598412 for Cav-1 β); *Fellis catus* (NP_001019334); *Orytolagus cuniculus* (NP_001104542); *Ovis aries* (NP_001009477); *Pongo abelii* (ABC87459); *Sus scrofa*, (AAR16300); *Bos Taurus* (NP_776429); *Canis lupus familiaris* (NP_001003296); *Gallus gallus*, (AAR16266); *Xenopus tropicalis* (AAH89686); *Xenopus laevis* (AAH70672); *Danio rerio* (NM_212651 for Cav-1 α and NM_001024162 for Cav-1 β); *Takifugu rubripes* (AAL40364); *Brugla malayi* (XP_001898703); *Caenorhabditis elegans* (NP_501743)

氨基酸残基。对不同来源的 Cav-1 进行氨基酸组成相似度分析发现, 哺乳动物之间的相似度为

77.9%—99.4%, 鱼类之间为 68.0%—81.8%, 鱼和哺乳动物为 63%—81.2%, 人和爪蟾为 64.6%—65.7%,

鱼和爪蟾为 59.7%—69.6%，鸟类与鱼类为 65% 左右，线虫类与脊椎动物的相似度很低，为 7.7% 以下。斑马鱼 *Cav-1 α* 与人和小鼠的相似度分别为 64.1% 和 63%，斑马鱼 *Cav-1 β* 与人和小鼠的相似度分别为 81.2% 和 80.1%。上述分析结果表明，脊椎动物的 *Cav-1* 在重要功能结构域、氨基酸残基数目和组成方面具有高度保守性。

对人、小鼠和斑马鱼的 *cav-1* 基因结构进行比较发现，三者的 *cav-1 α* 均包含 3 个外显子和 2 个内

含子，而其 *cav-1 β* 均包含 2 个外显子和 1 个内含子；它们对应的内含子和外显子边界序列高度保守。此外，斑马鱼的 *cav-1* 基因位于第 25 号染色体的同一座位，系由不同启动子驱动的不同转录本编码。

对上述物种的 *Cav-1* 氨基酸序列进行聚类分析发现(图 2)，人、鼠、猫、狗、猪、牛等哺乳动物聚为一类，红鳍东方鲀和斑马鱼聚为一支，马来丝虫和秀丽小杆线虫聚为一类，表明 *Cav-1* 氨基酸序列可作为系统进化分析的指标之一。

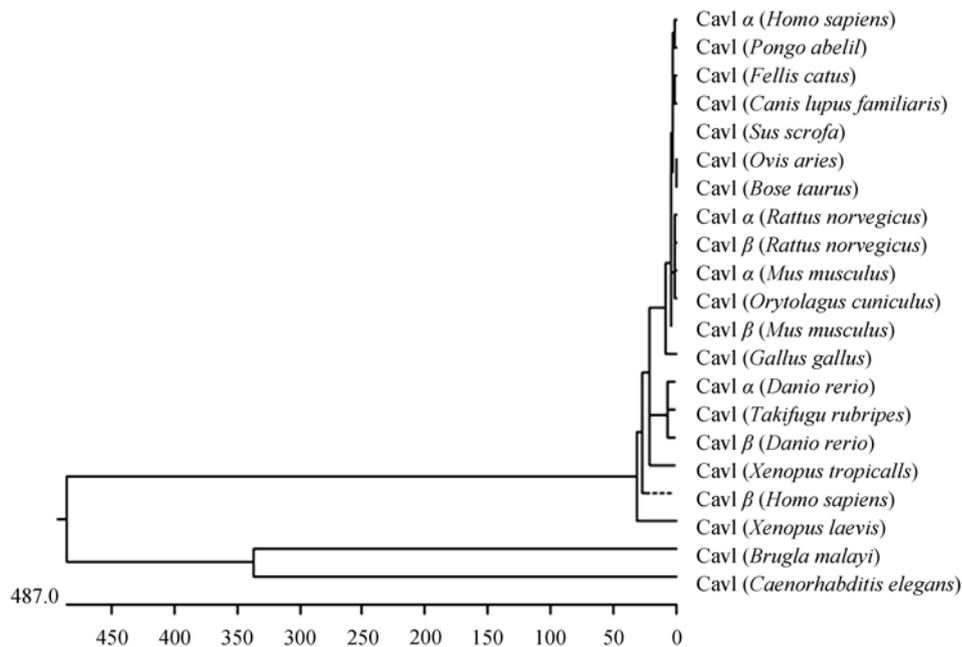


图 2 Caveolin-1 氨基酸序列的聚类分析结果

Fig. 2 Clustal analysis of the amino acid sequences for Caveolin-1s

2.2 *cav-1 α* 和 *cav-1 β* 在成体斑马鱼中的表达分析

半定量 RT-PCR 扩增 *cav-1 α* 和 *cav-1 β* mRNA 片段的长度分别为 209 bp 和 587 bp, *cav-1 α* 和 *cav-1 β* mRNA 在精巢、卵巢、肝脏、肠道、肾脏、心脏、鳃、脾脏和肌肉等组织中均有表达(图 3), 是一个泛组织表达的基因。另外, *cav-1 α* 和 *cav-1 β* 在各个组织中的表达情况不同, 例如在心脏和鳃中, *cav-1 β* 的表达量较多, 而在卵巢和精巢中, *cav-1 α* 的表达量较多。该实验以 β -actin mRNA 的半定量 RT-PCR 结果作为对照。

2.3 反义 Morpholino 寡核苷酸抑制 *cav-1* 基因表达的效率

将质粒 pEGFP/MO-1 α 、pEGFP/MO-1 β 以及它们与 *cav-1 α* 或 *cav-1 β* MO 的混合物分别注射到斑马鱼 1-细胞期胚胎中, 24hpf 后在荧光显微镜下对胚胎

进行拍照分析。在胚胎总数相同的情况下, 仅注射

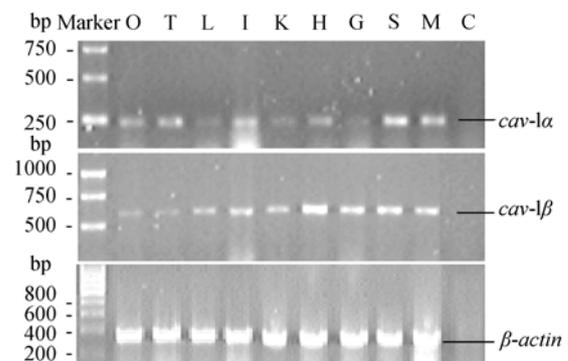


图 3 *cav-1 α* 和 *cav-1 β* 的组织表达模式

Fig. 3 Expression pattern of *cav-1 α* and *cav-1 β* in tissues
O. 卵巢; T. 精巢; L. 肝脏; I. 肠道; K. 肾脏; H. 心脏; G. 鳃; S. 脾脏; M. 肌肉; C. 对照
O. ovary; T. testis; L. liver; I. intestine; K. kidney; H. heart; G. gill; S. spleen; M. muscle; C. control

pEGFP/MO-1 α 和 pEGFP/MO-1 β 的胚胎在荧光数目和荧光亮度上都远远小于注射 *cav-1 α* MO 和 pEGFP/MO-1 α 混合物以及 *cav-1 β* MO 和 pEGFP/MO-1 β 的胚胎数目, 表明我们设计的反义 MO 能够特异地抑制 *cav-1 α* 和 *cav-1 β* 的表达(图 4)。

2.4 Cav-1 影响脊索的发育

我们用脊索标记基因检测 Cav-1 对早期脊索发育的影响。 *ntl* 是一个脊索和尾部形成的必需因子^[15,16], 过表达或敲低 *cav-1 α* , *ntl* 在 12hpf 胚胎中表达模式变得比较混乱, 而过表达或敲低 *cav-1 β* , 对 *ntl* 的表达没有显著影响。另外, 在过表达 *cav-1 α* (Y14F) 的胚胎中, *ntl* 的表达趋于正常(图 5)。 *myod1* 是一个主要在脊索及其临近的体节细胞中表达的基因^[17]。我们的研究结果显示, 过表达 *cav-1 α* , 胚胎的脊索明显变短, 体节也不能正常形成, 在 MO 抑制 *cav-1 α* 表达的斑马鱼胚胎中, 胚胎的体节加粗, 而过表达或敲低 *cav-1 β* , 对 *myod1* 的表达没有显著影响。此外, 在过表达 *cav-1 α* (Y14F) 的胚胎中, *myod1* 的表达趋于正常(图 5)。结果显示, Cav-1 α 在

脊索发育调控中起重要作用。

2.5 Cav-1 与神经系统发育

我们用神经发育相关的标记基因检测 Cav-1 对早期神经系统发育的影响。 *krox20* 是一个主要在后脑, 神经板表达的标记基因^[18], 在过表达和敲低 *cav-1* 的胚胎中, *krox20* 的分布区域均扩大(图 6)。 *foxd3* 是一个在神经嵴表达的标记基因^[19], 在过表达 *cav-1* 的胚胎中, 其表达区域缩短, 而敲低 *cav-1* 的胚胎中, 其表达区域加长(图 6)。

2.6 Cav-1 与肝脏发育

我们采用斑马鱼肝脏各发育时期表达的分子标记为探针, 检测 *cav-1 α* 和 *cav-1 β* 表达对肝脏发育的影响。 *prox1* 大约在 24hpf 表达, 此阶段正是肝芽形成期^[20]; *cp* 是一个肝脏特异表达的基因, 可以用来检测斑马鱼肝细胞和肝脏的发育^[21]。

WISH 结果显示, 胚胎发育到 36hpf, 除超表达 *cav-1 α* 的胚胎外, 其余胚胎的 *prox1* 表达水平明显降低; 到 48hpf, 除超表达 *cav-1 α* 的胚胎 *cp* 的表达水平正常, 其余胚胎检测不到 *cp* 阳性信号(图 7)。

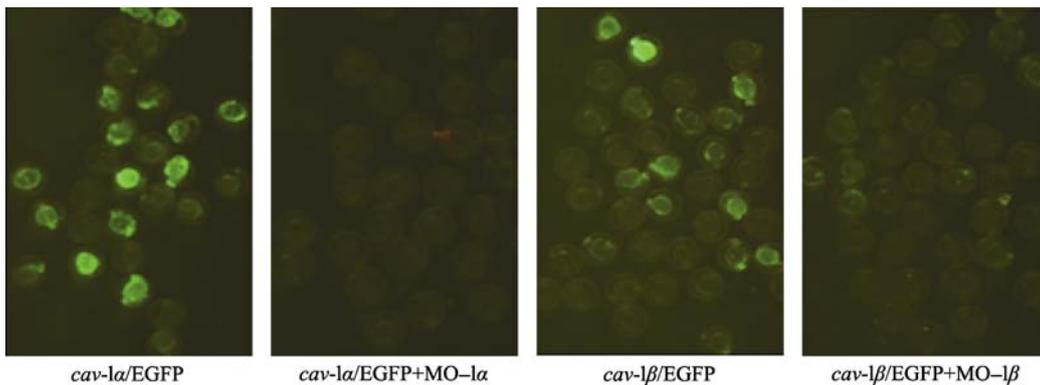


图 4 *cav-1 α* 或 *cav-1 β* MO 的抑制效率
Fig. 4 Efficiency of *cav-1* knockdown by MOs

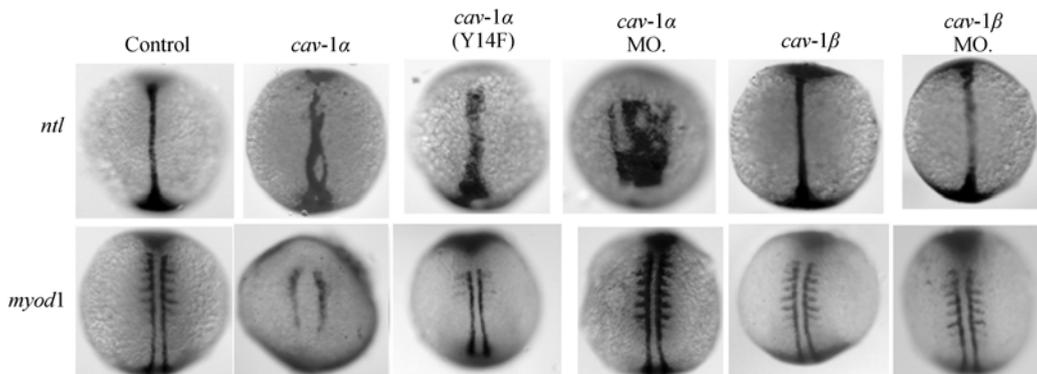


图 5 *cav-1 α* , *cav-1 α* (Y14F) 或 *cav-1 β* 对 *ntl* 和 *myod1* 表达的影响
Fig. 5 *cav-1 α* , *cav-1 α* (Y14F) or *cav-1 β* on expression of *ntl* and *myod1*
均为 12 hpf 背面观胚胎

Dorsal views of embryos at 12 hpf

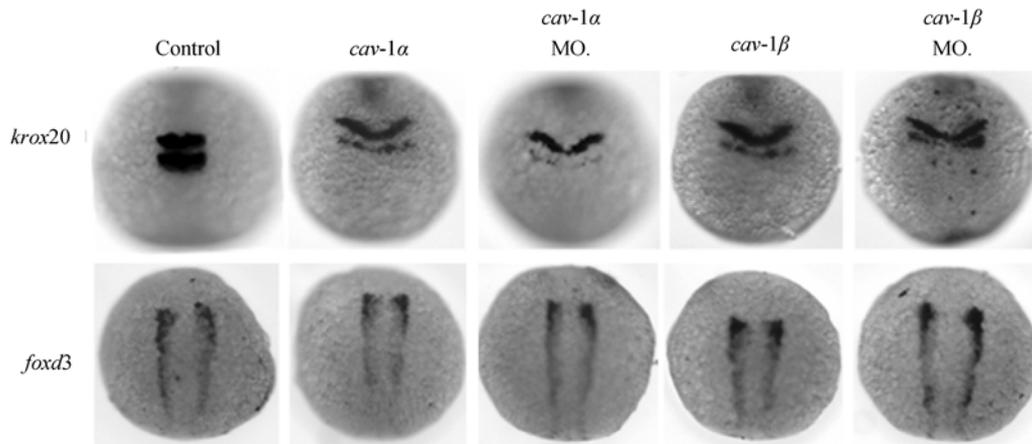


图 6 *cav-1α* 和 *cav-1β* 对 *krox20* 和 *foxd3* 表达的影响
Fig. 6 *cav-1α* and *cav-1β* on expression of *krox20* and *foxd3*
均为 12 hpf 背面观胚胎

Dorsal views of embryos at 12 hpf

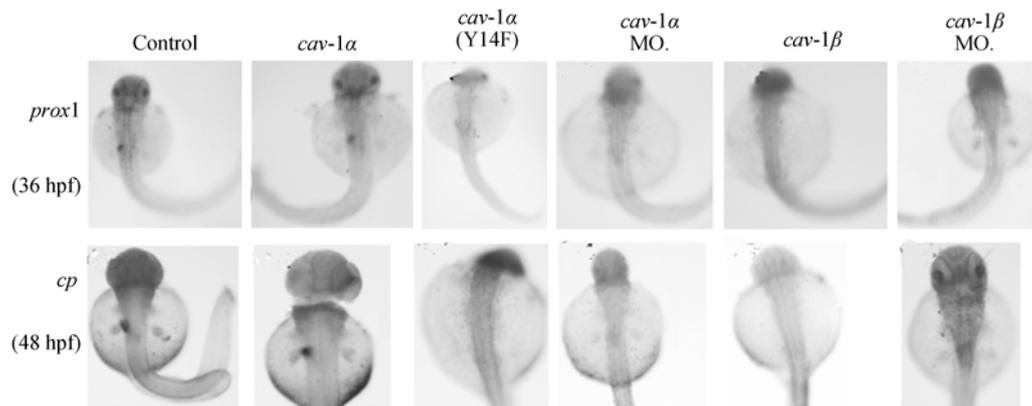


图 7 *cav-1α* 和 *cav-1β* 表达对斑马鱼肝脏发育的影响
Fig. 7 Effects of *cav-1α* and *cav-1β* expression on zebrafish liver development

3 讨论

脊椎动物的 *cav-1* 基因结构和氨基酸序列高度保守, 其跨膜区域和脚手架区域的序列平均相似度在 95% 以上, 表明进化过程中 Cav-1 具有重要的生物学功能。

研究表明, *cav-1* 基因的两个转录本在脊椎动物胚胎发育过程中具有明显的时空表达差异和细胞特异性^[7]。我们对斑马鱼 *cav-1* 在成体各组织中的表达情况进行分析, 发现二者在多个组织中均有表达, 表达量有显著的组织差异; 例如, *cav-1α* 在生殖器官中表达较多, 而 *cav-1β* 在内脏器官中表达量最高。这些结果显示, Cav-1 在斑马鱼胚胎和成年组织中具有重要功能。

Cav-1α 的 Y14 是一个重要的酪氨酸激酶磷酸化

位点, 该位点在 Cav-1 蛋白质中非常保守, 其突变往往导致 Cav-1α 功能的丧失^[9,10]。Fang, *et al.* 的研究表明, Cav-1α 的 Y14 对于斑马鱼胚胎的早期发育是必需的^[7]。我们发现, 在斑马鱼早期的胚胎中, 过表达或敲低 Cav-1α 可导致脊索发育相关基因表达的显著变化, Cav-1α 的第 14 位酪氨酸磷酸化位点突变后, 这些基因的表达趋于正常; 而过表达或敲低 Cav-1β 未显著改变脊索发育相关基因的表达图示, 说明第 14 位酪氨酸磷酸化位点是 *cav-1α* 影响脊索发育所必需的, 尚须深入研究其作用的分子机制。此外, 本研究发现在早期胚胎中过表达或敲低 *cav-1α* 和 *cav-1β*, 均导致后脑标记基因 *krox20* 和 *foxd3* 表达图示的改变, 表明 Cav-1α 和 *cav-1β* 均可影响神经系统的发育, 并可能通过其 C 末端的同一功能结构域起作用。

脊椎动物肝脏的起源于原肠期形成的内胚层, 内胚层细胞的增殖特化形成肠管, 在 4—8 体节期, 腹侧前肠内胚层的特化逐渐形成肝芽; 此后, 分化的肝表皮细胞与间质相互作用, 刺激细胞继续增殖并分化为肝特异性细胞, 最后发育成为成熟的肝脏^[22]。肝组织的发生和形成是一个非常复杂的过程, 受多种因子和信号通路的调控^[23]。Cav-1 和胞膜窖存在于小鼠肝实质组织中, 而且在部分切除的肝中, Cav-1 与脂质滴的形成有关^[24]。我们的研究表明, Cav-1 的两个异构体, 尤其是 Cav-1 β 可显著影响斑马鱼肝脏的形成; 由于在 36hpf 和 48hpf 时, Cav-1 过表达或敲低均抑制肝特异标记基因 *prox1* 和 *cp* 的表达, 推测 Cav-1 的影响可能发生在肝芽形成之前, 其作用的分子机制尚待深入研究。

总之, Cav-1 是调控斑马鱼正常发育和组织器官生理功能的一个重要蛋白, 对其分子调控机制的研究将揭示 Cav-1 表达异常与肿瘤等重大疾病发生和发展的密切关系。

参考文献:

- [1] Smart E J, Graf G A, McNiven M A, *et al.* Caveolins, liquid-ordered domains and signal transduction [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, **19**: 7289—7304
- [2] Li W P, Liu P, Pilcher B K, *et al.* Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria [J]. *Journal of Cell Science*, 2001, **114**: 1397—1408
- [3] Schlegel A, Lisanti M P. The caveolin triad: caveolae biogenesis, cholesterol trafficking, and signal transduction [J]. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2001, **12**: 41—51
- [4] Scherer P E, Tang Z, Chun M, *et al.* Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution: identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**: 16395—16401
- [5] Cohen A W, Hnasko R, Schubert W, *et al.* Role of caveolae and caveolins in health and disease [J]. *Physiological Reviews*, 2004, **84**: 1341—1379
- [6] Drab M, Verkade P, Elger M, *et al.* Loss of caveolae, vascular dysfunction and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice [J]. *Science*, 2001, **293**: 2449—2452
- [7] Fang P K, Solomon K R, Zhuang L, *et al.* Caveolin-1 α and -1 β perform nonredundant roles in early vertebrate development [J]. *American Journal of Pathology*, 2006, **169**: 2209—2222
- [8] Frank P G, Lisanti M P. Zebrafish as a novel model system to study the function of caveolae and caveolin-1 in organismal biology [J]. *American Journal of Pathology*, 2006, **169**: 1910—1912
- [9] Li S, Seitz R, Lisanti M P. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**: 3863—3868
- [10] Minshall R D, Sessa W C, Stan R V, *et al.* Caveolin regulation of endothelial function [J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2003, **285**: L1179—L1183
- [11] Thisse C, Thisse B. High resolution whole-mount in situ hybridization [M]. Zebrafish Science Monitor, Eugene: University of Oregon Press. 1998, 5
- [12] Yin Y, Zhou L, Liu J, *et al.* Temporal and spatial expression pattern of gibel carp *pou2* gene during embryogenesis [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(5): 629—636 [尹隽, 周莉, 刘军, 等. 银鲫 *pou2* 基因在胚胎发育过程中的时空表达图式. 水生生物学报, 2007, **31**(5): 629—636]
- [13] Tang Z, Okamoto T, Boontrakulpoontawe P, *et al.* Identification, sequence, and expression of an invertebrate caveolin gene family from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Implications for the molecular evolution of mammalian caveolin genes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**: 2437—2445
- [14] Spisni E, Tomasi V, Cestaro A, *et al.* Structural insights into the function of human caveolin 1 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, **338**: 1383—1390
- [15] Halpern M E, Ho R K, Walker C, *et al.* Induction of muscle pioneers and floor plate is distinguished by the zebrafish *no tail* mutation [J]. *Cell*, 1993, **75**: 99—111
- [16] Schulte-Merker S, Hammerschmidt M, Beuchle D, *et al.* Expression of zebrafish goosecoid and no tail gene-products in wild-type and mutant no tail embryos [J]. *Development*, 1994, **120**: 843—852
- [17] Weinberg E S, Allende M L, Kelly C S, *et al.* Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no-tail and spadetail embryos [J]. *Development*, 1996, **122**: 271—280
- [18] Lecaudey V, Anselme I, Rosa F, *et al.* The zebrafish Iroquois gene *iro7* positions the r4/r5 boundary and controls neurogenesis in the rostral hindbrain [J]. *Development*, 2004, **131**: 3121—3131
- [19] Yan Y L, Willoughby J, Liu D, *et al.* A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish *sox9* co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development [J]. *Development*, 2005, **132**: 1069—1083
- [20] Glasgow E, Tomarev S I. Restricted expression of the homeobox gene *prox1* in developing zebrafish [J]. *Mechanisms of Development*, 1998, **76**: 175—178
- [21] Korzh S, Emelyanov A and Korzh V. Developmental analysis of ceruloplasmin gene and liver formation in zebrafish [J].

- Mechanisms of Development*, 2001, **103**: 137—139
- [22] Field H A, Ober E A, Roeser T, *et al.* Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis [J]. *Developmental Biology*, 2003, **253**: 279—290
- [23] Zaret K S. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, **130**: 2705—2716
- [24] Fernandez M A, Albor C, Ingelmo-Torres M, *et al.* Caveolin-1 is essential for liver regeneration [J]. *Science*, 2006, **313**: 628—632

PRELIMINARY STUDY ON FUNCTIONS OF ZEBRAFISH CAVEOLIN-1

WANG Lu, MO Sai-Jun, LI Jie, LI Qing and CUI Zong-Bin

(*Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

Abstract: Caveolin-1 (Cav-1) is the key structural protein of caveolae that regulates cellular proliferation, differentiation and apoptosis through its interaction with multiple signaling molecules. Abnormal expression of *cav-1* genes is closely associated with development and progression of various human diseases, while functions of Cav-1 in zebrafish remain largely unknown. In the study, we have cloned full-length cDNAs for two Cav-1 isoforms from zebrafish. Alignment of amino acid sequences for Cav-1s from multiple species indicates that vertebrate Cav-1 proteins are highly conserved during evolution. Transcriptional expression of *cav-1 α* and *cav-1 β* was found in most of adult tissues detected with RT-PCR. Spatiotemporal expression patterns of some tissue-specific marker genes were investigated with whole-mount *in situ* hybridization during embryonic development. Over-expression or knockdown with MOs of *cav-1 α* markedly affected the development of notochord and somite, while over-expression or knockdown of *cav-1 β* resulted in abnormal liver development. In addition, over-expression or knockdown with MOs of *cav-1 α* or *-1 β* led to abnormal neural development. Therefore, Cav-1 plays crucial roles in maintenance of physiological functions of adult tissues and organs and in regulation of zebrafish embryonic development.

Key words: Caveolin-1; Notochord; Somite; Liver; Neural development