

DOI: 10.12264/JFSC2025-0040

中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因的克隆及表达分析

杨志刚^{1,2}, 胡韵^{1,2}, 雷金沅^{1,2}, 陈阿琴^{1,2*}, 李腾^{1,2}, 王爱民³, 成永旭^{1,2}

1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306;

3. 盐城工学院, 海洋与生物工程学院, 江苏 盐城 224000

摘要: 为探究肝细胞核因子 4 (hepatocyte nuclear factor 4, HNF4) 在中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的脂质代谢及长链多不饱和脂肪酸 (long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA) 生物合成中的调控作用, 本研究使用 RACE 技术克隆中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因, qPCR 检测 *Hnf4* 基因在多个组织中的表达情况, 并通过 RNA 干扰、添加其抑制剂和激动剂处理后分析脂质代谢相关基因的表达变化。结果显示, 中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因全长 3554 bp, 其中 5' 非编码区长度为 569 bp, 3' 非编码区为 1179 bp, 开放阅读框为 1806 bp, 编码 601 个氨基酸。HNF4 蛋白总平均亲疏水性为 -0.177, 推测 HNF4 蛋白为亲水性蛋白。同源性分析发现中华绒螯蟹 HNF4 与克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*)、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 等虾蟹类具有较高的序列同一性和氨基酸同源性, 且在系统进化树中与拟穴青蟹和三疣梭子蟹 HNF4 聚为一支。qPCR 结果显示, *Hnf4* 在多个组织中均有表达, 但在肝胰腺中表达量最高。使用 dsRNA 干扰 *Hnf4* 基因的表达后, 中华绒螯蟹肝胰腺中 *Fas*、*Scd*、*Fad6*、*Fad9* 以及 *Elovl4* 基因的表达显著降低, *Hsl* 基因表达显著上调 ($P < 0.05$); 注射抑制剂 BI-6015 与 RNA 干扰结果相似, 而注射激动剂 Benfluorex 得到了相反的结果, 这提示 *Hnf4* 基因对中华绒螯蟹的脂质代谢及 LC-PUFA 生物合成调控有一定作用。上述研究结果可以为进一步探究 HNF4 的生物特异性作用及其对中华绒螯蟹脂质代谢等生理调控机制提供参考。

关键词: 中华绒螯蟹; 肝细胞核因子 4 (HNF4); 基因克隆; 脂质代谢

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)06-0786-11

肝细胞核因子 (hepatocyte nuclear factor, HNF) 是在肝脏中特异性表达的转录因子, 在动物发育、肝细胞增殖与分化、维护肝细胞生物学功能及肝脏生理功能方面有重要的作用^[1]。HNF 家族主要包括 HNF-1、HNF-3、HNF-4、HNF-6、CCAAT/增强子结合蛋白 (C/EBP) 和 D 结合蛋白。HNF-1 包括 HNF-1 α 和 HNF-1 β , 主要通过调节内分泌和异种生物酶的活性从而影响肝脏、胰腺、肠和肾脏等组织的生理功能^[2]。HNF-3 包括 HNF-3 α 、HNF-3 β 和 HNF-3 γ , 在生物早期发育、调控细胞分化及胰岛功能, 维持体内葡萄糖稳态等方面发挥重要作用^[3]。HNF-4 家族包括 HNF-4 α 、HNF-4 β

和 HNF-4 γ , 主要存在于动物肝脏、肾脏和肠道中, 调节脂质代谢、糖代谢等代谢通路相关基因表达。有研究发现, 通过生长激素的刺激, *Hnf4* 能够与 *Hnf6* 基因相互作用, 进而调控肝脏蛋白质的合成和基因表达^[4-5]。

HNF4 对生物肝细胞发育和分化过程至关重要。在肝脏发育初期, HNF4 通过激活肝脏中甲状腺激素结合蛋白和 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶等基因的表达, 促进早期肝细胞的发育。HNF4 可以调控肝细胞分化和维持肝细胞生物学功能, 是肝细胞的重要转录蛋白^[1]。研究表明, HNF4 α 参与脂质和胆固醇代谢调节, 可激活载脂蛋白 C-III (apolipoprotein

收稿日期: 2025-02-20; 修订日期: 2025-4-25.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32273154); 现代农业产业技术体系项目 (CARS-48); 上海市自然科学基金项目 (22ZR1427300)

作者简介: 杨志刚 (1973–), 博士, 教授, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: zgzyang@shou.edu.cn

通信作者: 陈阿琴, 副教授, 研究方向为水产动物生殖生理学. E-mail: aqinchen@shou.edu.cn

C-III, Apociii)、胆固醇 7 α 羟化酶(cholesterol 7 α hydroxylase, CYP7A1)、脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)、硬脂酰辅酶-A 去饱和酶(stearoyl-CoA desaturase, SCD)等^[6]。除参与脂质代谢调节外, HNF4 α 也是 LC-PUFA 生物合成的重要转录因子, 在转录水平调控 PUFA 合成的关键酶基因或与 LC-PUFA 合成转录因子之间相互作用, 参与 PUFA 的合成^[5,7]。

长链多不饱和脂肪酸(long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA)是指含有双键数 ≥ 3 , 碳原子数 ≥ 20 的多不饱和脂肪酸, 具有重要的生理作用。其中, 二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)对维持机体稳态至关重要。EPA 能够促进血液中胆固醇和甘油三酯(triglyceride, TG)的降解, 改善人体血液微循环; DHA 能够促进脑细胞发育。此外, LC-PUFA 也是细胞膜磷脂的重要组成部分, 能够维持细胞膜流动性, 调节基因转录和细胞内信号传导, 进而调节细胞生理功能^[8]。HNF4 是生物合成 LC-PUFA 的重要转录因子, 能够调控 LC-PUFA 的生物合成关键酶基因以及转录因子的活性和表达^[9]。研究发现, 大部分水产动物不具备合成 LC-PUFA 能力, 或具有较弱的合成 LC-PUFA 能力^[8], 因此, 研究 *Hnf4* 基因及其对 LC-PUFA 生物合成的调控, 能有效降低水产养殖过程对鱼油的依赖, 对水产养殖业的发展具有重要意义。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国重要的水产养殖品种, 具有较高的经济价值。通过研究中华绒螯蟹脂质积累和代谢调控途径, 有助于提高绒螯蟹自身抗应激能力, 进而加强对其营养价值的研究。近年来, 有研究报道了鱼类 HNF4 对 LC-PUFA 生物合成关键酶基因以及转录因子的调控机制相互作用, 但在甲壳动物上鲜有研究。本研究采用 RACE (rapid amplification of cDNA ends)技术克隆中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因, 进一步探究 RNA 干扰 *Hnf4*、添加 HNF4 激动剂(benfluorex)或抑制剂(BI-6015)处理后, 中华绒螯蟹脂质代谢相关基因表达的变化, 进而为探究中华绒螯蟹脂质代谢生理调控机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华绒螯蟹幼蟹(30 $\pm$ 5) g 来自上海海洋大学崇明养殖基地, 试验前将幼蟹于玻璃养殖缸中暂养一周。暂养结束前进行 24 h 禁食处理, 随机选取健康雌蟹采集眼柄、鳃、胃、心、肠、肌肉、胸神经节和肝胰腺等组织, 收集后的组织立刻放入液氮中速冻, 样品置于-80 °C 冰箱中保存待用。

1.2 *Hnf4* 基因的克隆及测序

使用 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)试剂提取中华绒螯蟹肝胰腺总 RNA, 用浓度为 1%的琼脂糖凝胶进行电泳, 检测其完整性。使用 NanoDrop One 分光光度计(NanoDrop Technologies, 美国)测定 RNA 的浓度和质量, 选择 A260/A280 读数在 1.8~2.0 之间的 RNA 溶液保留备用。使用 PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa, 日本)将 RNA 反转录为 cDNA。根据已知的部分中华绒螯蟹 *Hnf4* 的序列, 用 Primer Premier 6.0 软件设计引物(表 1), 以合成的 cDNA 样品为模板, PCR 扩增获得 *Hnf4* 核心片段。使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根, 中国)回收获得目的片段纯化产物, 连接 T 载体, 转化至大肠杆菌感受态细胞, 进行测序分析。根据已获得的 *Hnf4* 部分 cDNA 片段设计特异性引物, 使用 GeneRacerTM Kit (Invitrogen, 美国)进行中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因 3'和 5'端的扩增。将获得的 3'和 5'片段分别与核心片段拼接, 获得中华绒螯蟹 *Hnf4* cDNA 全长序列。

1.3 中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因及其编码氨基酸序列的生物信息学分析

利用 NCBI 进行所获中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因的同源性比较; 利用 SMART 网站预测其保守结构域(<https://smart.embl.de/>); 用 Clustal W 软件分析比对各物种 HNF4 氨基酸序列同源性; 使用 MEGA 软件^[10]基于“Neighbour-joining”法^[11]构建中华绒螯蟹 HNF4 系统进化树; 利用 ProtParam 软件(<https://www.expasy.org/>)预测 HNF4 蛋白的理化性质; 利用 BIOXM-26 预测 HNF4 蛋白的分子量; 利用在线软件 NPS@ (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel>

expasy.org)预测 HNF4 蛋白的二级和三级结构。

1.4 中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因的组织表达分析

用 Primer5 软件在克隆所得的 *Hnf4* 基因核心编码区设计 PCR 引物(表 1), 内参基因为 β -actin。实时定量 PCR (qPCR)检测肝胰腺、鳃、胃、肠、心脏、肌肉、胸神经节和眼组织中 *Hnf4* mRNA 的表达。反应体系为 20 μ L: cDNA 模板 2 μ L; SYBR Premix ExTaq 10 μ L; PCR 正反引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L; ddH₂O 7.2 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 59 $^{\circ}$ C 34 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 65 $^{\circ}$ C 60 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s。

1.5 RNA 干扰实验

根据中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因 cDNA 序列, 用 RNAi 靶位点在线设计软件 siDirectversion 2.0 预测干扰有效区间并进行特异性引物设计(表 1)。合成对应的干扰片段, 以肝胰腺 cDNA 为模板, 扩增得到目的片段, 使用 MiniBEST DNA Fragment Purification Kit (TaKaRa, 日本)纯化扩增产物, 并

根据 T7 RNAi Transcription Kit (诺唯赞, 中国)说明书, 合成 ds*Hnf4*, 置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱备用; ds*Egfp* 制备方法与 ds*Hnf4* 相同。

将 90 只暂养 7 d 的中华绒螯蟹随机分为 5 组: 正常组(注射 Saline)、ds*Egfp* 组(干扰对照)、ds*Hnf4* 组、Benfluorex 组和 BI-6015 组, 每组 3 个重复, 每个重复 6 只扣蟹。根据中华绒螯蟹擦干后称量的体重, ds*Hnf4* 组注射 1 μ g/g ds*Hnf4*, Benfluorex 组、BI-6015 组分别注射 5 μ g/g Benfluorex 和 BI-6015。在注射后 24 h 收集肝胰腺样品, qPCR 检测 *Hnf4*、激素敏感性脂肪酶(hormone-sensitive triglyceride lipase, *Hsl*)、脂肪酸合成酶(*Fas*)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(*Scd*)、肉碱棕榈酰转移酶-1(carnitine palmitoyl transferase 1, *Cpt-1*)、脂肪酸去饱和酶 6 (fatty acyl desaturase 6, *Fad6*)、脂肪酸去饱和酶 9 (fatty acyl desaturase 9, *Fad9*)、脂肪酸延长酶 4 (elongase of very long chain fatty acids 4, *Elovl4*) 等脂代谢相关基因的表达水平(引物见表 1)。

表 1 引物汇总表
Tab. 1 Summary table of primers used

引物名称 primer name	序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 usage
Hnf4-F	ATATGCCCCCCCACCTCAGT	RT-PCR
Hnf4-R	CCGAGTTCCTCAGACTCATCAT	RT-PCR
Hnf4-F1	GCCGCTCCGTGAGGAAGAACCACACA	3' RACE
Hnf4-F2	CCAGTGTCTGCTATTGTCTGACTTCGT	3' RACE
Hnf4-R1	CCTCCGACATTGCACAGAGTTGAGGTT	5' RACE
HNF4-R2	CCGCTGCATTTGGAACATAACAGAATGG	5' RACE
dsRNA- <i>Hnf4</i> -F	taatacgactcactatgggCCCCACCTCAGTCCAATC	dsRNA
dsRNA- <i>Hnf4</i> -R	taatacgactcactatgggCCTCCTGTAGTGTTTCCTCCTCC	dsRNA
dsRNA- <i>Egfp</i> -F	taatacgactcactatgggTGCTTCAGCCGCTACCC	dsRNA
dsRNA- <i>Egfp</i> -R	taatacgactcactatgggTCCAGCAGGACCATGTGAT	dsRNA
qRT- <i>Hnf4</i> -F	CTCCACAGCGTCTCCTATTCC	qPCR
qRT- <i>Hnf4</i> -R	CATCCATCACCTCCTCCTTG	qPCR
β -actin-F	ACCTCGGTTCTATTTTGTCGG	qPCR
β -actin-R	ATGCTTTCGCAGTAGTTCGTC	qPCR
qRT- <i>Hsl</i> -F	TCCAGACAGCGAGATGA	qPCR
qRT- <i>Hsl</i> -R	CTCCAGGATGTCCAGAGTGA	qPCR
qRT- <i>Fas</i> -F	GGGCTCCGTCAAGTCCAAC	qPCR
qRT- <i>Fas</i> -R	CACCTTTATTCTGCCATCATTCA	qPCR
qRT- <i>Scd</i> -F	TGTCTTGGAAGTGC GGGAAT	qPCR
qRT- <i>Scd</i> -R	CATGAAGTACAGGATCAGGGTGAA	qPCR
qRT- <i>Cpt-1</i> -F	ATGCCTCCGCCCAAGTC	qPCR
qRT- <i>Cpt-1</i> -R	GTGGTCCCGAATCACAAG	qPCR
qRT- <i>Fad6</i> -F	CCCAGGAACCTACCGTAC	qPCR
qRT- <i>Fad6</i> -R	AGGAAAGAGCCAGACCAT	qPCR
qRT- <i>Fad9</i> -F	CAAGCCCCAGAACAGGA	qPCR
qRT- <i>Fad9</i> -R	GCAGGAGCGAGAACAGAA	qPCR
qRT- <i>Elovl4</i> -F	CATCGTGGTGGGGTGTGACT	qPCR
qRT- <i>Elovl4</i> -R	TGTGGGCTATGCCGTTGGAG	qPCR

1.6 统计分析

根据 qPCR 结果, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析目的基因的相对表达量^[12]。数据采用平均值 $\pm$ 标准值 ($\bar{x} \pm SD$) ($n \geq 3$) 表示, 使用 Prism 6 软件(GraphPad, La Jolla, CA, 美国) 进行统计分析。采用 Shapiro-Wilk 法和 Levene 法分别检验正态分布和方差齐性。利用 SPSS 18.0 软件, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Bonferroni 法进行统计检验, $P < 0.05$ 认为在统计学上具有显著差异^[10]。

2 结果与分析

2.1 中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因 cDNA 序列的克隆及分析

以肝胰腺 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因片段, 大小为 561 bp (图 1a)。通过已获得序列进行 RACE 引物的设计, 进行 3'-RACE PCR 和 5'-RACE PCR 扩增, 得到大小分别为 2356 bp (图 1b)和 825 bp (图 1c)片段序列, 将上述所获得的序列进行端对端拼接后得到 3554 bp 的 *Hnf4* 基因全长 cDNA(图 2)。该基因序列已上传 NCBI, 登录号为 PQ870873。序列分析表明, 中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因的 5'非编码区长度为 569 bp, 3'非编码区为 1179 bp, 开放阅读框为 1806 bp, 编码 601 个氨基酸(图 2)。对 HNF4 氨基酸序列进行分析, 表明 HNF4 蛋白含有一个锌指 DNA 结合结构域(DBD)和一个配体结合结构域(LBD)(图 2)。蛋白预测结果表明, 中华绒螯蟹 HNF4 蛋白分子

量为 55.85 kDa, 理论等电点为 8.46。HNF4 总平均亲疏水性为 -0.177, 即推测 HNF4 蛋白为亲水性蛋白(图 3)。

2.2 氨基酸序列分析及系统进化树构建

将中华绒螯蟹 HNF4 氨基酸序列与克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*, XP 045622671.2)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*, XP 063885300.1)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*, XP 045123926.1)、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*, XP 069961229.1)、美洲螯龙虾(*Homarus americanus*, XP 042234157.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, AAI24294.1)和人(*Homo sapiens*, AAF00110.1) HNF4 进行同源性分析。结果表明, 中华绒螯蟹 HNF4 与虾蟹类的 HNF4 具有较高的序列同一性和氨基酸同源性, 其中与克氏原螯虾的同源性为 79.46%, 与拟穴青蟹的同源性为 78.04%, 与三疣梭子蟹的同源性为 73.54%(图 4)。

对不同物种 HNF4 氨基酸序列进行比对, 最后用于建树的相似序列包含 340 个氨基酸。系统进化树分析显示, 中华绒螯蟹 HNF4 的氨基酸序列与拟穴青蟹和三疣梭子蟹 HNF4 聚为一支, 与克氏原螯虾、红螯螯虾和美洲螯龙虾等甲壳动物亲缘性较近, 与斑马鱼等硬骨鱼类以及人和小鼠(*Mus musculus*)等哺乳动物亲缘关系较远(图 5)。

二级结构预测结果显示, HNF4 蛋白由无规则卷曲(66.22%)、 α -螺旋(26.46%)和延伸链(7.32%)组成(图 6a)。三级结构预测结果与二级结构预测基本一致(图 6b)。

2.3 中华绒螯蟹不同组织的 *Hnf4* mRNA 表达水平分析

实时荧光定量 PCR 结果显示, *Hnf4* mRNA 在中华绒螯蟹的肝胰腺、鳃、眼柄、肌肉、肠道、胃、心脏和胸神经节中均有表达, 其中 *Hnf4* 在肝胰腺和胃中表达水平较高, 在胸神经节和肠道组织中表达水平次之, 在肌肉、心脏、鳃和眼柄中的表达水平较低(图 7)。

2.4 RNA 干扰实验

Benfluorex、BI-6015 和 ds*Hnf4* 处理后检测中

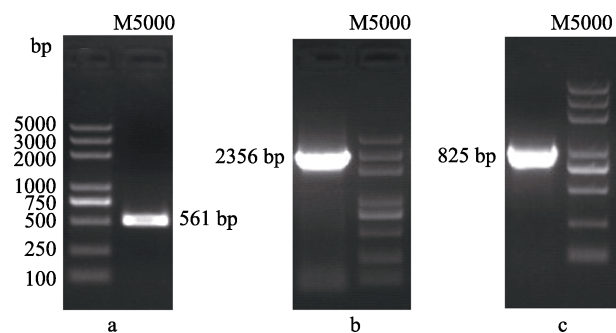


图 1 中华绒螯蟹 *Hnf4* 基因扩增结果

a. *Hnf4* 部分片段; b. 3'RACE; c. 5'RACE;

M5000: DL5000 DNA marker.

Fig. 1 Amplification products of *Eriocheir sinensis Hnf4* gene

a. Partial fragments of *Hnf4* gene; b. 3'RACE;

c. 5'RACE; M5000: DL5000 DNA marker.

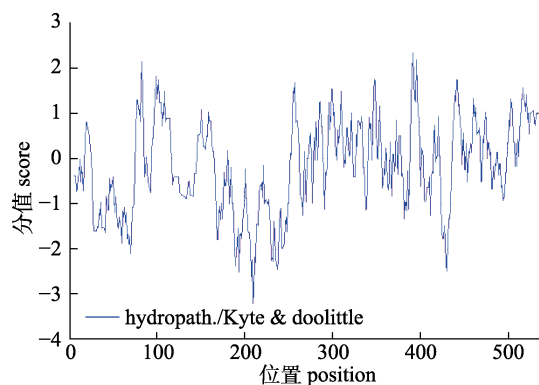


图 3 中华绒螯蟹 HNF4 蛋白亲水性和疏水性分析

Fig. 3 Hydropathicity/hydrophobicity analysis of HNF4 of *Eriocheir sinensis*

3 讨论

HNF4 是一个重要的转录因子, 参与调节多种生理过程, 包括脂质、碳水化合物和氨基酸代谢等^[13]。同时, 研究发现 *Hnf4* 基因参与鱼类脂肪酸合成, 对生物脂肪合成相关酶具有直接调节作用。目前在黄斑蓝子鱼(*Siganus canaliculatus*)^[14]、大西洋鲷(*Sparus aurata*)^[15]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[16]中均发现了 *Hnf4* 基因, 并证实 *Hnf4* 基因在 LC-PUFA 的生物合成过程中调控 LC-PUFA 合成相关基因的表达。在本研究中, 发现中华绒螯蟹体内也存在 *Hnf4* 基因。同源性和系统发

中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	NSPTHTTEVENTCCCECC...	HI VITPSPH...	28
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	NSPTHTTEVENTCCCECC...	RHI VITPSPH...	30
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	NSPTHTTEVENTCCCECC...	VCRHI VITPSPH...	33
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	NSVRYTEVENTCCCECC...	HVS VITPSPH...	30
红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>	NSVRYTEVENTCCCECC...	HVS VITPSPH...	25
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>	NSVRYTEVENTCCCECC...	HVS VITPSPH...	20
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NSVRYTEVENTCCCECC...	HVS VITPSPH...	0
人 <i>Homo sapiens</i>	NSVRYTEVENTCCCECC...	HVS VITPSPH...	0
Consensus	NSPTHTTEVENTCCCECC...	HI VITPSPH...	0
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	...NYCASPTTNTSPNTSP...	...GCRCEGNAPHPHPC...	102
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	...DYHASNVTPTST. SPL...	...GARCEG. VHSLSAP...	94
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	...DYHASNVTPTST. SPL...	...GARCEG. VHSLSAP...	97
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	...DYHASNVTPTST. SPL...	...GARCEG. VHSLSAP...	94
红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>	...DYHASNVTPTST. SPL...	...GARCEG. VHSLSAP...	97
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>	...DYHASNVTPTST. SPL...	...GARCEG. VHSLSAP...	152
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	...DYHASNVTPTST. SPL...	...GARCEG. VHSLSAP...	33
人 <i>Homo sapiens</i>	...DYHASNVTPTST. SPL...	...GARCEG. VHSLSAP...	0
Consensus	...DYHASNVTPTST. SPL...	...GARCEG. VHSLSAP...	0
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	...VSI PCCECC... ILLPSC...	...GCRCEGNAPHPHPC...	179
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	...VSI PCCECC... ILLPSC...	...GCRCEGNAPHPHPC...	152
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	...VSI PCCECC... ILLPSC...	...GCRCEGNAPHPHPC...	159
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	...VSI PCCECC... ILLPSC...	...GCRCEGNAPHPHPC...	132
红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>	...VSI PCCECC... ILLPSC...	...GCRCEGNAPHPHPC...	135
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>	...VSI PCCECC... ILLPSC...	...GCRCEGNAPHPHPC...	199
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	...VSI PCCECC... ILLPSC...	...GCRCEGNAPHPHPC...	67
人 <i>Homo sapiens</i>	...VSI PCCECC... ILLPSC...	...GCRCEGNAPHPHPC...	31
Consensus	...VSI PCCECC... ILLPSC...	...GCRCEGNAPHPHPC...	0
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	CKCFRRRSRK...H...CR...	CKCFRRRSRK...H...CR...	259
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	CKCFRRRSRK...H...CR...	CKCFRRRSRK...H...CR...	232
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	CKCFRRRSRK...H...CR...	CKCFRRRSRK...H...CR...	239
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	CKCFRRRSRK...H...CR...	CKCFRRRSRK...H...CR...	212
红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>	CKCFRRRSRK...H...CR...	CKCFRRRSRK...H...CR...	215
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>	CKCFRRRSRK...H...CR...	CKCFRRRSRK...H...CR...	279
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	CKCFRRRSRK...H...CR...	CKCFRRRSRK...H...CR...	144
人 <i>Homo sapiens</i>	CKCFRRRSRK...H...CR...	CKCFRRRSRK...H...CR...	108
Consensus	CKCFRRRSRK...H...CR...	CKCFRRRSRK...H...CR...	0
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	SAEHS...GFSF...AVEE...	SAEHS...GFSF...AVEE...	337
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	SAEHS...GFSF...AVEE...	SAEHS...GFSF...AVEE...	310
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	SAEHS...GFSF...AVEE...	SAEHS...GFSF...AVEE...	317
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	SAEHS...GFSF...AVEE...	SAEHS...GFSF...AVEE...	290
红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>	SAEHS...GFSF...AVEE...	SAEHS...GFSF...AVEE...	293
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>	SAEHS...GFSF...AVEE...	SAEHS...GFSF...AVEE...	357
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	SAEHS...GFSF...AVEE...	SAEHS...GFSF...AVEE...	224
人 <i>Homo sapiens</i>	SAEHS...GFSF...AVEE...	SAEHS...GFSF...AVEE...	188
Consensus	SAEHS...GFSF...AVEE...	SAEHS...GFSF...AVEE...	0
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	NRLQD...LLGN...V...	NRLQD...LLGN...V...	417
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	NRLQD...LLGN...V...	NRLQD...LLGN...V...	389
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	NRLQD...LLGN...V...	NRLQD...LLGN...V...	396
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	NRLQD...LLGN...V...	NRLQD...LLGN...V...	370
红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>	NRLQD...LLGN...V...	NRLQD...LLGN...V...	372
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>	NRLQD...LLGN...V...	NRLQD...LLGN...V...	436
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NRLQD...LLGN...V...	NRLQD...LLGN...V...	303
人 <i>Homo sapiens</i>	NRLQD...LLGN...V...	NRLQD...LLGN...V...	267
Consensus	NRLQD...LLGN...V...	NRLQD...LLGN...V...	0
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	LLLEFY...NRCG...SR...	LLLEFY...NRCG...SR...	478
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	LLLEFY...NRCG...SR...	LLLEFY...NRCG...SR...	450
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	LLLEFY...NRCG...SR...	LLLEFY...NRCG...SR...	476
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	LLLEFY...NRCG...SR...	LLLEFY...NRCG...SR...	431
红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>	LLLEFY...NRCG...SR...	LLLEFY...NRCG...SR...	433
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>	LLLEFY...NRCG...SR...	LLLEFY...NRCG...SR...	497
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	LLLEFY...NRCG...SR...	LLLEFY...NRCG...SR...	364
人 <i>Homo sapiens</i>	LLLEFY...NRCG...SR...	LLLEFY...NRCG...SR...	328
Consensus	LLLEFY...NRCG...SR...	LLLEFY...NRCG...SR...	0
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	...ANCECVNVCSSSC...	...ANCECVNVCSSSC...	552
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	...ANCECVNVCSSSC...	...ANCECVNVCSSSC...	526
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	...ANCECVNVCSSSC...	...ANCECVNVCSSSC...	552
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	...ANCECVNVCSSSC...	...ANCECVNVCSSSC...	492
红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>	...ANCECVNVCSSSC...	...ANCECVNVCSSSC...	511
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>	...ANCECVNVCSSSC...	...ANCECVNVCSSSC...	558
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	...ANCECVNVCSSSC...	...ANCECVNVCSSSC...	398
人 <i>Homo sapiens</i>	...ANCECVNVCSSSC...	...ANCECVNVCSSSC...	366
Consensus	...ANCECVNVCSSSC...	...ANCECVNVCSSSC...	0
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	CLPSCPCLTPASSP...	CLPSCPCLTPASSP...	601
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	CLPSCPCLTPASSP...	CLPSCPCLTPASSP...	602
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	CLPSCPCLTPASSP...	CLPSCPCLTPASSP...	632
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	CLPSCPCLTPASSP...	CLPSCPCLTPASSP...	550
红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>	CLPSCPCLTPASSP...	CLPSCPCLTPASSP...	569
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>	CLPSCPCLTPASSP...	CLPSCPCLTPASSP...	617
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	CLPSCPCLTPASSP...	CLPSCPCLTPASSP...	444
人 <i>Homo sapiens</i>	CLPSCPCLTPASSP...	CLPSCPCLTPASSP...	408
Consensus	CLPSCPCLTPASSP...	CLPSCPCLTPASSP...	0

(待续 to be continued)

(续图 4 Fig. 4 continued)

中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>		601
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	RCTETKCAASFCDI TEFRRPLHLVLLAECCCEPMLPPEAFCLVKTHTIRERFRSRHRCVNCYDECCPCSTKNCTVVEV	682
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	RCTEAKGVTSFCLTNNCFHPRPLHALLVEQNECPMLPPKNAFLI KTQVI CRRI RRSRHRVNCYDECCPCSTKNCTVVEV	712
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>		550
红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>		569
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>		617
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>		444
人 <i>Homo sapiens</i>		408
Consensus		
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>		601
拟穴青蟹 <i>Scylla paramamosain</i>	AEYCNSLRPPYRELLASRRR	702
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	AEYCNSLRPPYRELLASRRR	732
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>		550
红螯螯虾 <i>Cherax quadricarinatus</i>		569
美洲螯龙虾 <i>Homarus americanus</i>		617
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>		444
人 <i>Homo sapiens</i>		408
Consensus		

图 4 不同物种 HNF4 氨基酸序列同源比对

颜色的深浅程度反映了在相同位置氨基酸的相似性，颜色越深，相似性越高。虚线框表示 DBD，实线框表示 LBD。

Fig. 4 Aligment of the amino sequences of HNF4 among different species
Identical amino acids are highlighted in colour, with darker shades indicating higher similarity at the same positions. The dashed box represents DBD, and the solid box represents LBD.

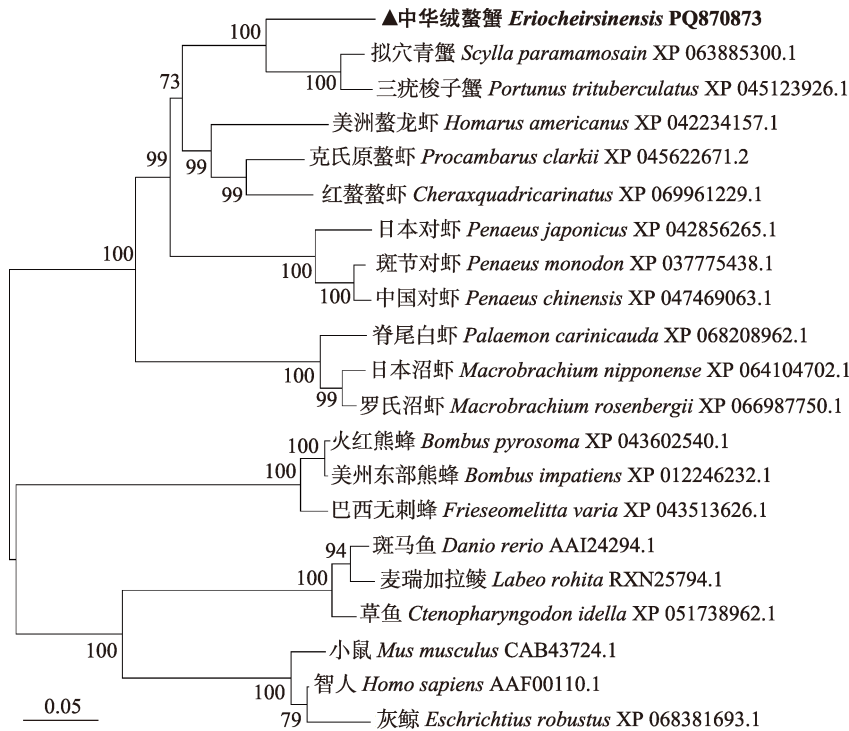


图 5 基于 HNF4 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of HNF4

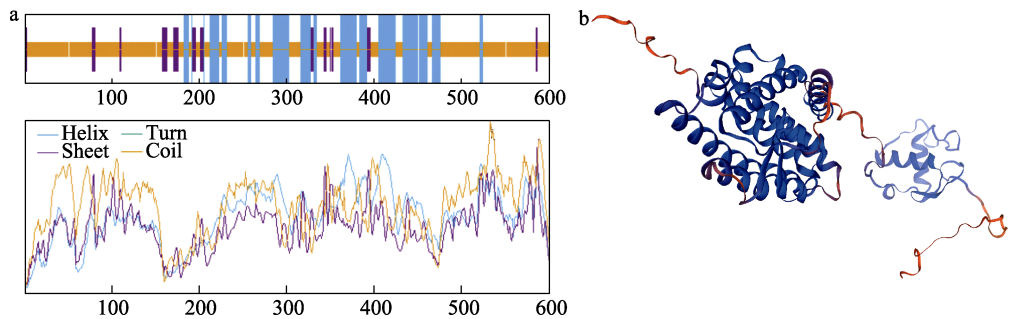


图 6 HNF4 蛋白二级结构与三级结构预测

a. HNF4 蛋白二级结构预测; b. HNF4 蛋白三级结构预测.

Fig. 6 Prediction of secondary and tertiary structures of HNF4 protein.

a. Prediction of secondary structures of HNF4 protein; b. Prediction of tertiary structures of HNF4 protein.

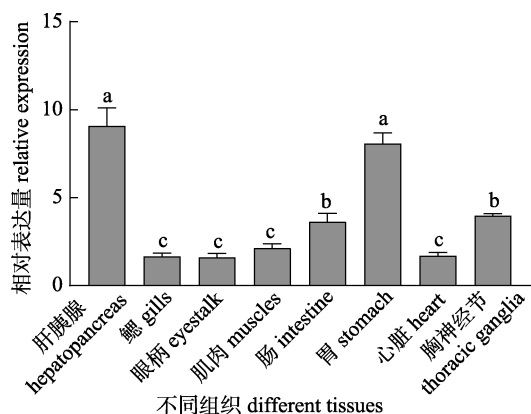


图 7 *Hnf4* 在中华绒螯蟹多个组织中的相对表达量
不同字母之间表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 7 The relative expression of *Hnf4* in multiple tissues of *Eriocheir sinensis*. Significant differences are indicated with different letters ($P < 0.05$).

育树显示, 中华绒螯蟹 *HNF4* 与克氏原螯虾同源性最高, 与拟穴青蟹和三疣梭子蟹等聚为一支。随着生物的进化过程, 相同的基因在不同生物之间具有不同的表现形式和功能。然而, *Hnf* 家族包括多个亚型, 目前, 中华绒螯蟹中是否存在不同亚型的 *Hnf* 基因仍需要进一步研究。

肝胰腺是甲壳动物脂质合成代谢的主要场所, 在维持能量代谢和营养调控方面发挥重要作用, 被认为是环境应激的关键靶器官^[17]。本研究发现 *Hnf4* 基因在幼蟹的肝胰腺和胃中高表达, 这与 Carballo 等^[18]在大西洋鲷中的研究结果类似。这

表明肝胰腺可能是 *HNF4* 参与中华绒螯蟹脂质代谢的主要作用部位。眼柄是甲壳动物 LC-PUFA 生物合成的重要场所, 然而本研究发现 *Hnf4* 基因在中华绒螯蟹眼柄中表达量相对较低, 这说明可能 *HNF4* 在中华绒螯蟹眼柄中发挥了较少的调控作用。

人类和小鼠的研究结果表明, *HNF4α* 在调节参与肝细胞分化和脂质稳态的基因表达中起着关键作用^[19-20]。*HNF4α* 在能量代谢中进行正反馈调节, 维持生物体的生理稳态, 并正向调节脂肪的生成^[21]。脂肪酸合成酶、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶和激素敏感性脂肪酶参与生物的脂质合成^[22]。*FADs* 和 *ELOVLs* 是脂肪酸生物合成的关键酶, *Elovl4*, *Fad9* 和 *Fad6* 均被验证为中华绒螯蟹脂肪酸生物合成的关键基因^[23-24]。本研究发现, RNA 干扰 *Hnf4* 表达后, *Fas* 和 *Scd* 在肝胰腺中的表达量显著降低, 这与在花龟 (*Mauremys sinensis*) 中的研究结果一致^[25]。这表明 *HNF4* 能够正向调控 *Fas*、*Scd* 和 *Hsl* 的 mRNA 表达, 促进了脂肪酸的生物合成。同时, 敲低 *Hnf4* 后脂肪酸 β 氧化的关键基因 *Cpt-1* 的表达量显著增加, 表明 *HNF4* 可能对肝胰腺中脂肪酸氧化有抑制作用。大量研究表明, *HNF4* 可以通过调控相关的酶基因而间接对 LC-PUFA 的合成代谢产生影响。在 Li 等^[9]的研究中发现, *HNF4* 对黄斑蓝子鱼的 $\Delta 5/6Fads$ 、*Elovl5* 等 LC-PUFA 合成的关键酶基因有一定的调控作用。此外, *HNF4* 可激活黄斑蓝子鱼 $\Delta 4Fads$

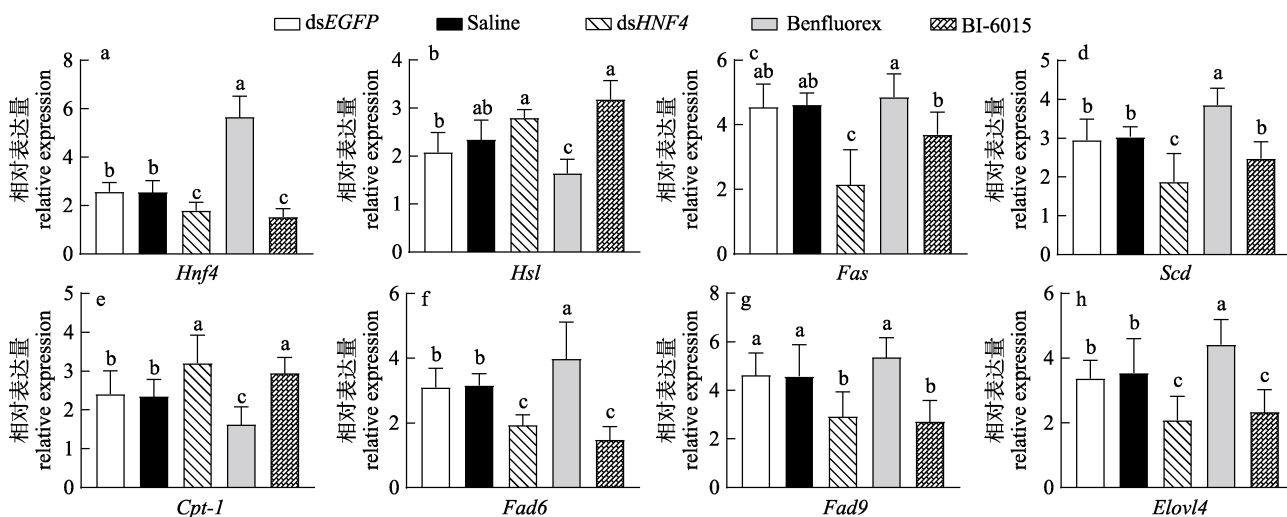


图 8 中华绒螯蟹在不同干扰下脂质代谢相关基因的相对表达量

Fig. 8 Relative expression levels of lipid metabolism related genes in *Eriocheir sinensis* under different interferences

的启动子,在 *Δ4Fads* 的表达调控机制中发挥作用,进而调控 LC-PUFA 的合成代谢^[14]。Pan 等^[26]研究发现, *Hnf4* 基因直接调节人类 *Elovl2* 的表达, *Elovl2* 基因的表达量会随着 *Hnf4α* 表达量的上调而增加。此外,研究证实 HNF4 是 LC-PUFA 生物合成中的正调节因子,可激活参与脂质和胆固醇代谢的各种基因,如 *Cyp7α* 羟化酶、脂肪酸合酶和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶等。而不饱和脂肪酸如 ALA、EPA 和 DHA 与 HNF4α 的结合将抑制其对激活转录的影响^[27]。在水生动物的研究中也发现了这种现象,例如,摄食富含 ALA 的大西洋鲷的后代,在 CPG 位点邻近的 *Sp1* 和 *Hnf4α* 结合位点 DNA 甲基化增加,后代的肝脏中 *Scd1a* 和 *Hnf4α* 表达呈负相关^[15]。

本研究首次报道了中华绒螯蟹中存在 *Hnf4* 基因,并发现 *Hnf4* 基因的表达正向调控中华绒螯蟹 *Elovl4*、*Fad6* 和 *Fad9* 的表达,这说明 HNF4α 可能在中华绒螯蟹 LC-PUFA 合成代谢过程中起关键作用。研究结果可以为进一步探究中华绒螯蟹脂质代谢生理调控机制提供参考。未来研究应进一步分析该基因在中华绒螯蟹中的亚型分布,并深入探究 HNF4α 在中华绒螯蟹脂质代谢调控中的具体功能及作用机制。

参考文献:

- [1] Zheng J, Li J, Yu S N, et al. Progress about hepatocyte nuclear factor[J]. Medical Recapitulate, 2008, 14(4): 491-493. [郑洁, 李进, 于树娜, 等. 肝细胞核因子的研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(4): 491-493.]
- [2] Begum S. Hepatic nuclear factor 1 alpha (HNF-1 α) in human physiology and molecular medicine[J]. Current Molecular Pharmacology, 2020, 13(1): 50-56.
- [3] Yang Y A, Yu J D. Current perspectives on FOXA1 regulation of androgen receptor signaling and prostate cancer[J]. Genes & Diseases, 2015, 2(2): 144-151.
- [4] Sladek F M. Orphan receptor HNF-4 and liver-specific gene expression[J]. Receptor, 1993, 3(3): 223-232.
- [5] Rastegar M, Lemaigre F P, Rousseau G G. Control of gene expression by growth hormone in liver: Key role of a network of transcription factors[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2000, 164(1-2): 1-4.
- [6] Wisely G B, Miller A B, Davis R G, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids[J]. Structure, 2002, 10(9): 1225-1234.
- [7] Jump D B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription[J]. Current Opinion in Lipidology, 2002, 13(2): 155-164.
- [8] Xie D Z, Chen F, Zhang Q H, et al. Advance in the regulatory mechanisms of LC-PUFA biosynthetic metabolism of teleost[J]. Journal of Shantou University (Natural Science Edition), 2015, 30(2): 3-19. [谢帝芝, 陈芳, 张庆昊, 等. 鱼类 LC-PUFA 合成代谢调控机制研究进展[J]. 汕头大学学报 (自然科学版), 2015, 30(2): 3-19.]
- [9] Li Y Y, Zeng X W, Dong Y W, et al. Hnf4 α is involved in LC-PUFA biosynthesis by up-regulating gene transcription of elongase in marine teleost *Siganus canaliculatus*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(10): 3193.
- [10] Shi Q Y, Yang Z G, Yao Q Q, et al. Full-length cDNA cloning of ELOVL6 and its tentative study in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(6): 844-855. [施秋燕, 杨志刚, 姚琴琴, 等. 中华绒螯蟹 ELOVL6 cDNA 全长克隆及其表达分析[J]. 水产学报, 2016, 40(6): 844-855.]
- [11] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. 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.
- [13] Martinez-Jimenez C P, Kyrnizi I, Cardot P, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 α coordinates a transcription factor network regulating hepatic fatty acid metabolism[J]. Molecular and Cellular Biology, 2010, 30(3): 565-577.
- [14] Wang S Q, Chen J L, Jiang D L, et al. Hnf4 α is involved in the regulation of vertebrate LC-PUFA biosynthesis: Insights into the regulatory role of Hnf4 α on expression of liver fatty acyl desaturases in the marine teleost *Siganus canaliculatus*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2018, 44(3): 805-815.
- [15] Perera E, Turkmen S, Simó-Mirabet P, et al. Stearoyl-CoA desaturase (*scd1a*) is epigenetically regulated by broodstock nutrition in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. Epigenetics, 2020, 15(5): 536-553.
- [16] Zhang M, Li W B, Zhu Y Y, et al. Cloning, functional characterization and expression analysis of the *elovl4a* gene in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Ocean University of China, 2021, 20(6): 1515-1527.
- [17] Wang L, Yan B, Liu N, et al. Effects of cadmium on glutathione synthesis in hepatopancreas of freshwater crab,

- Sinopotamon yangtsekiense*[J]. Chemosphere, 2008, 74(1): 51-56.
- [18] Carballo C, Shin H S, Berbel C, et al. Heritability estimates and genetic correlation for growth traits and LCDV susceptibility in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. Fishes, 2020, 5(1): 2.
- [19] Li J, Ning G, Duncan S A. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha[J]. Genes & Development, 2000, 14(4): 464-474.
- [20] Yin L, Ma H, Ge X, et al. Hepatic HNF4 α is essential for maintaining triglyceride and cholesterol homeostasis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(2): 328-336.
- [21] Louet J F, Hayhurst G, Gonzalez F J, et al. The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 α and cAMP-response element-binding protein (CREB)[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(41): 37991-38000.
- [22] Xu Y H, Tan X Y, Xu Y C, et al. Novel insights for SREBP-1 as a key transcription factor in regulating lipogenesis in a freshwater teleost, grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. British Journal of Nutrition, 2019, 122(11): 1201-1211.
- [23] Yao Q Q, Yang Z G, Guo Z H, et al. Prokaryotic expression of fatty acyl-CoA $\Delta 9$ desaturase in *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(6): 1177-1185. [姚琴琴, 杨志刚, 郭子好, 等. 中华绒螯蟹 $\Delta 9$ 脂肪酸去饱和酶基因克隆与原核表达[J]. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1177-1185.]
- [24] Yang Z G, Yao Q Q, Cheng Y X, et al. Full length cDNA cloning and prokaryotic expression of fatty acyl-CoA $\Delta 6$ -b desaturase in *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(1): 24-35. [杨志刚, 姚琴琴, 成永旭, 等. 中华绒螯蟹 FAD6-b 基因的全长克隆及原核表达分析[J]. 水产学报, 2016, 40(1): 24-35.]
- [25] Khan I, Lu Y, Li N, et al. Effect of ammonia stress on AMPK regulating-carbohydrate and lipid metabolism in chinese striped-neck turtle (*Mauremys sinensis*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2023, 263: 109491.
- [26] Pan G, Cavalli M, Carlsson B, et al. rs953413 regulates polyunsaturated fatty acid metabolism by modulating ELOVL2 expression[J]. iScience, 2020, 23(2): 100808.
- [27] Dong Y, Zhao J, Chen J, et al. Cloning and characterization of $\Delta 6/\Delta 5$ fatty acyl desaturase (Fad) gene promoter in the marine teleost *Siganus canaliculatus*[J]. Gene, 2018, 647: 174-180.

Cloning and expression of *Hnf4* gene in *Eriocheir sinensis*

YANG Zhigang^{1,2}, HU Yun^{1,2}, LEI Jinyun^{1,2}, CHEN Aqin^{1,2*}, LI Teng^{1,2}, WANG Aimin³, CHENG Yongxu^{1,2}

1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. College of Marine and Bioengineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224000, China

Abstract: Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) is a pivotal transcription factor that regulates lipid metabolism and the biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) and plays a critical role in maintaining hepatocyte function. LC-PUFAs, such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), are essential for various physiological processes. However, most aquatic species exhibit limited biosynthetic capacity. *Eriocheir sinensis*, an economically significant crab species, serves as an important model for investigating lipid metabolism mechanisms in aquaculture. Despite its importance, the functional role of *Hnf4* in crustaceans remains poorly understood. This study aims to elucidate the molecular characteristics and regulatory mechanisms of *Hnf4* in *E. sinensis*. The full-length *Hnf4* gene was cloned using rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology, and its mRNA expression profile across multiple tissues was analyzed via quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The full-length sequence of the *Hnf4* gene in *E. sinensis* is 3554 bp, including a 5' UTR of 569 bp, a 3' UTR of 1179 bp, an ORF of 1806 bp, and *Hnf4* cDNA encoding 601 amino acids. The overall average hydrophilicity and hydrophobicity of HNF4 protein is -0.177 , indicating that the HNF4 protein in *E. sinensis* is a hydrophilic protein. Homology analysis revealed that the HNF4 of *E. sinensis* has high sequence and amino acid homology with crustaceans such as *Procambarus clarkii*, *Scylla paramamosain* and *Portunus trituberculatus*, and is clustered together with the HNF4 of *Portunus trituberculatus* and *Procambarus clarkii* in the phylogenetic tree. The qPCR results showed that *Hnf4* was expressed in multiple tissues of *E. sinensis*, with the highest expression in the hepatopancreas. *E. sinensis* were treated with dsHnf4, inhibitor BI-6015, and agonist Benfluorescein. After 24 h of treatment, hepatopancreatic tissue samples were collected to detect changes in the expression of lipid metabolism-related genes. The results showed that after injection of the inhibitor BI-6015 and interference of *Hnf4* gene expression with dsRNA, the expression of *Fas*, *Scd*, *Fad6*, *Fad9*, and *Elovl4* in the hepatopancreas of *E. sinensis* was significantly reduced. Meanwhile, the expression of *Hsl* was significantly upregulated ($P < 0.05$), whereas injection of the agonist Benfluorescein yielded the opposite result. This indicates that the *Hnf4* gene plays a role in regulating lipid metabolism and LC-PUFA biosynthesis in *E. sinensis*. This study represents the first successful cloning of the *Hnf4* gene in *E. sinensis* and demonstrates its regulatory role in LC-PUFA biosynthesis by modulating key lipid synthesis genes (*Fas* and *Scd*) and enzyme genes (*Fad6*, *Fad9*, *Elovl4*). The hepatopancreas has been identified as the primary site of *Hnf4* activity, where its suppression leads to reduced fatty acid synthesis and enhanced oxidative metabolism. Notably, the relatively low expression of *Hnf4* in the eyestalk of *E. sinensis* suggests potential species-specific regulatory mechanisms distinct from those observed in mammals. These findings provide valuable insights into the biological specificity of HNF4 and its physiological regulation of lipid metabolism in *E. sinensis*. Furthermore, they offer a theoretical foundation for elucidating the lipid metabolism network in crustaceans and for reducing the reliance of aquaculture on fish oil. Future research should focus on exploring the distribution of HNF4 subtypes and their interactions with other transcription factors.

Key words: *Eriocheir sinensis*; HNF4; gene cloning; lipid metabolism

Corresponding author: CHEN Aqin. E-mail: aqinchen@shou.edu.cn