

DOI: 10.12264/JFSC2024-0158

团头鲂水通道蛋白家族基因鉴定及其在盐度胁迫下的功能

李姗姗^{1, 2, 3}, 余欣欣^{1, 2, 3}, 郑国栋^{1, 2, 3}, 邹曙明^{1, 2, 3*}

1. 上海海洋大学, 农业农村部团头鲂遗传育种中心, 上海 201306;
2. 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;
3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306

摘要: 为深入研究团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)水通道蛋白(aquaporin, AQP)的结构、功能及水通道蛋白在盐度胁迫下在鳃组织中的适应性特征, 本研究首先通过生物信息学方法在团头鲂全基因组中鉴定出 19 个 AQP 基因, 它们不均匀分布在 12 条不同染色体上。分子系统发育分析将团头鲂 AQP 基因分为 4 个亚家族; 基因结构和保守基序的结果分析表明团头鲂 AQPs 在进化上高度保守。qRT-PCR 研究显示, 19 个 AQPs 在团头鲂不同组织中具有不同的表达模式, 其中在负责渗透压调节的鳃组织中 AQP3b 表达量最高。在 2~4 盐度胁迫下, 在胁迫初期相邻鳃小片间 ILCM 逐渐脱落, 体积减小。随着胁迫时间的延长, 团头鲂逐渐适应环境, ILCM 体积恢复, 表明团头鲂在盐度胁迫下会发生“鳃重塑”, 以维持体内渗透压平衡。在盐度胁迫过程中, 团头鲂鳃组织 AQP3b 基因相对表达量显著降低后逐渐恢复。本研究结果表明团头鲂 AQP 基因在进化过程中高度保守, 在盐度胁迫条件下团头鲂鳃 AQP3b 发挥重要作用, 为进一步探究团头鲂 AQPs 基因功能及团头鲂在盐度胁迫下的生理机制提供分子基础。

关键词: 团头鲂; 水通道蛋白; 基因家族; 基因表达; 鳃重塑; 盐度胁迫

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)08-1057-11

水通道蛋白(aquaporin, AQP)又称水甘油孔蛋白, 是一种功能性跨膜疏水蛋白, 能够促进水和其他小分子物质通过, 属于跨膜通道的膜内在蛋白(membrane intrinsic protein, MIP)家族^[1], 能够实现水分的跨膜运输, 广泛存在于动物、植物和微生物中^[2]。首个水通道蛋白是在人类红细胞膜中发现的“28 kDa”整合膜蛋白(CHIP28), 后被命名为水通道蛋白 1 (AQP1)^[3]。目前为止, 已有 20 种水通道蛋白(AQP0-16)被发现, 根据基因结构、功能及系统发育关系可将 AQP 划分为 4 个亚家族: I. 主要转运水的经典水通道蛋白^[4], 包括 AQP0、1、2、4、5、6、14、15; II. 转运水、甘油、尿素的水甘油通道蛋白^[5-6], 包括 AQP3、7、9、10、13; III. 转运水、尿素、氨和 H₂O₂ 的氨通道蛋白^[7-8], 包

括 AQP8、16; IV. 非正统水通道蛋白, 包括 AQP11、12。AQP 主要由 4 个单体组成, 每个单体含有 6 个跨膜结构域(H1-H6)^[9], 环 B 和环 E 分别与短螺旋(HB 和 HE)和天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸基序(NPA)相连, NPA 基序主要决定单通道渗透溶质的量, 而芳香族/精氨酸选择性过滤器(Ar/R)通过调节孔径大小来决定通过溶质特异性^[10-12]。AQP 在鱼体中发挥着重要的生理作用, 如参与生物体的渗透调节、免疫、成熟、生殖细胞的排泄和维持离子稳态^[13-14]。刘鑫等^[15]研究发现 AQP10 和 AQP15 在暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)响应盐度变化过程中调节肾脏和肠道中的离子转运; Yang 等^[16]研究发现 AQPs 能够帮助中华乌塘鳢(*Bostrychus sinensis*)适应不同盐度环境, 在鳃和

收稿日期: 2024-07-07; 修订日期: 2024-08-25.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400600-2); 国家自然科学基金项目(32273100); 上海市农委科技兴农重点项目(2022-02-08-00-12-F01179).

作者简介: 李姗姗(1999-), 硕士, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: lishanshan9910@163.com

通信作者: 邹曙明, 教授, 研究方向为水产动物育种学. E-mail: smzou@shou.edu.cn

肠道的渗透压调节中起重要作用。水通道蛋白在进化过程中高度保守,对一些硬骨鱼类水通道蛋白的研究发现,在斑马鱼(*Danio rerio*)水通道蛋白家族含有 20 个基因^[17],鲤(*Cyprinus carpio*)和大西洋鲑(*Salmo salar*)中 AQP 家族成员分别高达 38 和 42 个^[17-18]。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)又名武昌鱼,是中国特有的草食性淡水经济鱼类,是我国目前重要的养殖鱼种之一。相较草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲤和鲫(*Carassius auratus*),团头鲂的耐盐能力较差,在 2 盐度的咸水养殖过程中,团头鲂的生长发育受到明显限制^[19]。鉴于 AQP 在鱼类适应盐度变化过程中的重要作用,本研究对团头鲂 AQP 进行鉴定和深入研究。本研究首先利用生物信息学方法对团头鲂 AQP 家族成员进行鉴定,并研究他们的基因结构、染色体定位及其在各组织中的表达模式,并对盐度胁迫下的团头鲂鳃组织特异表达基因进行研究,旨在进一步探究团头鲂 AQP 家族基因结构和功能提供参考,并为深入探究团头鲂适应盐度胁迫提供分子基础。

1 材料和方法

1.1 样品采集及处理

实验使用的团头鲂来自上海海洋大学团头鲂育种基地,选取体重(20 ± 0.5) g,体长(17 ± 0.5) cm 共 100 条,在溶解氧(8.0 ± 0.1) mg/L,温度(25.0 ± 0.5) °C,盐度为 0 的两个玻璃缸($100 \text{ cm} \times 80 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$)中暂养。随机取 3 条暂养 1 周的团头鲂,使用 120 mg/L 间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)进行麻醉,然后取相应组织在液氮中急冻后保存于-80 °C 冰箱中,组织包括心、脾、眼、鳃、肠、肌、肝、肾、皮肤和脑,保存于-80 °C 冰箱中用于后续实验。

1.2 盐度胁迫及取样

为探究团头鲂在盐度胁迫条件下鳃组织形态学变化及 AQP3b 在团头鲂鳃中的表达,对团头鲂进行 7 d 的盐度胁迫实验。挑选 1.1 暂养的健康活泼的团头鲂在水族玻璃缸($35 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$)中进行盐度胁迫实验,共设置 3 个实验组。每组盐度为 2、3、4,对照组盐度为 0,每组设置 3 个

平行。各组分别在 0、1、3、5、7 d 时取 3 尾鱼,每条鱼取左侧第二片鳃固定于波恩氏液中,取右侧第二片鳃保存于-80 °C 冰箱中,用于后续实验。

1.3 团头鲂水通道蛋白基因的筛选鉴定与分析

在 NCBI 数据库下载团头鲂基因组序列、基因组注释文件(GFF)、蛋白序列文件进行团头鲂 AQP 家族基因成员鉴定与分析。以斑马鱼 AQP 家族基因蛋白序列作为输入文件^[20],以团头鲂 GFF 文件作为参考,使用 TBtools 软件获取团头鲂 AQP 家族成员信息,并通过 NCBI Blast 截取 e 值为 e^{-5} 确定 AQP 家族成员。使用 MEGA5.1 的 Clustal W 法对团头鲂 AQP 氨基酸序列进行比对后构建系统发育树。将团头鲂 AQP 蛋白质序列作为输入文件,使用 TBtools 软件分析保守基序,设置鉴定保守基序数量为 15,其他参数为默认值。使用 TBtools 软件分析基因结构,鉴定基因中的蛋白质编码区(coding sequence, CDS)及非翻译区(untranslated region, UTR)。使用在线软件 NCBI-CD search 进行保守结构域分析,最后使用 TBtools 软件对系统进化树、基因结构、基序及保守结构域进行可视化。

1.4 团头鲂 AQP 家族染色体定位、共线性分析及系统发育分析

以团头鲂全基因组注释文件 GFF 为参考,利用 TBtools 软件可视化团头鲂 AQP 染色体定位图,表示所有团头鲂 AQP 家族成员在染色体上的位置信息。使用 TBtools 软件,输入文件为团头鲂全基因组注释文件对团头鲂 AQP 基因进行种内共线性分析。

在 NCBI 数据库下载斑马鱼、鲤、人(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)的 AQP 氨基酸序列。使用 MEGA5.1 软件对所有 AQP 氨基酸序列进行多重序列比对,以 WAG+F 为模型构建系统发育树,并使用在线软件 evolview 对结果进行可视化。

1.5 石蜡切片及 HE 染色

将 1.2 固定于波恩氏液中的鳃组织于 70%乙醇中保存,将处理后的样品修剪成合适大小后经过梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、连续切片(厚度约 $0.6 \mu\text{m}$),鳃组织切片经梯度脱水、苏木精-伊红染色、复水、中性树脂封片,并在光学显微

镜下观察并拍照。使用 ImageJ 软件对水-血屏障距离、相邻两鳃小片距离 d (μm)、层间细胞团的高度 H (μm)、伸出鳃小片的长度 l (μm) 进行测量。每个视野测量 30 次求平均值。

层间细胞团体积: $V = dHl$

1.6 实时荧光定量实验(qRT-PCR)

将保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱的组织, 使用 TRIzol (TaKaRa, 日本)提取组织总 RNA, 使用 Fast-King gDNA Dispelling Super-Mix (天根, 北京, 中国)反

转录为 cDNA 用于实时荧光定量实验。使用 NCBI Pick Primers 在线软件设计引物, 引物序列见表 1, 内参基因选用 18S。样品的荧光定量分析通过使用实时 PCR 检测系统完成, 使用 SYBR Green Ex Taq (TaKaRa, 日本)在 CFX96 Touch real-time PCR 荧光定量仪进行 qRT-PCR 扩增。结果使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算方法分析团头鲂 *AQPs* 在各组织 中及 *AQP3b* 在鳃组织中的相对表达量, 结果表示为 3 个重复的平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Tab. 1 qRT PCR Primer Sequence

引物名称 primer name	序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	引物名称 primer name	序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
AQP0a-F	ATCAACCCAGCTGTCACGTT	AQP8b-F	GTGGCACCGTACCTGATCTC
AQP0a-R	CAGACCACGAGTTGCAGAGT	AQP8b-R	GAGAAGCGTAAATGCCGCAC
AQP0b-F	CCCATGATTGGAGGCGCTAT	AQP9a-F	CATGATGGGCGTCTACGTGT
AQP0b-R	GAGTCTTCAGCTCGATGGGC	AQP9a-R	TGTGTCCTGTGGCGTTGATT
AQP1a.1-F	GCTGAGCTGGTCGGTATGAC	AQP9b-F	GGGCACCTAAAGGCATGGAG
AQP1a.1-R	CAACCCAAATGCAAGTGCCA	AQP9b-R	GTCTCTGGCAGGGTTGATCG
AQP1a.2-F	TCAGTTACACTGGGTGTGGC	AQP10a-F	CTGGGAGACCTAGCCTGGAT
AQP1a.2-R	ATACGCTTGCCAAACGCTTC	AQP10a-R	TGGCAAAGATACTGGCGGTT
AQP3a-F	GAGATTTCGGGCCTCGTCTT	AQP10b-F	TCTTGCA TTGGGAGACCCTC
AQP3a-R	CAATCCTTGCTGGCGATGTC	AQP10b-R	TGCCGGGTTGATGGCATATC
AQP3b-F	TGGCTCGGACATTT CAGGTC	AQP11-F	TTCATTCCACGGTGCGATCT
AQP3b-R	CCATGAGAGCCTCCGCTTAG	AQP11-R	AGCTGACATGAGATCCGTGC
AQP4-F	TGGACAGTTTCAGGAGGTGT	AQP12-F	AGGCGTAAGCGGAAATCCAT
AQP4-R	GGAGGGTTCTCCTGTTTGGC	AQP12-R	ACTTACCGGCAACTACGAGC
AQP7-F	AGGACGGTATTCGAGGCCAT	AQP14-F	CCAGTTGTTCACTTTCGTT
AQP7-R	CTTGTGCAACACAGCCAAGG	AQP14-R	GTGGCTGTCATAACTTGTTT
AQP8a.1-F	AGGACCCGAAGTCATCTTGC	AQP15-F	TTTCTCCGGCATGCTCAACT
AQP8a.1-R	ACCAAAGCACCAGCCATAGG	AQP15-R	CTTAAGCCTGCGACCAATGC
AQP8a.2-F	AACCCCTCCATTACCATCGC	18S-F	ACCGCAGCTAGGAATAATGG
AQP8a.2-R	CCTTTGACATTGCAGCTCCC	18S-R	GGTCGGA ACTACGACGGTAT

2 结果与分析

2.1 水通道蛋白基因的鉴定与分析

在团头鲂基因组中共鉴定出 19 个 *AQPs* 家族成员, 对团头鲂 *AQPs* 的氨基酸序列比对分析发现, 除 AQP12 外, 都至少含有 1 个 NPA 基序(图 1)。如图 2 所示, 团头鲂的 *AQPs* 可分为 4 个亚家族:

(1)经典水通道蛋白, 包括 AQP0a、0b、1a.1、1a.2、4、14、15; (2)氨通道蛋白, 包括 AQP8a.1、8a.2、8b; (3)水甘油通道蛋白, 包括 AQP3a、3b、7、9a、9b、10a、10b; (4)非正统水通道蛋白, 包括 AQP11、12。团头鲂 *AQPs* 相同等级的基因结构相似, motif 组成及排序也较为接近, 且它们都共有一个保守结构域 MIP。

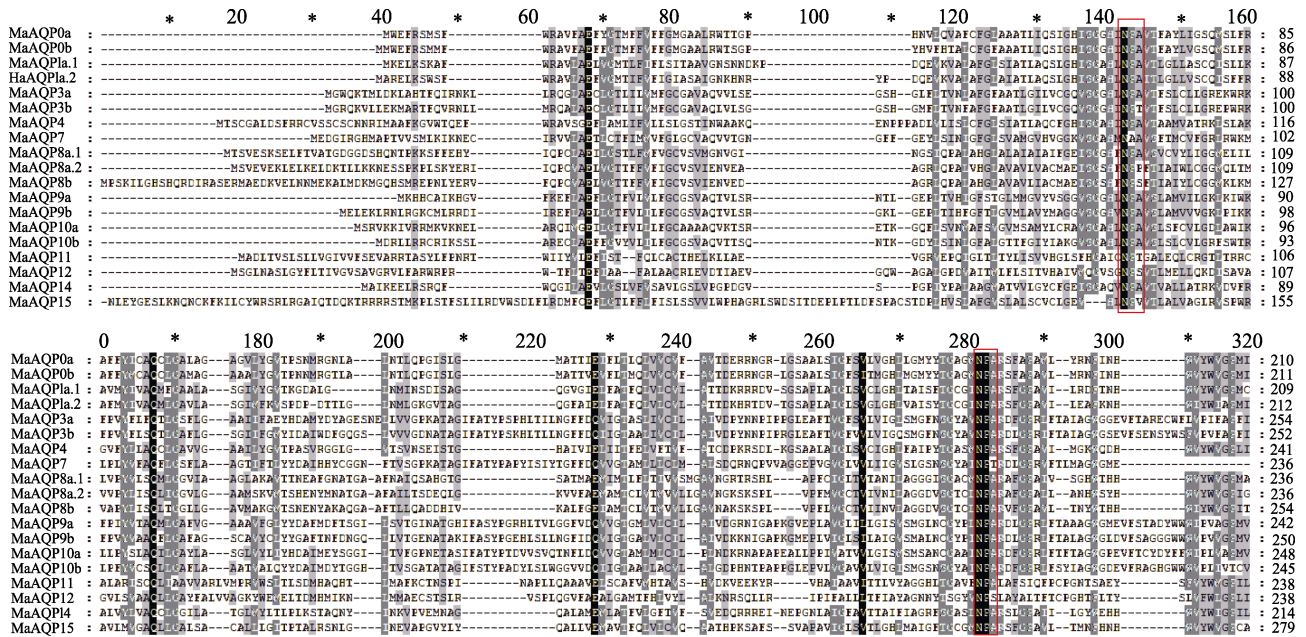


图 1 团头鲂水通道蛋白的氨基酸序列比对

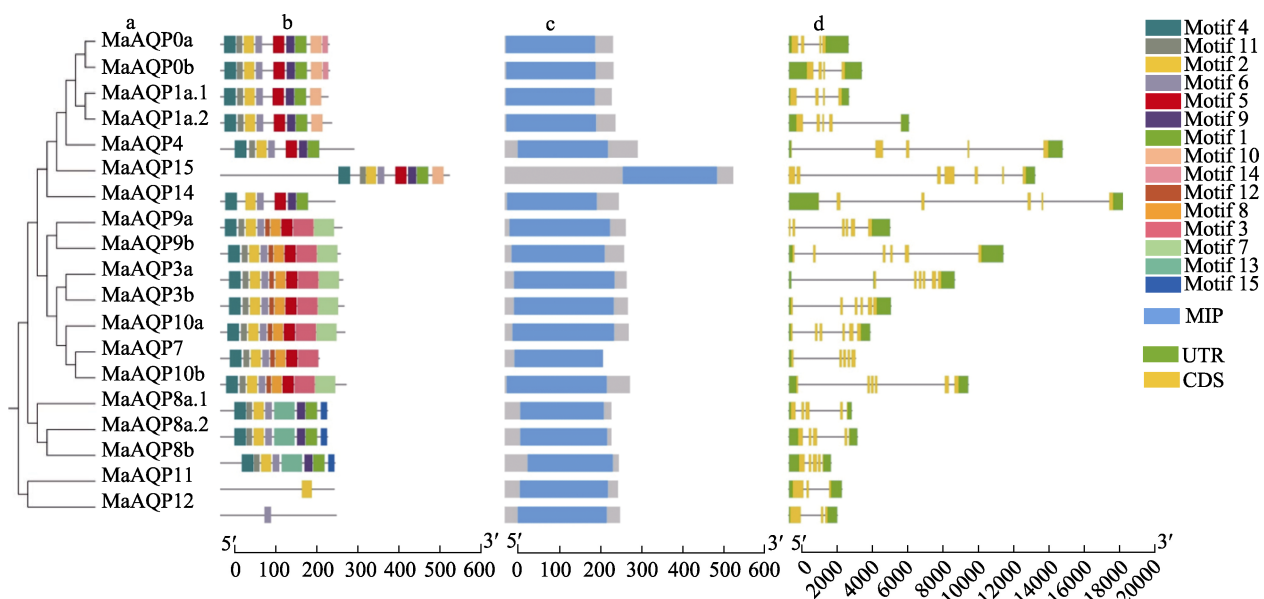
Fig. 1 Amino acid sequence alignment of AQPs in *Megalobrama amblycephala*

图 2 团头鲂 AQP 基因家族的系统发育关系(a)、基序(b)、保守结构域(c)和基因结构(d)

- a. 使用 Clustal W 比对氨基酸序列, 采用最大似然法构建系统发育树; b. 不同的颜色代表不同的基序;
c. 蓝色区域表示保守结构域 MIP 蛋白序列; d. 绿色表示非编码区, 黄色表示编码区, 横线表示内含子。

Fig. 2 Phylogenetic relationship (a), motif (b), conserved domain (c), and gene structure (d) of the AQP gene family in *Megalobrama amblycephala*

- a. Use Clustal W to align amino acid sequences and construct a phylogenetic tree using maximum likelihood method.
b. Different colors represent different motifs. c. The blue area represents the conserved domain MIP protein sequence.
d. Green represents non coding regions, yellow represents coding regions, and horizontal lines represent introns.

2.2 团头鲂 AQP 基因家族染色体定位、共线性分析及系统发育分析

根据团头鲂基因组注释文件种的信息, 使用

TBtools 软件可视化团头鲂 AQP 在染色体上的位置及种内共线性(图 3)。团头鲂 AQP 不均匀分布在 12 条染色体上, 且 AQP9a 未在团头鲂全基因

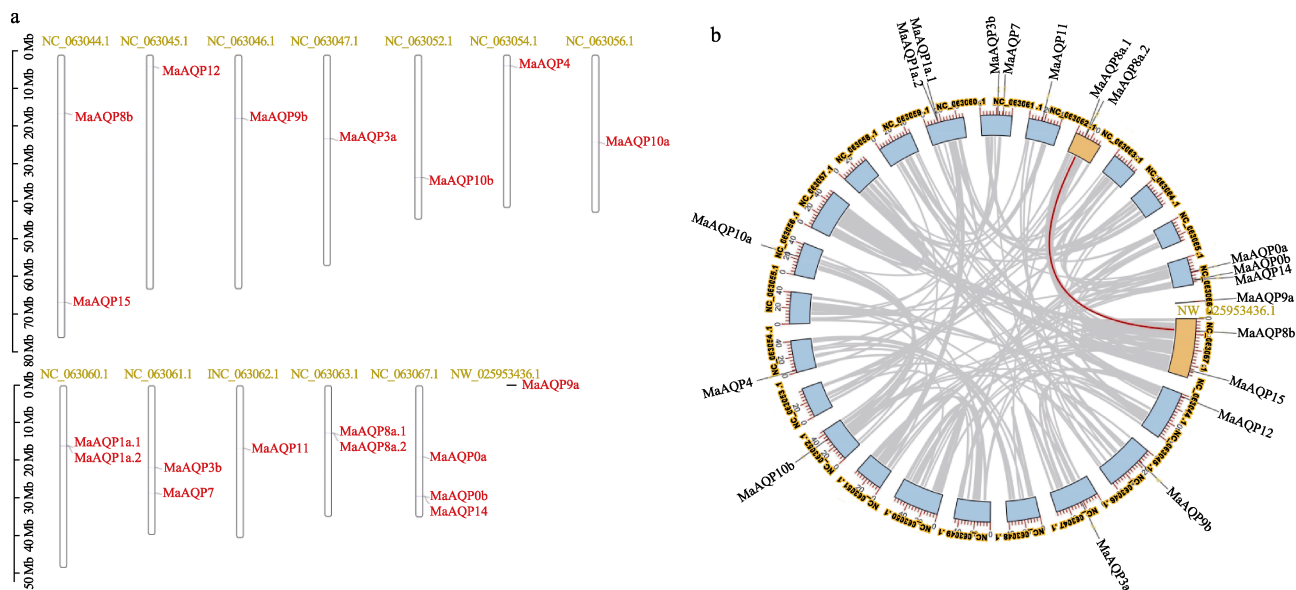


图 3 团头鲂水通道蛋白基因(AQP)家族染色体定位分析(a)及水通道蛋白基因种内共线性分析(b)

a. 图中黄色字体表示染色体编号, 红色字体表示 AQP 基因名称. b. 灰色表示团头鲂所有基因的共线性, 红色表示 AQP 基因家族内共线性.

Fig. 3 Chromosomal localization analysis (a) and intraspecific collinearity analysis (b) of the AQP gene family in *Megalobrama amblycephala*

a. The yellow font in the figure represents the chromosome number, and the red font represents the AQP gene name. b. Gray represents the collinearity of all genes in the pufferfish, while red represents collinearity within the AQP gene family.

组注释文件中找到染色体信息。团头鲂 AQPs 仅有 AQP8a.2 和 AQP8b 具有共线性。

如图 4, 为阐明团头鲂中 AQP 与同源物种及高等脊椎动物的进化关系, 针对团头鲂、斑马鱼、鲤、人和小鼠的 AQP 家族氨基酸序列构建系统发育树。根据同源性 AQP 蛋白可分为 4 个分支, 属于同一亚家族的 AQP 首先聚为同一支, 团头鲂与鲤在亲缘关系上更为接近, 具有较高的相似性。

2.3 团头鲂 AQPs 在各组织中的表达

如图 5, 利用 qRT-PCR 分析团头鲂 AQPs 基因家族成员在团头鲂幼鱼 10 个组织中的表达模式。结果表明, 团头鲂 AQPs 家族成员在心、脑、肌肉和肾脏中的表达量均较低。在脾组织中 AQP3b 表达量较高, 鳃组织中 AQP3b 的表达量最高, 眼组织中 AQP1a.1 表达量较高, 在皮肤组织中 AQP3b 表达量较高, 在肠道组织中 AQP8a.2 具有较高表达量, 在肝脏组织中 AQP12 具有较高表达量。

2.4 团头鲂在盐度胁迫下的鳃组织形态学变化及鳃特异基因表达

如图 6, 显微镜下观察团头鲂鳃组织形态学

变化, 0 d 时相邻鳃小片间充满层间细胞团, 盐度胁迫初期鳃小片间层间细胞团逐渐减少, 随着胁迫时间的延长层间细胞团逐渐恢复。盐度为 2、3 时, 团头鲂鳃小片间细胞团体积在 3 d 时最小, 在 5 d 时层间细胞团体积显著升高 ($P < 0.05$); 盐度为 4 时, 在 1 d 时层间细胞团体积最小, 在 3 d 时已经开始恢复。不同盐度胁迫条件下, 随着胁迫时间的增加, 水-血屏障距离与鳃小片层间细胞团变化趋势相同, 盐度为 2、3 时水-血屏障距离在 3 d 时降到最低, 盐度为 4 时, 在 3 d 时开始逐渐恢复。

如图 7, 团头鲂鳃 AQP3b 在盐度胁迫下的表达量变化趋势均是先降低后升高, 盐度 2 和 3 条件下在 2d 时表达量最低; 4 时, 3 d 时的表达量最低。

3 讨论

3.1 团头鲂 AQP 基因家族成员的序列分析

本研究在团头鲂基因组中共鉴定出了 19 个 AQP 基因, 并将它们分为 4 个亚家族: 经典水通道蛋白、水甘油通道蛋白、氨通道蛋白和非正统水通道蛋白。然而人类基因组中仅有 13 种 AQP

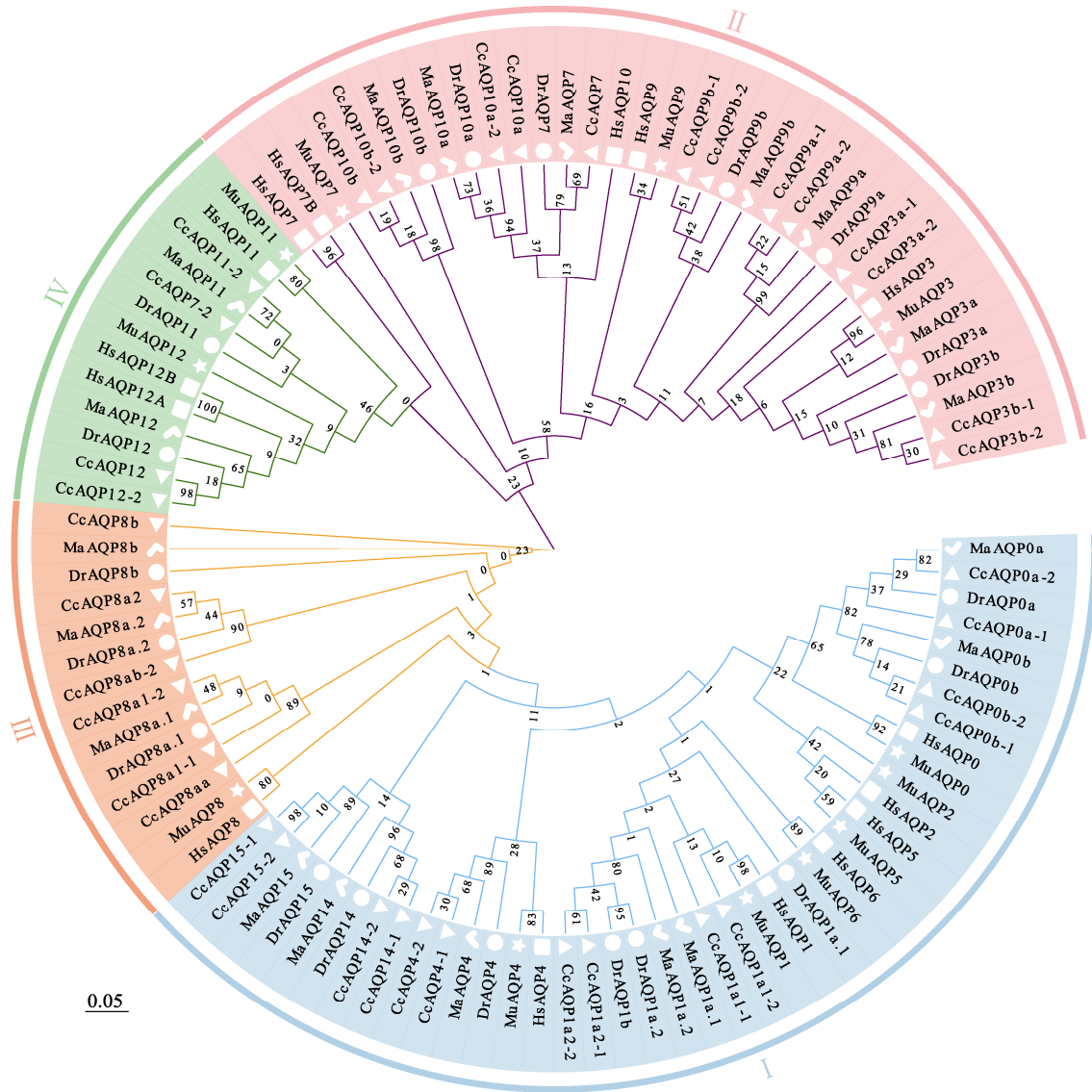


图 4 5 个物种水通道蛋白基因的系统发育树

I: 经典水通道蛋白, II: 水甘油通道蛋白, III: 氨通道蛋白, IV: 非正统水通道蛋白。

Hs: 人; Mu: 小鼠; Dr: 斑马鱼; Cc: 鲤; Ma: 团头鲂。

Fig. 4 Phylogenetic tree of aquaporin genes in five species

I: classic aquaporins, II: glycerol aquaporins, III: ammonia aquaporins, and IV: non-traditional aquaporins.

Hs: *Homo sapiens*; Mu: *Mus musculus*; Dr: *Danio rerio*; Cc: *Cyprinus carpio*; Ma: *Megalobrama amblycephala*.

基因, 斑马鱼有 20 个 *AQP* 基因, 人类 *AQP* 基因家族成员中包括团头鲂没有的 *AQP2*、*AQP5*、*AQP6*^[21-22], 这说明 *AQP* 在进化过程中可能会存在基因缺失的情况。基因结构研究分析发现, 不同基因间基因结构存在较大差异, 同一等级的基因结构相似。保守基序研究结果具有同样的情况, 具有同样功能的基因具有相似的保守基序且保守基序的排列顺序相同。对团头鲂 *AQP* 家族成员的

全基因组复制进行了鉴定和分析结果显示, 共检测出来一对共线性基因——*AQP8a.2* 和 *AQP8b*。团头鲂 *AQPs* 家族成员均具有同一保守结构域 MIP, 与尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的研究结果不同, 在尼罗罗非鱼 *AQPs* 家族成员中 *AQP11* 和 *AQP12* 不包含 *AQP* 基因家族共有的 MIP 结构^[23], 这表明在基因组进化过程中基因结构和功能会发生不同程度的改变。

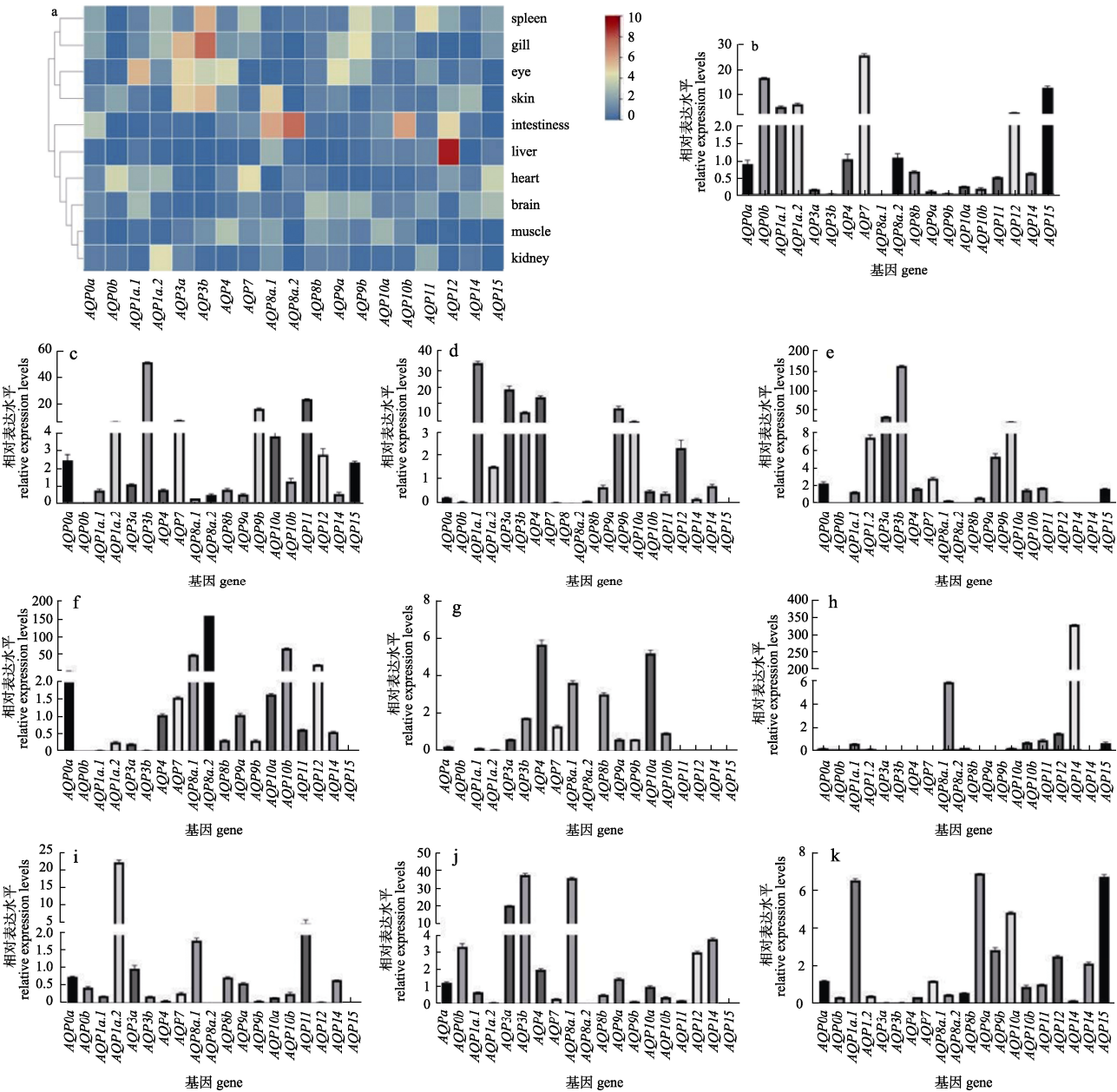
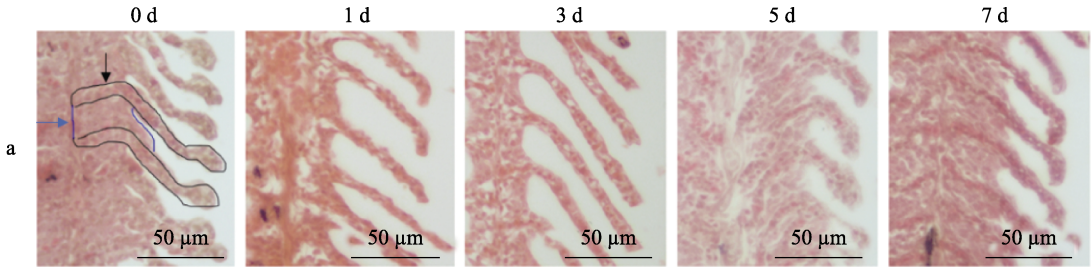


图 5 团头鲂 AQP 基因表达谱(a)及在各组织中相对表达水平(b-k)

a. 表达谱; b. 心脏; c. 脾; d. 眼; e. 鳃; f. 肠; g. 肌肉; h. 肝; i. 肾; j. 皮肤; k. 脑.

Fig. 5 Expression profile (a) of AQP gene in *Megalobrama amblycephala* and its expression level in different tissue (b-k)
a. Expression profile; b. Heart; c. Spleen; d. Eye; e. Gill; f. Intestines; g. Muscle; h. Liver; i. Kidney; j. Skin; k. Brain.



(待续 to be continued)

(续图 6 Fig. 6 continued)

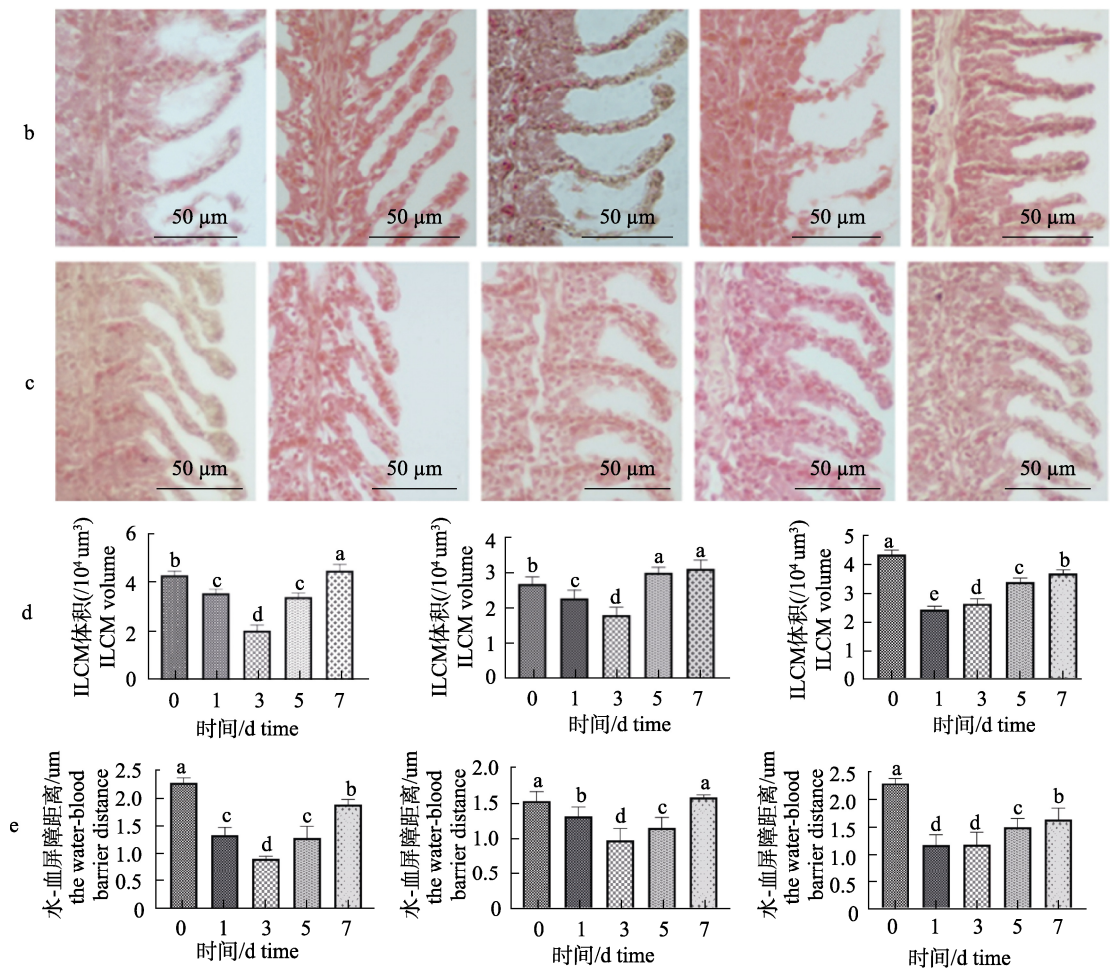


图 6 不同盐度下团头鲂鳃组织形态(a-c)、鳃组织层间细胞团体积(d)和水-血屏障距离(e)变化
a. 盐度为 2; b. 盐度为 3; c. 盐度为 4; d. 层间细胞团体积; e. 水-血屏障距离. 不同字母表示显著差异性($P<0.05$).
黑色箭头表示鳃小片、蓝色箭头表示层间细胞团.

Fig. 6 Changes in gill tissue morphology (a-c), inter layer cell mass volume (d), and water blood barrier distance (e) of the blunt snout bream under different salinity levels
a. Salinity is 2, b. Salinity is 3, c. Salinity is 4, d. ILCM volume, e. Water blood barrier distance. Different letters represent significant differences ($P<0.05$).
The black arrow represents gill fragments, and the blue arrow represents interlayer cell clusters

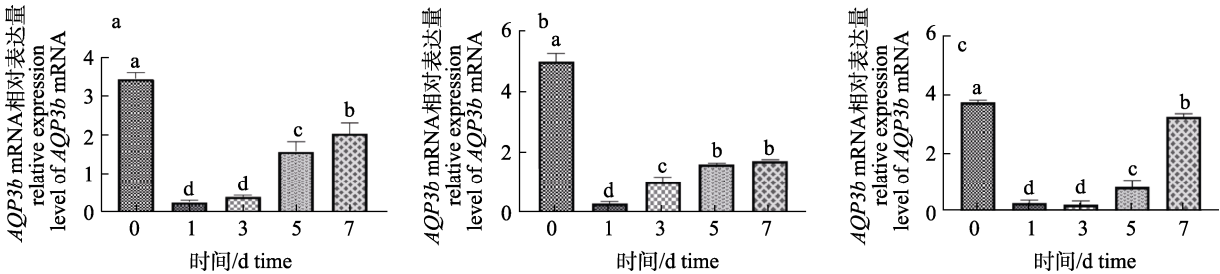


图 7 *AQP3b* 在 2 (a)、3 (b)、4 (c)盐度条件下基因相对表达量变化
不同字母表示不同胁迫时间之间显著差异($P<0.05$).

Fig. 7 Changes in relative gene expression of *AQP3b* under salinity conditions of 2 (a), 3 (b), and 4 (c)
Different letters represent significant differences between different times ($P<0.05$).

3.2 团头鲂 AQP 基因家族成员的表达分析

鱼类具有特异性基因组复制功能,且在基因组复制过程基因功能会发生变化。在本研究中发现,同一 AQPs 的两个拷贝具有相似的表达模式,如 AQP3a 和 AQP3b、AQP8a.1 和 AQP8a.2,在某些基因的不同拷贝中也发现了不同的表达模式,如 AQP1a.1 和 AQP1a.2。在硬骨鱼类中 AQPs 基因在各组织中广泛表达。其中, AQPs 基因在斑马鱼中的鳃和眼中表达量较高^[20],在瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)的鳃和肾脏中的表达量较高^[24]。本研究使用基因特异性引物进行 qRT-PCR,以检测 AQPs 家族成员在团头鲂各组织中的表达水平, AQPs 家族基因在团头鲂的 10 个组织中广泛表达,且在各组织和器官中的表达量差异较大,例如 AQP3b 在团头鲂各组织中广泛表达,但仅在渗透压调节器官鳃组织中的表达量最高, AQP8a.2 在肠道中具有较高表达量,而肝脏组织中 AQP12 的表达量较高。在模式生物斑马鱼中 AQPs 基因的表达模式并不相同^[25], AQP3b 在视网膜中表达, AQP12 在脑部、肝脏、胰腺和肠道中表达。AQPs 基因在不同物种和不同组织中的表达和功能均具有较大差异性,有研究表明 AQP1 可促进鳗鱼鳃组织的气密性^[26], AQP3、AQP9a 分别在鳃组织和肠道中起渗透调节作用^[27-28]。

3.3 团头鲂在盐度胁迫下的鳃组织形态学变化及团头鲂 AQP3b 的相对表达量变化

为探究团头鲂在盐度胁迫下的适应性变化,本研究对盐度胁迫下的团头鲂鳃组织形态进行观察。在盐度胁迫初期,层间细胞团肿胀脱落,水-血屏障距离缩短,随着胁迫时间的延长,团头鲂逐渐适应外界环境变化,层间细胞团和水-血屏障距离逐渐恢复。团头鲂的这一鳃组织形态变化为团头鲂适应环境盐度提供积极作用,可减少团头鲂在呼吸上的能量消耗。团头鲂鳃组织形态这一变化与青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)在盐度胁迫下鳃组织形态学变化相同^[29]。对团头鲂 AQPs 在各组织的表达研究发现, AQP3b 在调节渗透压的鳃组织中表达量相对较高。对盐度胁迫条件下团头鲂 AQP3b 表达量研究发现,当环境盐度升高时,团头鲂鳃组织层间细胞团体积及鳃

AQP3b 的相对表达量显著降低;但是随着胁迫时间的增加又逐渐恢复。本研究结果表明, AQP3b 在团头鲂鳃组织渗透压调节中起到关键作用。这一在其他鱼类中也有类似的发现,将遮目鱼(*Chanos chanos*)从淡水中转移至海水中,其鳃组织 AQP3 的表达显著降低;相反,在海水到淡水组 AQP3 相对表达量升高^[27]。在罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、日本鳗(*Anguilla japonica*)和青鳉(*Oryzias latipes*)中也发现了类似的结果^[29-31]。团头鲂在盐度胁迫条件下的这一适应性变化为深入研究团头鲂在盐度胁迫下的生理机制提供基础。

参考文献:

- [1] Preston G M, Jung J S, Guggino W B, et al. Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(3): 1668-1673.
- [2] Heymann J B, Engel A. Aquaporins: Phylogeny, structure, and physiology of water channels[J]. News in Physiological Sciences, 1999, 14: 187-193.
- [3] Denker B M, Smith B L, Kuhajda F P, et al. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules[J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(30): 15634-15642.
- [4] Preston G M, Carroll T P, Guggino W B, et al. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein[J]. Science, 1992, 256(5055): 385-387.
- [5] Chauvigné F, Yilmaz O, Ferré A, et al. The vertebrate Aqp14 water channel is a neuropeptide-regulated polytransporter[J]. Communications Biology, 2019, 2: 462.
- [6] Chauvigné F, Boj M, Finn R N, et al. Mitochondrial aquaporin-8-mediated hydrogen peroxide transport is essential for teleost spermatozoon motility[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 7789.
- [7] MacIver B, Cutler C P, Yin J, et al. Expression and functional characterization of four aquaporin water channels from the European eel (*Anguilla anguilla*)[J]. The Journal of Experimental Biology, 2009, 212(17): 2856-2863.
- [8] Engelund M B, Chauvigné F, Christensen B M, et al. Differential expression and novel permeability properties of three aquaporin 8 paralogs from seawater-challenged Atlantic salmon smolts[J]. The Journal of Experimental Biology, 2013, 216(Pt 20): 3873-3885.
- [9] Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot B L, et al. Structure and

- function of water channels[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2002, 12(4): 509-515.
- [10] Kitchen P, Salman M M, Pickel S U, et al. Water channel pore size determines exclusion properties but not solute selectivity[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 20369.
- [11] Hub J S, de Groot B L. Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins[J]. *PNAS*, 2008, 105(4): 1198-1203.
- [12] Beitz E, Wu B H, Holm L M, et al. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons[J]. *PNAS*, 2006, 103(2): 269-274.
- [13] Giffard-Mena I, Boulo V, Aujoulat F, et al. Aquaporin molecular characterization in the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*): The effect of salinity on AQP1 and AQP3 expression[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 148(2): 430-444.
- [14] Fabra M, Raldúa D, Power D M, et al. Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated[J]. *Science*, 2005, 307(5709): 545.
- [15] Liu X, Liang X Y, Wang C Y, et al. Expression characteristics of genes related to osmotic pressure regulation in *Takifugu obscurus* during salinity acclimation[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, 30(3): 297-308. [刘鑫, 梁夏颖, 王超宇, 等. 暗纹东方鲀渗透压调节相关基因响应盐度变化的表达特征[J]. *中国水产科学*, 2023, 30(3): 297-308.]
- [16] Yang J J, Zhang J S, Wei K, et al. Cloning and expression of four aquaporin homologs from the Chinese black sleeper (*Bostrychus sinensis*): The effects of salinity acclimation[J]. *Biochemical Genetics*, 2021, 59(4): 837-855.
- [17] Finn R N, Chauvigné F, Hlidberg J B, et al. The lineage-specific evolution of aquaporin gene clusters facilitated tetrapod terrestrial adaptation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113686.
- [18] Cerdà J, Chauvigné F, Finn R N. The physiological role and regulation of aquaporins in teleost germ cells[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 969: 149-171.
- [19] Zang W L, Wang W, Ye L, et al. Toxic effects of salinity (‰) on some freshwater fishes[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1989, 20(5): 445-452. [臧维玲, 王武, 叶林, 等. 盐度对淡水鱼类的毒性效应[J]. *海洋与湖沼*, 1989, 20(5): 445-452.]
- [20] Tingaud-Sequeira A, Calusinska M, Finn R N, et al. The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10: 38.
- [21] Johansson I, Karlsson M, Johanson U, et al. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2000, 1465(1-2): 324-342.
- [22] Finn R N, Cerdà J. Aquaporin evolution in fishes[J]. *Frontiers in Physiology*, 2011, 2: 44.
- [23] Ni P, Zhao X, Liang Y J. Genome-wide identification and expression analysis of the aquaporin gene family reveals the role in the salinity adaptability in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Genes & Genomics*, 2022, 44(12): 1457-1469.
- [24] Venisse J S, Öunapuu-Pikas E, Dupont M, et al. Genome-wide identification, structure characterization, and expression pattern profiling of the aquaporin gene family in *Betula pendula*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(14): 7269.
- [25] Wang S P, Qin Y Y, Sheng J J, et al. Aquaporin 8ab is required in zebrafish embryonic intestine development[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2022, 54(7): 952-960.
- [26] Drechsel V, Schneeberger G, Fiechtner B, et al. Aquaporin expression and cholesterol content in eel swimbladder tissue[J]. *Journal of Fish Biology*, 2022, 100(3): 609-618.
- [27] Zhan F F. Genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression pattern profiling of the aquaporin family genes in *Leuciscus waleckii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023. [詹菲菲. 碱度胁迫下瓦氏雅罗鱼 Aqp 基因家族的鉴定及其表达、进化分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.]
- [28] Lin Y T, Wu S Y, Lee T H. Salinity effects on expression and localization of aquaporin 3 in gills of the euryhaline milkfish (*Chanos chanos*)[J]. *Journal of Experimental Zoology Part A, Ecological and Integrative Physiology*, 2023, 339(10): 951-960.
- [29] Kim Y K, Watanabe S, Kaneko T, et al. Expression of aquaporins 3, 8 and 10 in the intestines of freshwater- and seawater-acclimated Japanese eels *Anguilla japonica*[J]. *Fisheries Science*, 2010, 76(4): 695-702.
- [30] Madsen S S, Bujak J, Tipsmark C K. Aquaporin expression in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in freshwater and seawater: Challenging the paradigm of intestinal water transport?[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2014, 217(17): 3108-3121.
- [31] Watanabe S, Kaneko T, Aida K. Aquaporin-3 expressed in the basolateral membrane of gill chloride cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* adapted to freshwater and seawater[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2005, 208(14): 2673-2682.

Identification of aquaporin family genes and expression study under salinity stress in the blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*

LI Shanshan^{1,2,3}, YU Xinxin^{1,2,3}, ZHENG Guodong^{1,2,3}, ZOU Shuming^{1,2,3*}

1. Genetics and Breeding Center for Blunt Snout Bream, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Aquaporin (AQP) is a transmembrane transport protein that plays an important role in biological processes such as water balance and osmotic pressure regulation. The blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) is a unique herbivorous freshwater economic fish species in China that presents limited growth at a salinity of 2. To further investigate the structure and function of AQPs in the blunt snout bream and its adaptive characteristics under salinity stress, 19 AQP genes were identified throughout the entire genome of the blunt snout bream using bioinformatics methods, which showed that they were unevenly distributed on 12 different chromosomes. According to the phylogenetic relationships, gene structure, and motif analysis, the AQPs of the blunt snout bream can be divided into four subfamilies. Moreover, the gene structure, motif composition, and sequence of the same subfamily were relatively similar. Multiple sequence alignment of the AQP protein sequences of the blunt head bream with other bony fish and higher vertebrates was performed, and a phylogenetic tree was constructed. The results revealed that the AQP of the blunt head bream was highly conserved during the evolutionary process, which is of great significance for further research on the role of the blunt head bream AQPs. The qRT PCR study showed that the expression of 19 AQPs was generally low in 10 tissues, including the gills, kidneys, intestines, and liver of the pufferfish. Among them, only the expression of AQP3b was highest in the gill tissue responsible for osmotic pressure regulation. AQP8a.2 was highly expressed in the intestine, while AQP12 was highly expressed in the liver tissue. Further research has shown that under salinity stress of 2–4, there is a positive correlation between the volume change of interlayer cell clusters (ILCM) in the gill tissue and the expression level of AQP3b in the gills of the blunt snout bream. In the initial stage of salt stress, the expression level of AQP3b gene significantly decreased with the increase of stress time ($P < 0.05$), but gradually recovered after adapting to salt stress. This indicates that the blunt snout bream undergoes gill remodeling under salinity stress to maintain osmotic pressure balance within the body. This research result indicates that AQP3b plays an important role in salinity adaptation and osmotic pressure regulation in the gill tissue of blunt snout bream. The systematic study and analysis on the AQPs of the blunt snout bream revealed that members of the family of AQPs exhibit evolutionary and functional conservation. The study on the morphology of the gill tissue and expression level of AQP3b in the gills of the blunt snout bream showed that tissue and gene coordination occurs in response to salinity stress and has positive regulatory effects on osmotic pressure changes, thereby helping the fish to adapt to environmental changes more quickly. The results of this study provide a molecular basis for further research on the adaptation mechanism of blunt snout bream.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; aquaporin; gene family; gene expression; gill remodeling; salinity stress

Corresponding author: ZOU Shuming. E-mail: smzou@shou.edu.cn.