

甲壳动物胰岛素样促雄腺激素功能及作用机制的研究进展

郑宏坤 谢熙 郑亮 朱冬发*

宁波大学海洋学院 宁波 315211

摘要: 甲壳动物的雄性性别分化主要由其促雄腺 (AG) 分泌的胰岛素样促雄腺激素 (IAG) 负责调控。在罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 中, 通过单个 IAG 的操作可以成功性反转, 进而实现全雄养殖。因此, 基于 IAG 的性别调控技术具有良好的应用潜力。目前, IAG 在许多经济甲壳动物中得到研究报告, 发现其表达不仅局限于促雄腺, 功能也更加广泛。此外, 随着 RNA 干扰技术在水产动物中的广泛运用, 基因功能的研究更易实现, IAG 如何执行其生理作用的信号机制及上游的调控网络逐渐成为学者们探究的热点。本文综述了近年来有关 IAG 研究的进展, 从 IAG 的分子特征、生理功能、作用机制及上游调控机理等方面展开探讨, 为深入阐明 IAG 的生理功能及作用机制提供基础。

关键词: 甲壳动物; 胰岛素样促雄腺激素; 生理功能; 作用机制

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2020) 05-670-11

Research Advance in Functions and Related Mechanisms of Insulin-like Androgenic Gland Hormone in Crustaceans

ZHENG Hong-Kun XIE Xi ZHENG Liang ZHU Dong-Fa*

School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: The male sex differentiation in crustaceans is mainly regulated by the insulin-like androgenic gland hormone (IAG) secreted by the androgenic gland (AG). In *Macrobrachium rosenbergii*, manipulation of the IAG can lead to a full-functional reversed female, which is used to produce all-male offspring. Therefore, the IAG-based sex regulation technique has its application potential. At present, IAG has been reported in many economic crustaceans. It is found that IAG expression is not limited to the AG, and its function is more extensive. With the application of RNA interference technology in aquatic animals, the study of gene function is more easily realized. Therefore, the signaling mechanism of IAG function and its upstream regulatory network have gradually become a hot topic. This paper reviews the recent research progresses in the regulation of gene expression, molecular characteristics and biological functions of IAG, as well as the

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 41776165, 31802265);

* 通讯作者, E-mail: zhudongfa@nbu.edu.cn;

第一作者介绍 郑宏坤, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水生生物发育学; E-mail: nbuzhk0626@163.com。

收稿日期: 2020-04-14, 修回日期: 2020-07-03 DOI: 10.13859/j.cjz.202005016

signaling mechanisms of IAG function. Summary of these researches will provide a basis for further elucidation of the physiological function of IAG, as well as its mode of action.

Key words: Crustaceans; Insulin-like androgenic gland hormone; Physiological function; Mechanism of action

性别决定与分化机制一直是生命科学中的一个重要研究领域。对于甲壳动物而言,其部分经济种类在生长速度、个体大小、市场效益等方面存在雌雄差异,因此开展其性别发育机制及调控方法的研究具有重要的经济学意义 (Ventura et al. 2012, 张银等 2018)。动物性别的形成取决于性别决定和性别分化两个过程,虽然甲壳动物性别决定机制尚无定论,但普遍认为其雄性发育由促雄腺 (androgenic gland, AG) 分泌的胰岛素样促雄腺激素 (insulin-like androgenic gland hormone, IAG) 负责调控 (Chandler et al. 2018)。促雄腺最早由 Cronin (1947) 在美国蓝蟹 (*Callinectes sapidus*) 中发现, Charniaux-Cotton (1954) 随后在端足类跳沟虾 (*Orchestia gammarella*) 中揭示了其潜在功能。此后,通过一系列促雄腺切除和移植实验,证明其在十足目甲壳动物雄性性征的发育、维持及对雌性性征分化的抑制等方面具有至关重要的作用 (Ford 2008)。胰岛素样促雄腺激素是促雄腺分泌的主要活性物质,是一种蛋白类激素,因其结构与胰岛素类似,故命名为胰岛素样促雄腺激素 (Hasegawa et al. 1987)。通过 RNA 干扰胰岛素样促雄腺激素基因的表达, Sagi 课题组成功诱导雄性罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 性逆转为“新雌性”,并将新雌性个体与正常雄性交配以产生全雄性的后代 (Lezer et al. 2015, Shpak et al. 2017)。这一结果不仅证实了胰岛素样促雄腺激素基因在虾蟹类雄性分化中的关键作用,也预示了基于胰岛素样促雄腺激素的性别调控技术具有良好的应用潜力。

胰岛素样促雄腺激素目前已在数十种甲壳动物中得到鉴定,其分子结构及促雄化功能已有较好的综述报道 (Ford 2008, 张亚群等

2014, Chandler et al. 2018)。但相较于传统的观点,近年来的证据显示,胰岛素样促雄腺激素并非促雄腺特异性表达,其转录本同样存在于肝胰腺、卵巢、肌肉等组织 (Chung et al. 2011, Li et al. 2012, Chung 2014, Huang et al. 2017, Levy et al. 2017)。这意味着胰岛素样促雄腺激素可能具有更加广泛的生理作用。另一方面,随着 RNA 干扰技术在水产动物中的广泛运用 (邱锡尔等 2015),基因功能的研究更易实现,胰岛素样促雄腺激素如何执行其生理作用的信号转导机制及其上游的调控网络逐渐成为学者们探究的热点。本文综述了近年来有关胰岛素样促雄腺激素的分子特征、生理功能、作用机制及上游调控机理等研究的进展。

1 胰岛素样促雄腺激素分子特征

虽然促雄腺激素的化学本质在早期存在一定争议,但最终在球鼠妇 (*Armadillidium vulgare*) 中被证实为一种 N-糖基化胰岛素样多肽 (Martin et al. 1999, Okuno et al. 1999)。2007 年 Manor 等通过红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 促雄腺抑制消减杂交 cDNA 文库首次获得了十足类甲壳动物胰岛素样促雄腺激素编码序列。随后胰岛素样促雄腺激素相继在罗氏沼虾、远海梭子蟹 (*Portunus pelagicus*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 等十足目甲壳动物中得到克隆和研究 (表 1)。胰岛素样促雄腺激素具有胰岛素样超家族肽的特征,其前激素原依次由信号肽、B 链、C 肽和 A 链组成,信号肽和 C 肽被裂解成为成熟激素,由 A 链和 B 链通过 2 对二硫键互连而成,A 链内另有一对二硫键 (Ford 2008, 张亚群等 2014, Chandler et al. 2018)。二硫键的正确配对对于胰岛素样促雄腺激素的活性至关重要

(Okuno et al. 1997)。此外, A 链或 B 链一般有 1 或 2 个潜在的 N-糖基化位点(NXT/NXS)。研究表明, 体外表达的胰岛素样促雄腺激素前体切除 C 肽后, 只有经糖基化的异源二聚体才具备激素活性 (Ventura et al. 2011a)。

胰岛素样促雄腺激素最开始被认为是一种促雄腺特异性的激素 (Manor et al. 2007, Sroyraya et al. 2010, Mareddy et al. 2011, Ventura et al. 2012, Shpak et al. 2017)。但 Banzai 等 (2011) 发现, 日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 的胰岛素样促雄腺激素除在促雄腺中表达外, 还广泛存在于促雄腺周围的生殖系统组织, 如输精管末端 (distal vas deferens)、中输精管末端 (distal part of medial vas deferens)、射精管前端 (proximal part of terminal

ampoule) 及射精管 (terminal ampoule) 组织中。随后 Chung 等 (2011, 2014) 发现, 美国蓝蟹除了促雄腺中高表达外, 在肝胰腺及卵巢中也有表达。中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的 2 条胰岛素样促雄腺激素异构体也在促雄腺外的肝胰腺以及神经索 (nerve cord) 中有表达 (Li et al. 2012)。利用实时荧光定量 PCR 技术, 胰岛素样促雄腺激素被发现拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) (Huang et al. 2014, Zhang et al. 2014) 和三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) (姜青华 2019) 中广泛分布。

对美国蓝蟹促雄腺、肝胰腺和卵巢源胰岛素样促雄腺激素的分子克隆显示, 3 条序列编码的成熟肽完全一致, 但在其 3' 和 5' 端非编码

表 1 十足目甲壳动物胰岛素样促雄腺激素转录本的组织分布情况

Table 1 Tissue distribution of insulin-like androgenic gland hormone transcript in Decapoda crustaceans

| 物种 Species | 基因及序列号 Gene and GenBank | 组织分布 Tissue distribution | 参考文献 Reference |
|--|---|--|--|
| 红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i> | <i>Cq-IAG</i> (ABH07705.1) | 促雄腺 Androgenic gland | Manor et al. 2007 |
| 罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | <i>Mr-IAG</i> (ACJ38227.1) | 促雄腺 Androgenic gland | Ventura et al. 2008 |
| 远海梭子蟹 <i>Portunus pelagicus</i> | <i>Pp-IAG</i> (ADK46885.1) | 促雄腺 Androgenic gland | Sroyraya et al. 2010 |
| 斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i> | <i>Pm-IAG</i> (ADA67878.1) | 促雄腺 Androgenic gland | Mareddy et al. 2011 |
| 日本囊对虾 <i>Marsupenaeus japonicus</i> | <i>Maj-IAG</i> (BAK20460.1) | 促雄腺、输精管末端、中端精管末端、射精管前端、射精管 Androgenic gland, distal vas deferens, distal part of medial vas deferens, proximal part of terminal ampoule, terminal ampoule | Banzai et al. 2011 |
| 美国蓝蟹 <i>Callinectes sapidus</i> | <i>Cas-IAG</i> (AEI72263.1) <i>CasIAG-hep</i> (KF792074) <i>CasIAG-ova</i> (KX834413) | 促雄腺、卵巢、肝胰腺 Androgenic gland, ovary, hepatopancreas | Chung et al. 2011, Chung 2014, Huang et al. 2017 |
| 中国明对虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i> | <i>Fc-IAG1</i> (JQ388276) <i>Fc-IAG2</i> (JQ388277) | 促雄腺、神经节、肝胰腺 Androgenic gland, ganglion, hepatopancreas | Li et al. 2012 |
| 日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i> | <i>Mn-IAG</i> (AHA33389.1) | 促雄腺 Androgenic gland | Ma et al. 2013 |
| 拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i> | <i>Sp-IAG</i> (KJ870255) <i>Sp-IAG</i> (JQ681748) | 卵巢、促雄腺、精巢 Ovary, androgenic gland, testis | Huang et al. 2014, Zhang et al. 2014 |
| 凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i> | <i>Lv-IAG</i> (AIR09497.1) | 输精管 Vas deferens | Vazquezislas et al. 2014 |
| 东澳岩龙虾 <i>Sagmariasus verreauxi</i> | <i>Sv-IAG</i> (AHY99679.1) | 促雄腺 Androgenic gland | Ventura et al. 2015 |
| 南澳岩龙虾 <i>Jasus edwardsii</i> | <i>Je-IAG</i> (AIM55892.1) | 未报道 Did not report | Ventura et al. 2015 |
| 龙纹螯虾 <i>Procambarus fallax</i> | <i>Pf-IAG</i> (KT343750.1) | 促雄腺、精巢、肌肉 Androgenic gland, testis, muscle | Levy et al. 2017 |
| 中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i> | <i>Es-IAG</i> (KU724192) | 促雄腺、精巢 Testis, androgenic gland | Song et al. 2018 |
| 墨吉明对虾 <i>Fenneropenaeus merguensis</i> | 未报道 Did not report | 促雄腺 Androgenic gland | 周婷婷 2018 |

区域及信号肽编码区域则存在差异 (Chung et al. 2011, Chung 2014, Huang et al. 2017)。笔者课题组也在三疣梭子蟹的肝胰腺和卵巢中鉴定得到了类似的非促雄腺源胰岛素样促雄腺激素 (未发表结果)。因此, 胰岛素样促雄腺激素在同一物种中可能存在多种组织特异性的分子亚型。在美国蓝蟹中, 来源于肝胰腺和卵巢的胰岛素样促雄腺激素均利用“TTG”作为翻译的起始密码子, 而不是常见的“ATG”密码子。虽然真核生物有多种可供选择的密码子, 例如 GTG、TTG、ATT、ATA、CTG、ACG 等, 但它们起始翻译的效率比 ATG 低得多 (Kozak 1989)。此外, 肝胰腺源胰岛素样促雄腺激素的序列还包含一个 5'端非编码区的上游开放阅读框 (upstream open reading frame, uORF)、一个 3'端非编码区的 GAIT 元件以及数个微卫星重复序列。“TTG”起始密码子的选择以及这些翻译调控元件的存在表明, 非促雄腺源的胰岛素样促雄腺激素在翻译调控模式上可能和促雄腺源胰岛素样促雄腺激素存在差异 (Chung 2014)。

不同组织特异性胰岛素样促雄腺激素的产生机制目前尚不清楚, 可能来源于不同的基因, 也可能是同一基因通过组织特异性的可变剪切产生 (Chung 2014, Ventura et al. 2015)。在中国明对虾中, 胰岛素样促雄腺激素 1 和胰岛素样促雄腺激素 2 是同一基因可变剪切的产物 (Li et al. 2012)。但与美国蓝蟹不同的是, 2 条胰岛素样促雄腺激素异构体序列仅在 3'端存在差异, 5'端则完全一致; 二者的组织表达模式也较为一致, 不存在组织特异性亚型。事实上, 中国明对虾的胰岛素样促雄腺激素与美国蓝蟹的胰岛素样促雄腺激素仅有 24% 的一致性, 甚至远低于其与端足目球鼠妇胰岛素样促雄腺激素的一致性 (41%) (Li et al. 2012), 这说明二者可能并不是同源基因。另一项有趣的发现来自于远海梭子蟹, 其胰岛素样促雄腺激素与已报道的美国蓝蟹、拟穴青蟹等近缘物种的胰岛素样促雄腺激素一致性较低, 却和红螯

螯虾等物种的胰岛素样促雄腺激素具有较高的相似性 (图 1)。这意味着甲壳动物的胰岛素样促雄腺激素可能存在着不同的亚家族。深入研究有助于进一步了解甲壳动物的胰岛素样肽类激素的类型及其潜在的功能。

2 胰岛素样促雄腺激素的生理功能

2.1 调控性别分化及第二性征维持

早期的促雄腺切除和移植实验已经表明, 促雄腺在十足目甲壳动物雄性性征发育、维持及对雌性性征分化的抑制等方面具有关键作用 (Chandler et al. 2018)。但作为促雄腺中的主要因子, 胰岛素样促雄腺激素的功能在一段时间里并未得到有效证实。Ventura 等 (2008) 在罗氏沼虾中率先开展胰岛素样促雄腺激素功能的研究, 向 130 ~ 140 日龄雄性罗氏沼虾仔虾 (已出现雄性第二性征) 注射胰岛素样促雄腺激素 dsRNA, 能够抑制雄性第二性征的发育。基于这个结果, 他们随后又对雄性第二性征尚未出现的更早期雄虾进行了 RNA 干扰, 成功制备了完全功能性性反转的“新雌” (neo female) (Ventura et al. 2011b)。这些新雌虾能够与正常雄性交配, 并产生全雄后代 (Lezer et al. 2015)。在雌雄同体的红螯螯虾中, 胰岛素样促雄腺激素基因沉默可以诱导雄性第二性征向雌性第二性征转变 (Manor et al. 2007)。这一系列结果无疑说明, 胰岛素样促雄腺激素在雄性性别分化和第二性征维持中发挥重要作用。通过胰岛素样促雄腺激素基因沉默实现的性反转也为甲壳动物单性化养殖提供了新视角。

2.2 调控配子发生及性腺发育

除了性别分化, 促雄腺也参与甲壳动物精子发生和精巢发育。邱高峰等 (2000) 研究发现, 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 精巢发育及精子发生和促雄腺的发育密切相关; 将跳沟虾 (*Orchestia gammarella*) 的促雄腺和性腺共培养, 能使初级精原细胞 (primary spermatogonia) 形成次级精原细胞 (secondary

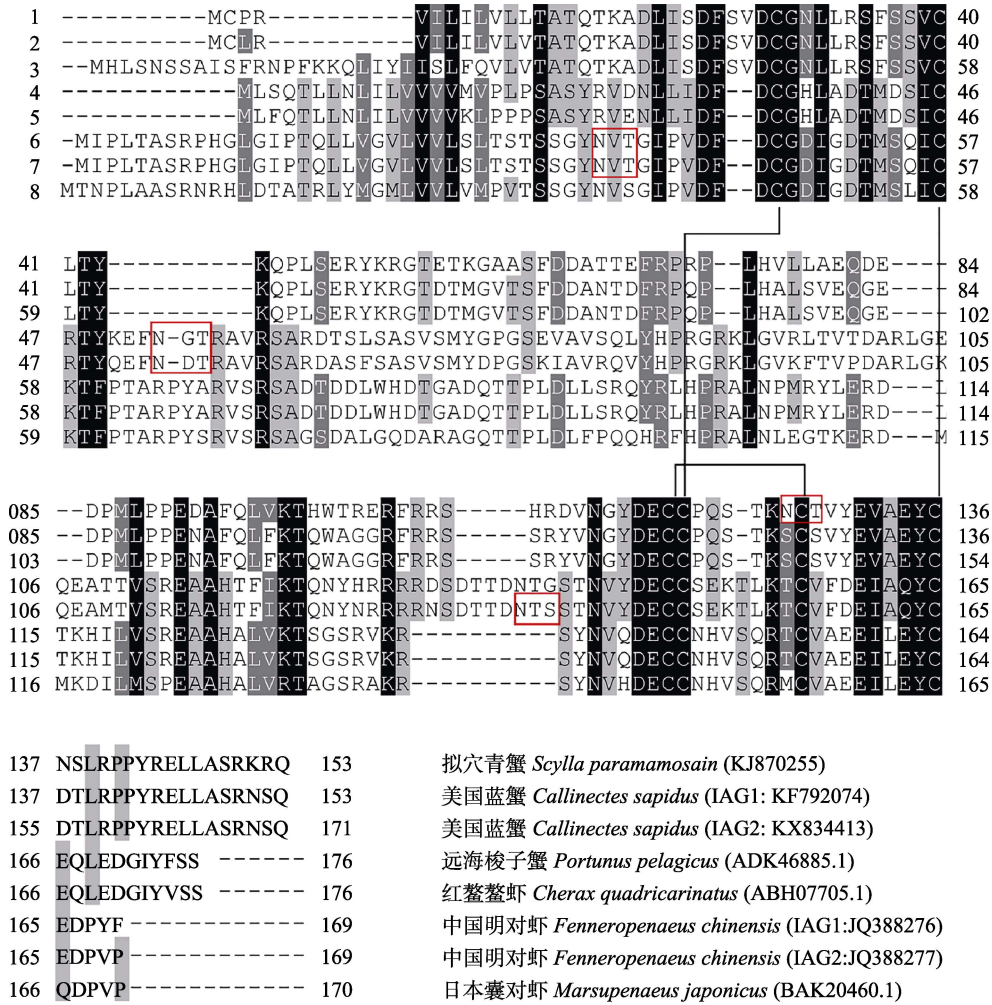


图 1 十足目甲壳动物胰岛素样促雄腺激素的氨基酸序列多重比对分析
 Fig. 1 Multiple alignment analysis of insulin-like androgenic gland hormone amino acid sequence in Decapod crustacean

糖基化位点用红色方框标出，存在的二硫键用黑色实线连接，黑色底色部分表示相同氨基酸，灰色底色部分表示相似氨基酸。

The putative N-linked glycosylated site is marked with red squares, the predicted disulfide bridges are drawn in solid line, the same residues are highlighted with dark background, similar residues are highlighted with gray background.

spermatogonia) (Charniaux-Cotton 1954); 促雄腺提取物能够促进体外培养精巢组织中的细胞增殖和分化 (Khalaila et al. 2002)。而在胰岛素样促雄腺激素的 RNA 干扰实验中，除了导致雄性特征退化，注射胰岛素样促雄腺激素 dsRNA 还会影响生殖指标。在 Ventura 等(2012) 的实验里，相较于对照组，干扰组罗氏沼虾精子发生和精荚发育均受到明显抑制。这说明胰

岛素样促雄腺激素可能是促雄腺中调控精子发生和发育的主要因子。在红螯螯虾中，干扰组的精子数量减少、精巢退化，并伴随着卵黄蛋白原 (vitellogenin, Vg) 基因的表达和卵母细胞中卵黄蛋白积累 (Manor et al. 2007)。这说明胰岛素样促雄腺激素除了参与雄性生殖过程，可能对于雌性生殖也具有调控作用。而在雌雄异体的物种，如美国蓝蟹和拟穴青蟹中，

卵巢源的胰岛素样促雄腺激素在卵巢发育过程中的表达水平变化与卵黄蛋白原基因负相关，也被认为可能参与卵巢发育的调控（Huang et al. 2014, 2017）。因此，胰岛素样促雄腺激素对于卵巢发育的抑制作用可能广泛存在于甲壳动物之中。在日本囊对虾中，化学合成的胰岛素样促雄腺激素能够下调卵巢中卵黄蛋白原基因的表达，以此明确了人工合成胰岛素样促雄腺激素的生物活性（Katayama et al. 2014）。

2.3 调控生长及代谢

作为一种胰岛素样的蛋白质类激素，胰岛素样促雄腺激素在分子结构上与昆虫的胰岛素样肽（insulin-like peptides, ILP）具有相似性（Chandler et al. 2015）。胰岛素样肽在昆虫体内广泛存在，参与调控生长、代谢、蜕皮等多种生理功能（Wu et al. 2006, Reindl et al. 2012, Sparkman et al. 2012）。胰岛素样促雄腺激素在肝胰腺、肌肉等非促雄腺组织中的表达预示着其可能具有类似的作用。通过活体注射 dsRNA, Ventura 等（2012）发现干扰雄性罗氏沼虾胰岛素样促雄腺激素的表达不仅能够阻止精子发生和第二性征的再生，蜕皮和生长指标也受到了影响，说明胰岛素样促雄腺激素可能具有生长调节的功能。在另一项针对性更强的研究中，Chung（2014）对美国蓝蟹肝胰腺源胰岛素样促雄腺激素实施了 RNA 干扰，发现实验组体内的血糖水平显著高于对照组，而肝胰腺中葡萄糖、海藻糖和糖原等糖类的含量则显著低于对照组。这一结果表明，胰岛素样促雄腺激素可能与胰岛素一样，主要通过促进葡萄糖从血淋巴向细胞内转运来调节糖类代谢。

3 胰岛素样促雄腺激素作用的信号机制

一些胰岛素样促雄腺激素信号通路的先导研究认为，胰岛素样促雄腺激素可能与昆虫胰岛素样肽具有相似的信号转导系统。胰岛素受体（insulin receptor, IR）是该系统中一个重要的膜受体，其识别并介导胰岛素样肽信号向细胞内传递（Tognon et al. 2012）。胰岛素受体属

于受体酪氨酸激酶超家族（receptor tyrosine kinase, RTK）蛋白，该家族蛋白被配体激活后会引发靶蛋白的酪氨酸残基发生磷酸化。在脊椎动物中，胰岛素受体被胰岛素样肽激活后启动一系列磷酸化反应，刺激下游的信号转导并最终产生细胞效应（Hubbard et al. 2000）。Khalaila 等（2002）的研究发现，促雄腺分泌产物可以直接激活精巢中一些多肽的磷酸化，这一结果表明精巢中可能存在识别促雄腺产物的细胞膜受体。Aizen 等（2016）通过真核表达制备的胰岛素样促雄腺激素重组蛋白，不仅能够提升精巢中丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）的磷酸化水平，而且具有胰岛素受体配体活性，进一步证实了胰岛素样促雄腺激素可能通过胰岛素受体发挥其生理作用。利用配体印记分析，Sharabi 等（2016）在罗氏沼虾中也证实了胰岛素样促雄腺激素与胰岛素受体之间存在配体-受体结合活性，但利用 dsRNA 干扰胰岛素受体的表达会引起胰岛素样促雄腺激素基因表达上调和第二性征发育加快。Tan 等（2020）进一步利用注射 siRNA 沉默胰岛素受体的表达，成功制备了性反转罗氏沼虾，但该“新雌”个体雌性性状发生不完全。上述结果表明，胰岛素受体可能不是胰岛素样促雄腺激素唯一的分子受体，胰岛素样促雄腺激素多效的生理功能可能通过不同的分子途径实现。

除胰岛素样促雄腺激素受体外，胰岛素样生长因子结合蛋白（insulin-like growth factor binding protein, IGFBP）也在一些物种中得到初步研究（Rosen et al. 2013, Li et al. 2015a, Huang et al. 2016, 2017, Song et al. 2018）。从分子结构上看，这些序列都与脊椎动物的胰岛素样生长因子结合蛋白具有同源性。胰岛素样生长因子结合蛋白对于脊椎动物胰岛素样生长因子（insulin-like growth factor, IGF）生理活性的发挥起着关键作用，它不仅是胰岛素样生长因子在生物体液中的载体，也可作为胰岛素样生长因子的“蓄能器”，减缓胰岛素样生长因

子的释放。这虽然抑制了胰岛素样生长因子的初始信号,但也阻止了配体诱导的受体降解过程,净效应是胰岛素样生长因子受体信号的增加(Tognon et al. 2012)。脊椎动物胰岛素样生长因子结合蛋白一般存在7种形式:最早发现的胰岛素样生长因子结合蛋白1至6,以及后来鉴定得到的胰岛素样生长因子结合蛋白相关蛋白(IGFBP-rp, 又被称为IGFBP7)。与胰岛素样生长因子结合蛋白1至6相比,胰岛素样生长因子结合蛋白相关蛋白与胰岛素而非胰岛素样生长因子具有更高的结合活性(Hwa et al. 1999)。有趣的是,甲壳动物中鉴定得到的胰岛素样生长因子结合蛋白都与胰岛素样生长因子结合蛋白相关蛋白具有更高的相似性,而胰岛素样促雄腺激素和胰岛素样肽也的确与胰岛素具有更加相似的分子结构。胰岛素样生长因子结合蛋白与胰岛素样促雄腺激素的结合能力目前已在红螯螯虾和中华绒螯蟹中得到证实(Rosen et al. 2013, Song et al. 2018)。Li等(2015a)利用RNA干扰技术证实了日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的胰岛素样生长因子结合蛋白与胰岛素样促雄腺激素之间存在相互的转录调控关系,表明胰岛素样生长因子结合蛋白可能参与胰岛素样促雄腺激素的信号转导途径。但在美国蓝蟹中,卵巢中胰岛素样促雄腺激素和胰岛素样生长因子结合蛋白的转录本数量相差约10至10 000倍,在卵巢发育过程中的表达变化模式也并不匹配,预示着非促雄腺源胰岛素样促雄腺激素作用模式可能与促雄腺源胰岛素样促雄腺激素存在一定差异,亦或是胰岛素样生长因子结合蛋白可能还与其他配体结合,具有更加广泛的生理功能(Huang et al. 2017)。

4 胰岛素样促雄腺激素基因表达的调控

4.1 眼柄神经肽类激素与胰岛素样促雄腺激素的关系

位于眼柄的X器窦腺复合体(X-organ-sinus gland complex, XO-SG)是甲壳动物一种

重要的神经内分泌器官,被认为是甲壳动物内分泌调控的中心(Hopkins 2012)。眼柄切除能使红螯螯虾促雄腺肥大,促雄腺被认为受到X器窦腺复合体的负调控,由此提出存在“眼柄-促雄腺”内分泌调控轴(Khalaila et al. 2002)。眼柄切除不仅使促雄腺肥大,还能使红螯螯虾和美国蓝蟹胰岛素样促雄腺激素基因表达水平提升(Rosen et al. 2010, Chung et al. 2011)。值得注意的是,眼柄切除不仅引起美国蓝蟹促雄腺中胰岛素样促雄腺激素表达的上调,对于肝胰腺源胰岛素样促雄腺激素的表达也具有促进作用,这表明眼柄因子对胰岛素样促雄腺激素表达调控不仅仅局限于“眼柄-促雄腺”内分泌轴。

一般而言,X器窦腺复合体主要通过合成分泌甲壳动物高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)家族神经肽来实现其对不同生理功能的调控。甲壳动物高血糖激素家族神经肽主要包括甲壳动物高血糖激素、蜕皮抑制激素(molt inhibiting hormone, MIH)、大颚器抑制激素(mandibular organ inhibiting hormone, MOIH)和性腺抑制激素(gonad inhibiting hormone, GIH)等,这些激素协同调控着甲壳动物的生长代谢、渗透调节、蜕皮和繁殖等生理过程(杨济芬等 2009)。甲壳动物高血糖激素家族神经肽往往具有交叉生物活性,哪个或哪几个甲壳动物高血糖激素家族神经肽参与调控胰岛素样促雄腺激素基因表达迄今尚未明确。在日本沼虾中,分别注射性腺抑制激素、蜕皮抑制激素和甲壳动物高血糖激素等基因的dsRNA,发现性腺抑制激素和蜕皮抑制激素 dsRNA 注射组的胰岛素样促雄腺激素表达水平相较对照组显著上升,说明胰岛素样促雄腺激素的表达可能受到性腺抑制激素和蜕皮抑制激素而非甲壳动物高血糖激素的调控(Li et al. 2015b)。然而在另一项研究中,利用RNA干扰敲降凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)两条雄性偏好表达的甲壳动物高血糖激素亚型,发现胰岛素样促雄腺激素基因的

表达量都显著增加 (Siangcham et al. 2013)。这说明可能存在部分甲壳动物高血糖激素对胰岛素样促雄腺激素的表达具有调控作用。事实上, 由于胰岛素样促雄腺激素具有降低血糖浓度的功能 (Siangcham et al. 2013), 而甲壳动物高血糖激素又是一种甲壳动物的“致糖因子”, 甲壳动物高血糖激素和胰岛素样促雄腺激素可能存在相互调控关系, 以调节甲壳动物体内的血糖水平。

除甲壳动物高血糖激素家族神经肽外, 眼柄中可能也存在其他神经肽类激素调控胰岛素样促雄腺激素基因的表达。Liu 等 (2018) 发现, 在眼柄中高表达的神经肽甲壳动物雌性性激素 (crustacean female sex hormone, CFSH) 在拟穴青蟹促性腺发育早期与胰岛素样促雄腺激素具有相反的表达趋势, 推测其可能抑制促雄腺的发育。

4.2 性别决定基因与胰岛素样促雄腺激素的关系

性别决定基因的阐明是甲壳动物性别发育机制研究的关键。虽然虾蟹类的性别决定途径迄今尚未明确, 但随着组学技术的进步和广泛应用, 一些其他物种中性别决定基因的同源序列陆续在甲壳动物中得到鉴定, 包括 *Sex lethal* (*Sxl*)、*Transformer2* (*Tra-2*)、*Double sex mab-3 related transcription factor* (*Dmrt*)、*Feminization* (*Fem*)、*SOX*、*SRY* 等 (周丽红 2016)。有关这些基因的功能及在甲壳动物中的研究现状已有较好综述 (Chandler et al. 2018), 这里不作赘述。值得注意的是, 这些基因大多在雌雄中并无偏好表达, 因此无法评估它们在性别发育过程中的作用。*Dmrt* 是目前少数公认的甲壳动物性别决定因子, 主要参与雄性精巢发育过程 (李法君等 2016)。*Dmrt* 是果蝇 *Doublesex* 与线虫 *Mab-3* 相关转录因子的统称。*Doublesex* 与 *Mab-3* 各自在果蝇和线虫的性别决定中起关键作用, 后来被发现是同源蛋白, 都包含一个保守的具有 DNA 结合能力的 DM 结构域 (Volf et al. 2003)。*Dmrt* 同时也是动物界最为保守的

一类性别相关蛋白家族。*Dmrt* 家族蛋白对胰岛素样促雄腺激素表达的调控已见报道。Yu 等 (2014) 获得 2 个罗氏沼虾 *Dmrt* 基因, 并通过 RNA 干扰实验发现 *Dmrt11E* 能上调胰岛素样促雄腺激素基因的表达, 而 *Dmrt99B* 对胰岛素样促雄腺激素的表达则无影响, 说明 *Dmrt11E* 可能参与性别发育调控。Li 等 (2018) 也在中国明对虾胰岛素样促雄腺激素的 5'侧翼区发现了 *Doublesex* 的结合序列, 并用 RNA 干扰验证了 *Doublesex* 对胰岛素样促雄腺激素表达的调控能力, 这说明可能存在多种 *Dmrt* 对于胰岛素样促雄腺激素具有调控作用。

Li 等 (2018) 的报道给研究胰岛素样促雄腺激素基因表达的转录调控机理提供了很好的模式, 即通过生物信息学预测胰岛素样促雄腺激素基因的启动子、增强子和转录因子结合位点等序列, 并结合反向遗传学思路来进行功能验证。通过对胰岛素样促雄腺激素基因 5'-侧翼区的克隆分析, 在日本沼虾中发现了 2 个潜在的启动子核心序列区和许多可能的转录因子结合位点, 如 *SRY*、*Sox-5*、*GATA-1* (Ma et al. 2016) 和 cAMP 反应元件 (Li et al. 2015c) 等; 在拟穴青蟹中发现多个潜在的转录因子结合位点 (Huang et al. 2014)。这些调控序列的发现和未来的功能验证对于揭示胰岛素样促雄腺激素基因表达的转录调控机理极其重要。

5 展望

虽然近年来有关胰岛素样促雄腺激素研究逐渐广泛和深入, 但依然有许多问题值得进一步探讨。首先, 本文分析了胰岛素样促雄腺激素在同一物种中存在亚类的可能性, 但目前尚未在同一物种中同时发现不同类型的胰岛素样促雄腺激素。其次, 在美国蓝蟹、拟穴青蟹等物种中发现的胰岛素样促雄腺激素存在广泛的组织表达特性, 是否意味着它们可能只是属于一种胰岛素样肽调控生长代谢, 但不具有性别特异性。第三, 如果不同的生理功能均由同一类胰岛素样促雄腺激素执行, 下游信号如何协

调? 第四, 胰岛素样促雄腺激素是否参与性别决定? 其与性别决定过程如何连接? 这些问题解答, 将更加依赖于细致全面的胰岛素样促雄腺激素基因功能和机制的研究。

参 考 文 献

- Aizen J, Chandler J C, Fitzgibbon Q P, et al. 2016. Production of recombinant insulin-like androgenic gland hormones from three decapod species: in vitro testicular phosphorylation and activation of a newly identified tyrosine kinase receptor from the Eastern spiny lobster, *Sagmariasus verreauxi*. *General and Comparative Endocrinology*, 229(4): 8–18.
- Banzai K, Ishizaka N, Asahina K, et al. 2011. Molecular cloning of a cDNA encoding insulin-like androgenic gland factor from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* and analysis of its expression. *Fisheries Science*, 77(3): 329–335.
- Chandler J C, Aizen J, Elizur A, et al. 2015. Discovery of a novel insulin-like peptide and insulin binding proteins in the Eastern rock lobster *Sagmariasus verreauxi*. *General and Comparative Endocrinology*, 215(5): 76–87.
- Chandler J C, Elizur A, Ventura T, et al. 2018. The decapod researcher's guide to the galaxy of sex determination. *Hydrobiologia*, 825(1): 61–80.
- Charniaux-Cotton H. 1954. Discovery in an amphipod crustacean (*Orchestia gammarella*) of an endocrine gland responsible for the differentiation of primary and secondary male sex characteristics. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De L'Académie Des Sciences*, 239(13): 780–782.
- Chung J S. 2014. An insulin-like growth factor found in hepatopancreas implicates carbohydrate metabolism of the blue crab *Callinectes sapidus*. *General and Comparative Endocrinology*, 199(4): 56–64.
- Chung J S, Manor R, Sagi A. 2011. Cloning of an insulin-like androgenic gland factor (IAG) from the blue crab, *Callinectes sapidus*: implications for eyestalk regulation of IAG expression. *General and Comparative Endocrinology*, 173(1): 4–10.
- Cronin L E. 1947. Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun. *Journal of Morphology*, 81(2): 209–239.
- Ford A T. 2008. Can you feminise a crustacean. *Aquatic Toxicology*, 88(4): 316–321.
- Hasegawa Y, Haino Fukushima K, Katakura Y. 1987. Isolation and properties of androgenic gland hormone from the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. *General and Comparative Endocrinology*, 67(1): 101–110.
- Hopkins P M. 2012. The eyes have it: A brief history of crustacean neuroendocrinology. *General and Comparative Endocrinology*, 175(3): 357–366.
- Huang X S, Bae S H, Bachvaroff T R, et al. 2016. Does a blue crab putative insulin-like peptide binding protein (ILPBP) play a role in a virus infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 58(11): 340–348.
- Huang X S, Ye H H, Chung J S. 2017. The presence of an insulin-like androgenic gland factor (IAG) and insulin-like peptide binding protein (ILPBP) in the ovary of the blue crab, *Callinectes sapidus* and their roles in ovarian development. *General and Comparative Endocrinology*, 249(8): 64–70.
- Huang X S, Ye H H, Huang H Y, et al. 2014. An insulin-like androgenic gland hormone gene in the mud crab, *Scylla paramamosain*, extensively expressed and involved in the processes of growth and female reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 204(8): 229–238.
- Hubbard S R, Till J H. 2000. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1): 373–398.
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R G. 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Reviews*, 20(6): 761–787.
- Katayama H, Kubota N, Hojo H, et al. 2014. Direct evidence for the function of crustacean insulin-like androgenic gland factor (IAG): Total chemical synthesis of IAG. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(21): 5783–5789.
- Khalaila I, Manor R, Weil, S, et al. 2002. The eyestalk-androgenic gland-testis endocrine axis in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 127(2): 147–156.
- Kozak M. 1989. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Molecular and Cellular Biology*, 9(11): 5073–5080.
- Levy T, Rosen O, Simons O, et al. 2017. The gene encoding the insulin-like androgenic gland hormone in an all-female parthenogenetic crayfish. *PLoS One*, 12(12): e0189982.
- Lezer Y, Aflalo E D, Manor R, et al. 2015. On the safety of RNAi

- usage in aquaculture: The case of all-male prawn stocks generated through manipulation of the insulin-like androgenic gland hormone. *Aquaculture*, 435(1): 157–166.
- Li F J, Bai H K, Xiong Y W, et al. 2015a. Molecular characterization of insulin-like androgenic gland hormone-binding protein gene from the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and investigation of its transcriptional relationship with the insulin-like androgenic gland hormone gene. *General and Comparative Endocrinology*, 216(5): 152–160.
- Li F J, Bai H K, Zhang W Y, et al. 2015b. Cloning of genomic sequences of three crustacean hyperglycemic hormone superfamily genes and elucidation of their roles of regulating insulin-like androgenic gland hormone gene. *Gene*, 561(1): 68–75.
- Li F J, Jiang F W, Bai H K, et al. 2015c. Genomic cloning, expression, and single nucleotide polymorphism association analysis of the insulin-like androgenic gland hormone gene in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*. *Genetics and Molecular Research*, 14(2): 5910–5921.
- Li S H, Li F H, Sun Z, et al. 2012. Two spliced variants of insulin-like androgenic gland hormone gene in the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *General and Comparative Endocrinology*, 177(2): 246–255.
- Li S H, Li F H, Yu K J, et al. 2018. Identification and characterization of a doublesex gene which regulates the expression of insulin-like androgenic gland hormone in *Fenneropenaeus chinensis*. *Gene*, 649(7): 1–7.
- Liu A, Liu J, Liu F, et al. 2018. Crustacean female sex hormone from the mud crab *Scylla paramamosain* is highly expressed in prepubertal males and inhibits the development of androgenic gland. *Frontiers in Physiology*, 9: 924.
- Ma K Y, Li J L, Qiu G F. 2016. Identification of putative regulatory region of insulin-like androgenic gland hormone gene (IAG) in the prawn *Macrobrachium nipponense* and proteins that interact with IAG by using yeast two-hybrid system. *General and Comparative Endocrinology*, 229(4): 112–118.
- Ma K Y, Lin J Y, Guo S Z, et al. 2013. Molecular characterization and expression analysis of an insulin-like gene from the androgenic gland of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *General and Comparative Endocrinology*, 185(2): 90–96.
- Manor R, Weil S, Oren S, et al. 2007. Insulin and gender: an insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. *General and Comparative Endocrinology*, 150(2): 326–336.
- Mareddy V R, Rosen O, Thaggard H B, et al. 2011. Isolation and characterization of the complete cDNA sequence encoding a putative insulin-like peptide from the androgenic gland of *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 318(3): 364–370.
- Martin G, Sorokine O, Moniatte M, et al. 1999. The structure of a glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, *Armadillidium vulgare*. *FEBS Journal*, 262(3): 727–736.
- Okuno A, Hasegawa Y, Nagasawa H. 1997. Purification and Properties of Androgenic Gland Hormone from the Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*. *Zoological Science*, 14(5): 837–842.
- Okuno A, Hasegawa Y, Ohira T, et al. 1999. Characterization and cDNA Cloning of Androgenic Gland Hormone of the Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264(2): 419–423.
- Reindl K M, Sheridan M A. 2012. Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology A-molecular & Integrative Physiology*, 163(3): 231–245.
- Rosen O, Manor R, Weil S, et al. 2010. A sexual shift induced by silencing of a single insulin-like gene in crayfish: *ovarian upregulation* and *testicular degeneration*. *PLoS One*, 5(12): e15281.
- Rosen O, Weil S, Manor R, et al. 2013. A crayfish insulin-like-binding protein another piece in the androgenic gland insulin-like hormone puzzle is revealed. *Journal of Biological Chemistry*, 288(31): 22289–22298.
- Sharabi O, Manor R, Weil S, et al. 2016. Identification and characterization of an insulin-like receptor involved in crustacean reproduction. *Endocrinology*, 157(2): 928–941.
- Shpak N, Manor R, Aflalo E D, et al. 2017. Three generations of cultured prawn without W chromosome. *Aquaculture*, 467(467): 41–48.
- Siangcham T, Tinikul Y, Poljaroen J, et al. 2013. The effects of serotonin, dopamine, gonadotropin-releasing hormones, and corazonin, on the androgenic gland of the giant freshwater

- prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology*, 193(41579): 10–18.
- Song K, Xu T S, Zang Y N, et al. 2018. Insulin-like androgenic gland hormone gene in the freshwater Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: cDNA cloning, expression pattern, and interaction with *ESIGFBP7*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(1): 17–25.
- Sparkman A M, Schwartz T S, Madden J A, et al. 2012. Rates of molecular evolution vary in vertebrates for insulin-like growth factor-1 (IGF-1), a pleiotropic locus that regulates life history traits. *General and Comparative Endocrinology*, 178(1): 164–173.
- Sroyraya M, Chotwiwatthanakun C, Stewart M J, et al. 2010. Bilateral eyestalk ablation of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, produces hypertrophy of the androgenic gland and an increase of cells producing insulin-like androgenic gland hormone. *Tissue & Cell*, 42(5): 293–300.
- Tan K, Li Y H, Zhou M, et al. 2020. siRNA knockdown of *MrIR* induces sex reversal in *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 523(25): 735172.
- Tognon C E, Sorensen P H. 2012. Targeting the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) signaling pathway for cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(1): 33–48.
- Vazquezislas G, Rodolfo G, Guerrerrotolero D A, et al. 2014. Histology of the androgenic gland and expression of the insulin-like androgenic gland hormone precursor gene in the genital organ of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*, 34(3): 293–299.
- Ventura T, Aflalo E D, Weil S, et al. 2011b. Isolation and characterization of a female-specific DNA marker in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Heredity*, 107(5): 456–461.
- Ventura T, Fitzgibbon Q, Battaglene S, et al. 2015. Identification and characterization of androgenic gland specific insulin-like peptide-encoding transcripts in two spiny lobster species: *Sagmariasus verreauxi* and *Jasus edwardsii*. *General and Comparative Endocrinology*, 214(4): 126–133.
- Ventura T, Manor R, Aflalo E D, et al. 2008. Temporal silencing of an androgenic gland-specific insulin-like gene affecting phenotypical gender differences and spermatogenesis. *Endocrinology*, 150(3): 1278–1286.
- Ventura T, Manor R, Aflalo E D, et al. 2011a. Expression of an androgenic gland-specific insulin-like peptide during the course of prawn sexual and morphotypic differentiation. *International Scholarly Research Notices*, 2011: 476283–476283.
- Ventura T, Sagi A. 2012. The insulin-like androgenic gland hormone in crustaceans: From a single gene silencing to a wide array of sexual manipulation-based biotechnologies. *Biotechnology Advances*, 30(6): 1543–1550.
- Volff J N, Zarkower D, Bardwell V J, et al. 2003. Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *Journal of Molecular Evolution*, 57(1): S241–S249.
- Wu Q, Brown M R. 2006. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annual Review of Entomology*, 51(1): 1–24.
- Yu Y Q, Ma W M, Zeng Q G, et al. 2014. Molecular cloning and sexually dimorphic expression of two Dmrt genes in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Agricultural Research*, 3(2): 181–191.
- Zhang Y Q, Qiao K, Wang S P, et al. 2014. Molecular identification of a new androgenic gland-specific insulin-like gene from the mud crab, *Scylla paramamosain*. *Aquaculture*, 433(35): 325–334.
- 姜青华. 2019. 三疣梭子蟹 *IAG* 基因克隆及其功能调控关系研究. 宁波: 宁波大学博士学位论文.
- 李法君, 付春鹏, 罗永巨. 2016. *Dmrt* 基因在水生生物中的研究进展. *水生生物学报*, 40(5): 1068–1077.
- 邱高峰, 吴萍. 2000. 中华绒螯蟹促雄腺的结构与功能. *水产学报*, 24(2): 108–112.
- 邱锡尔, 朱冬发, 周彦琦, 等. 2015. 甲壳动物 RNAi 技术研究与应用进展. *生物技术通报*, 31(3): 57–63.
- 杨济芬, 朱冬发, 沈建明, 等. 2009. 甲壳动物高血糖激素家族生理功能研究进展. *动物学杂志*, 44(1): 151–158.
- 张亚群, 王克坚. 2014. 甲壳动物促雄腺激素功能、生化和分子结构的研究. *水产科学*, 33(5): 331–336.
- 张银, 林帆, 石西, 等. 2018. 虾蟹动物性别决定和分化机制研究现状与展望. *汕头大学学报: 自然科学版*, 33(4): 3–14.
- 周丽红. 2016. 脊尾白虾蜕皮和性别调控相关基因的鉴定及功能分析. 青岛: 中国科学院研究生院, 中国科学院海洋研究所硕士学位论文.
- 周婷婷. 2018. 墨吉明对虾胰岛素样促雄性腺激素基因(*FmIAG*)的分子特征研究. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文.