

DOI: 10.12264/JFSC2021-0264

5-HT1A 受体在翘嘴鱥中的表达及 DNA 甲基化分析

庄武元^{1,2}, 梁旭方^{1,2}, 肖倩倩^{1,2}, 张志陆^{1,2}, 蔡文静^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院, 华中农业大学鳜鱼研究中心, 湖北 武汉 430070;

2. 长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心, 湖北 武汉 430070

摘要: 动物可通过学习记忆适应复杂的生存环境, 而 5-HT1A 受体在学习记忆中发挥重要作用。为探究 5-HT1A 受体在翘嘴鱥(*Siniperca chuatsi*)驯化过程中摄食及食性巩固的作用, 本研究采用同源序列比对的方式, 在翘嘴鱥基因组获取了 *htr1a* 基因的序列, 通过序列比对和进化树分析, 发现其有两个亚型, 分别命名为 *htr1aa* 和 *htr1ab*, 其编码的氨基酸序列与斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)具有较高的同源性, 相似度都大于 70%, 进化关系上与狼鲈(*Dicentrarchus labrax*)最为相近, 表明翘嘴鱥 *htr1a* 基因在进化中具有较高的保守性。此外, 本研究还分析了翘嘴鱥 *htr1a* 基因的表达和 DNA 甲基化。与经过一次驯化组相比, 在二次驯化组中 *htr1aa* 基因表达显著降低($P<0.05$), 同时 DNA 甲基化也显著降低, 而 *htr1ab* 基因在两组中表达没有显著变化($P>0.05$)。而与摄食相关的食欲基因 *pomc* 的表达, 二次驯化比一次驯化组显著降低($P<0.05$)。以上结果说明, 翘嘴鱥食性驯化过程中, 可能通过 *htr1aa* 基因启动子区域的甲基化状态改变 *htr1aa* 的转录水平, 从而影响学习记忆通路中关键因子抑制食欲因子 *pomc* 的表达。由此认为 *htr1aa* 的 DNA 甲基化可能在翘嘴鱥摄食相关基因表达上发挥重要调控作用。

关键词: 翘嘴鱥; 5-HT1A 受体; DNA 甲基化; *pomc*; *npy*

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)06-0803-11

学习记忆是动物为更好适应环境通过群体或个体之间的学习获得信息的过程。其中最重要的包括获得新的觅食能力^[1]和食物偏好^[2-4]。关于学习记忆的研究主要集中在哺乳动物上^[5], 但目前在鱼类中也发现学习记忆影响着其行为变化^[6]。在翘嘴鱥(*Siniperca chuatsi*)^[7]、孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)^[8]的研究中发现学习记忆对鱼类的摄食有促进作用。目前在动物上的研究表明, 学习记忆过程与其控制能量平衡的神经以及生理基础之间存在着非常密切的关系, 通过各种内分泌信号相互作用于脑内的神经元, 达到对摄食的控制^[9]。但是学习记忆参与摄食调控的机制尚不明确。

动物的摄食受单胺系统、神经肽和激素之间复杂的相互作用的调节^[10-11]。在哺乳动物中血清

素(5-HT)被认为是参与控制食物摄入量的单胺神经递质之一, 一般通过激活中央血清素神经元减少食物摄入量^[10]。而在鱼类中 5-HT 对摄食的调控作用也被证实^[12]。最近的几项研究表明, 在鱼类中 5-HT 可以抑制食物的摄入, 例如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[13]、翘嘴鱥^[14]、金鱼(*Carassius auratus*)^[15]。5-HT 的作用是由大量相关受体介导的^[16], 在哺乳动物中, 5HT1B 和 5-HT2C 受体亚型是参与 5-HT 厌食作用 5-HT 受体的主要类型^[17-18], 但是有人指出其他亚型的血清素受体, 如 5-HT1A 受体, 也可以参与调解食性变化^[19]。最近从虹鳟获得的证据表明, 5-HT 的厌食作用可能是通过激活 5-HT1A 和 5-HT2C 类似受体调解的^[20]。有研究调查了 5-HT1A 受体在学习和记忆

收稿日期: 2021-06-07; 修订日期: 2021-07-29.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31772822); 现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-46).

作者简介: 庄武元(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类营养与生理. E-mail: wuyuanzhuang_@163.com

通信作者: 梁旭方, 博士, 教授, 研究方向为鱼类摄食与饲料利用功能基因组学. E-mail: xufang_liang@hotmail.com

中的作用,体外注射几种 5-HT1A 受体激动剂会抑制学习性能^[21-24],但 5-HT1A 受体拮抗剂则会促进学习^[25],这表明 5-HT1A 受体在控制抑制性学习中发挥作用。

实验室前期研究表明胃蛋白酶基因(pepsinogen, *pep*)和生长激素基因(growth hormone, *gh*)是鱲的驯化性状关键基因,可能与其摄食相关^[26],而 5-HT 作为影响食物摄入的重要神经递质,这种神经递质参与了学习记忆中关于摄食的神经元网络,在金鱼^[27]和虹鳟^[28]中都得到证实,但在翘嘴鱲上没有更多报道关于可能参与影响驯化过程中摄食的血清素及其受体基因的数据,结合当前有研究报道从表观遗传的角度证实 DNA 甲基化影响到鱼类驯化后摄食及食性^[29]。因此为探究摄食及食性巩固过程中学习记忆的表观遗传调节,笔者比较了驯化 1 次和驯化 2 次翘嘴鱲 5-HT1A 受体基因的表达及甲基化水平是否对厌食神经肽(proopiomelanocortin, *pomc*)和促食神经肽 Y (neuropeptide Y, *npy*)的表达存在调控作用。为进一步探讨学习记忆对鱼类摄食调控的分子机制,并进一步完善翘嘴鱲人工饲料驯化技术理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼养殖及样品采集

实验用鱲购自武汉四汇水产科技有限公司(中国,武汉),饲养在华中农业大学水产基地。鱲暂养在恒流过滤水的鱼缸中,体积 350 L,水温控制在(22±2) °C,同时采用空气泵充氧。每缸放置 15 尾翘嘴鱲。每天投喂 2 次(9:00、17:00),定量饱食投喂 20% 鱼体质量的活饵料鱼,适应环境 3 d,保证翘嘴鱲能够正常摄食,并且状态良好,投喂结束后及时清除排泄物。

本次实验鱼是根据窦亚琪等^[29]2018 年驯化方法驯化,从 1 次驯食实验组和 2 次驯食实验组中各随机选取了 7 尾鱲。随机选择其中 6 尾鱲用于进行基因表达水平分析和 DNA 甲基化水平分析,每组剩余的 1 尾鱲作为备用样品。每次驯化训练结束后,鱲用 MS-222 (雷德蒙德市,华盛顿州,美国)(200 mg/L)深度麻醉后立即置于冰盘上解剖取脑组织样品,然后将鱲脑组织样品迅速在

液氮中冷冻并储存在-80 °C 冰箱中用于后续 RNA 和 DNA 的提取分离,以用于检测基因表达水平和 DNA 甲基化水平。

鱲脑组织的总 RNA 采用 RNA Trizol Reagent 试剂盒(TaKaRa, Tokyo, Japan)进行提取,按照说明书的步骤进行提取操作。在 BioTek Synergy 2 luminometer (BioTek, Winooski, VT, USA) 仪器上测定总 RNA 的纯度和含量,确保 RNA 的 A260/A280 值大于 2.0,并使用 1% 的琼脂糖凝胶(BioWest Agarose, Madrid, Spain)进行电泳检测以确保总 RNA 的完整性。根据说明书的步骤,采用 Revert Aid™ Reverse Transcriptase (TaKaRa, Tokyo, Japan) 对总 RNA 进行反转录程序,从 1 μg 总 RNA 获得终体积为 20 μL 的 cDNA, 反转录 PCR 程序为 50 °C, 15 min, 80 °C, 5 s。

1.2 实验方法

1.2.1 翘嘴鱲 *htr1aa* 和 *htr1ab* 的基因结构、多重比对及系统进化树分析

翘嘴鱲 *htr1a* 序列来自笔者所在课题组翘嘴鱲基因组数据库,发现有两个亚型,将得到的 *htr1aa* 和 *htr1ab* 序列在 NCBI 上比对,确定其可靠性。根据内含子以 GT 起始并以 AG 终止的原则,分析获取的翘嘴鱲 *htr1aa*、*htr1ab* 基因 cDNA 序列和基因组序列,确定其编码序列的碱基组成。并与斑马鱼、青鳉、狼鲈、虹鳟和三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)比较 *htr1aa*、*htr1ab* 的基因结构。

利用 The Sequence Manipulation Suite (<http://www.bio-soft.net/sms/>) 预测 *htr1aa* 和 *htr1ab* CDS 序列编码的氨基酸序列,并使用在线软件 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 与其他物种进行氨基酸序列多重比对。系统进化树分析使用了斑马鱼、三刺鱼、狼鲈、虹鳟、青鳉、人(*Homo sapiens*)、鼠(*Mus musculus*)、斑点雀鳝(*Lepisosteus oculatus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)、红旗东方鲀(*Takifugu rubripes*)、花斑剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)、加州鲈(*Micropterus salmoides*)物种的 *htr1aa* 或 *htr1ab* 氨基酸序列,且均从 Ensembl 或 GenBank 数据库中获得。用 ClustalW2 对与列举的物种的 *htr1aa* 或 *htr1ab* 进行氨基酸序列多重比对后,再用 MEGAX 软件以邻接法

(neighbor-joining, NJ)构建进化树(bootstrap=1000)。

1.2.2 翘嘴鱥相关基因的 mRNA 表达水平分析 利用实时荧光定量 PCR 技术对 *htr1aa*、*htr1ab*、*npy*、*pomc* 基因的 mRNA 表达水平进行检测, 根据基因序列设计的引物如表 1 所示。实时荧光定量 PCR 在定量热循环仪(MyIQ™ 2 Two-Color Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD, Hercules, CA, USA)上进行检测。鱥 *rpl13a* (60S ribosomal protein L13a)基因作为内参基因, 可用以标准化模板量。每个 cDNA 样品进行 3 个技术重复。按照 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme Biotech Co., Piscataway, NJ, USA)的说明书, 总体积 20 μL 的反应体系如下: 10 μL AceQ qPCR SYBR Green Master Mix, 1 μL cDNA, 上下游引物(由上海生工合成)各 0.4 μL (10 μmol/L), 和 8.2 μL ddH₂O。PCR 反应循环参数为: 95 °C 预变性 3 min; 然后如下程序进行 40 个循环, 即

95 °C 变性 10 s, 58 °C (根据不同引物的退火温度)退火 30 s; 绘制熔解曲线(从 65 °C 以 0.5 °C/s 速率逐渐升到 95 °C, 每隔 6 s 采集 1 次数据信号)。采用优化的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 以 *rpl13a* 基因的定量表达水平为内参进行分析。通过 PCR 产物测序和熔解曲线确定引物具有较好的特异性。采用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme Biotech Co., Piscataway, NJ, USA)说明书的步骤测定引物扩增效率, 区间在 98%~105%。基因表达水平相对于内参基因表达水平, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算(Livak and Schmittgen 2001)。每个 cDNA 样本进行了 3 次重复扩增。数据使用 CFX Manager™ software (Version 1.0) 进行计算。每个样本的 ΔC_t 值减去校准值为 $\Delta\Delta C_t$, 基因表达水平使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算, 值以相对于设定的对照组值的倍数来表示。基因表达以相对于校准值的倍数表示, 校准值的单位为 1 个任意单位。

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物序列
Tab. 1 Nucleotide sequences of the primers for real-time PCR

基因 gene name	引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	退火温度/°C annealing temperature	产物大小/bp product size
<i>htr1aa</i>	htr1aa-F	TCTCCTCCACATCCGTTTC	55	217
	htr1aa-R	AACTGCCCTCACTCACAA		
<i>htr1ab</i>	htr1ab-F	GCTCACGCTGATGCTGGTT	58	282
	htr1ab-R	AGGTTGCCTTGAGTTGCT		
<i>rpl13a</i>	rpl13a-F	TATCCCCCACCCTATGACA	59	100
	rpl13a-R	ACGCCCAAGGAGAGCGAACT		
<i>npy</i>	npy-F	GTTGAAGGAAAGCACAGACA	52	202
	npy-R	GCTCATAGAGGTAAAAGGGG		
<i>pomc</i>	pomc-F	GGCTGAAGATGGTGTCTATG	56	268
	pomc-R	ACATGCAGAGGTGAATACAGTC		

1.2.3 翘嘴鱥 *htr1a* 基因 DNA 甲基化水平分析和亚硫酸氢盐硫化 PCR (BSP) 将从一次驯化实验组和二次驯化实验组中各随机选取的 6 尾鱥的脑组织进行下一步分析。采用 TIANamp Genomic DNA Kit (Tiangen, Beijing, China)试剂盒说明书的标准步骤提取基因组 DNA。采用 EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) 试剂盒说明书的标准步骤进行基因组 DNA 的亚硫酸氢盐修饰。原理如下: 基因组 DNA 中甲基化胞嘧啶碱基不转变, 同时, 未甲基化胞嘧啶脱氨

基并转变成尿嘧啶, 经亚硫酸氢盐硫化 PCR (Bisulphite Sequencing Polymerase Chain Reaction, BSP) 扩增后为胸腺嘧啶, 从而区别甲基化/未甲基化的两类胞嘧啶。从实验室翘嘴鱥全基因组中获得 *htr1aa* 和 *htr1ab* 的全序列, 基因 5'侧翼区的序列, 第一外显子区的序列, ATG 上游 3000 bp 的序列, 提交至在线预测网站 Methprimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 进行预测以获得 CpG 岛(CGI)和候选 CpG 位点。鱼类 CpG 岛无明确定义, 选择默认参数并根据情

况进行调整，默认搜索参数如下：CpG 岛片段大小(Island size)>100 bp, GC 碱基含量(GC Percent)>50.0%，CpG 岛观察值/预测值(Observed/Expected, Obs/Exp)>0.6。BSP 引物由在线软件 MethPrimer 14.0 推荐，然后用 Primer 5.0 检测是否合格，比较后采用特异性高引物用于 BSP 的扩增，扩增引物序列见表 2。采用 Taq plus DNA Polymerase (Vazyme Biotech, Nanjing, China) 在 Biometra Thermo cyclers (Biometra, Göttingen, Germany) 仪器上进行 PCR。PCR 反应循环参数为：94 °C 预变性 5 min；然后如下程序进行 40 个循环，即 94 °C 变性 30 s, 49 °C (根据不同引物的退火温度)退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s；之后 72 °C 延伸 7 min，最终 12 °C 降温 10 s

后结束。采用 Gel Purification Kit (Sangon, Shanghai, China) 试剂盒纯化 PCR 产物，然后克隆至载体 pMD18-T clone vector (Takara, Tokyo, Japan) 中。每个实验组中，先随机选取 2 个样品进行预扩增及分析，存在 DNA 甲基化后检测全部 6 个样品。每个样品随机选取 5 个阳性克隆送至上海生工 (ABI3730 测序仪, Applied Biosystems) 进行测序，每个驯食实验组总共收集成功测序的 30 个阳性克隆，经测序得到 DNA 序列。采用在线网站 QUMA (QUantification tool for Methylation Analysis)(<http://quma.cdb.riken.jp/>) 将测序序列与亚硫酸氢盐修饰前原序列进行比对分析，根据比对结果确定候选 CpG 位点是否发生甲基化以及甲基化水平。

表 2 用于亚硫酸氢盐硫化 PCR(BSP)扩增检测 DNA 甲基化水平的引物序列

Tab. 2 Nucleotide sequences of the primers for BSP (bisulphite sequencing polymerase chain reaction) amplification and DNA methylation analysis

基因 gene name	引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	退火温度/°C annealing temperature	产物大小/bp product size
<i>htr1aa</i>	BSP1 <i>htr1aa</i> F	TGGGGTTTATTTGTTATTGAAGTA	52	237
	BSP1 <i>htr1aa</i> R	ACTTTTCAACTCACCTCTTTATAAT		
	BSP2 <i>htr1aa</i> F	ATAGTAGTTAAATGAAGTTGGTTAAA		
	BSP2 <i>htr1aa</i> R	TTTATTACATCTCAAAATATAATATCA		
<i>htr1ab</i>	BSP <i>htr1ab</i> F	TTGTAGTTAAAAATAAGGAAATATTAT	56	205
	BSP <i>htr1ab</i> R	AAAATTATCAACTCAAACCAAACC		

1.3 统计分析

采用软件 SPSS 22.0 (IBM, Chicago, IL, USA) 的 Shapiro-Wilk 法标准化数据，进行单因素方差分析。检查方差齐性之后，通过 Duncan's multiple range test (MRT) 法检测均值间差异。实验组组间候选 CpG 位点甲基化水平的差异使用 2×2 卡方检验(χ^2 test) 分析，实验组组间基因表达水平的差异使用独立样本 T 检验分析， $P<0.05$ 判定显著差异， $P<0.01$ 判定为极显著差异。所有数据表示为平均值±标准误($\bar{x}\pm SE$)。

2 结果与分析

2.1 翘嘴鱥 *htr1aa* 和 *htr1ab* 基因的结构、多重比对及进化树分析

获得的翘嘴鱥 *htr1aa* 和 *htr1ab* 基因的完整 CDS 长度为 1284 bp 和 1251 bp，分别编码 428 个

氨基酸和 417 个氨基酸。与虹鳟、斑马鱼、青鳉、三刺鱼和狼鲈的 *htr1a* 基因结构相比，翘嘴鱥、青鳉、狼鲈、斑马鱼、三刺鱼的 *htr1aa*、*htr1ab* 基因都只有一个外显子，无内含子，并且内含子的长度差异不大，只有虹鳟 *htr1aa* 和斑马鱼 *htr1ab* 有两个外显子和一个内含子，而翘嘴鱥和斑马鱼的 *htr1ab* 基因只有一个外显子，可以看出翘嘴鱥的 *htr1a* 基因在进化上高度保守(图 1)。翘嘴鱥与青鳉、斑马鱼的 *htr1ab* 氨基酸序列多重比对一致性分别为 95%、78%，而翘嘴鱥与三刺鱼、青鳉、斑马鱼、人、鼠的 *htr1aa* 氨基酸序列多重比对一致性分别为 76%、74%、78%、67%、68%。翘嘴鱥的 *htr1aa* 和 *htr1ab* 与其他物种的氨基酸序列多重比对发现，只与青鳉的 *htr1ab* 同源性较高。同时翘嘴鱥与以上这些物种氨基酸比对发现其中 7 个结构域在各物种相比高度保守(图 2)。

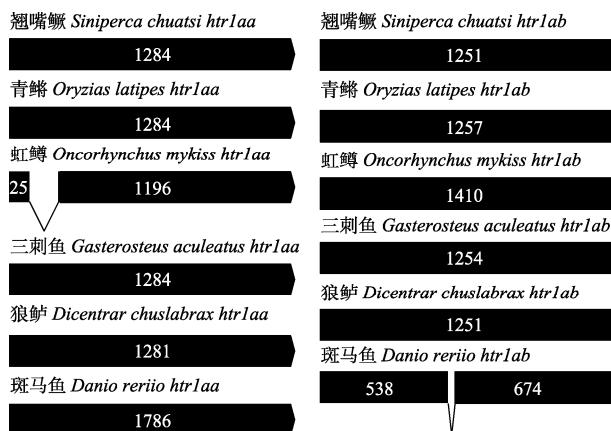


图 1 青鯥、虹鱥、三刺鱼、狼鲈、斑马鱼和翘嘴鱥 *htr1aa* 和 *htr1ab* 基因编码序列的结构
黑线表示内含子，黑色方块表示外显子，方框内数字
表示编码序列长度。

Fig. 1 The gene structures of coding sequence of *htr1aa* and *htr1ab* genes in *Oryzias latipes*, *Oncorhynchus mykiss*, *Gasterosteus aculeatus*, *Dicentrar chuslabrax*, *Danio rerio* and *Siniperca chuatsi*. The black lines indicate introns, and the black boxes indicate exons. The number in the box indicates the length of the code sequence.

基于各个物种的 *htr1a* 序列使用 MEGAX 软件以邻接法构建翘嘴鱥与其他物种 *htr1a* 的系统进化树(图 3)，结果显示，整个进化树被分为 2 簇，哺乳动物和两栖动物的 *htr1a* 为一簇，鱼类的 *htr1aa* 和 *htr1ab* 为一簇，处于进化树的底端。翘嘴鱥 *htr1aa* 与狼鲈直系同源基因聚类关系最为相近，其次是加州鲈、三刺鱼。另一个亚型 *htr1ab* 却与加州鲈直系同源基因聚类关系最为相近，其次是狼鲈、三刺鱼。

2.2 翘嘴鱥在不同驯化状态下脑中相关基因的 mRNA 表达水平分析

以鱥 *rpl13a* 为内参基因，检测经过不同程度驯化鱥脑组织中 *htr1aa* 和 *htr1ab* 基因的表达水平。研究发现经过二次驯化的鱥脑组织中的 *htr1aa* 与经过一次驯化的鱥表达量相比都有显著降低，而 *htr1ab* 在 2 次驯化过程中没有发生显著变化(图 4)。抑制性食欲相关基因 *pomc* 在不同程度驯化中发生了显著性变化，与一次驯化鱥相比，二次驯化鱥脑中的 *pomc* mRNA 水平极显著降低($P<0.01$)，而促食欲基因 *npy* 二次驯化翘嘴鱥脑 mRNA 水平升高，但没有显著性差异($P>0.05$)(图 5)。

2.3 翘嘴鱥在不同驯化状态下脑中 *htr1aa* 基因 DNA 甲基化水平分析

笔者分析了 *htr1aa* 起始密码子(指定为 0)至上游-3000 bp 处的 CpG 岛。在翘嘴鱥 *htr1aa* 基因的这一区域中存在 2 个 CpG 岛，第 1 个为-2629 bp 至-2735 bp，第 2 个为-344 bp 至-240 bp。第 1 个 CpG 岛包含 4 个 CpG 位点，第 2 个 CpG 岛包含 5 个 CpG 位点(图 6)。比较驯化 2 次和驯化 1 次鱥脑组织中候选 CpG 位点 DNA 甲基化水平的变化。经一次驯化和二次驯化翘嘴鱥脑组织中 *htr1aa* 基因的甲基化程度在 CpG1 岛较高(表 3)。然而，在 CpG2 岛上，经一次驯化和二次驯化翘嘴鱥脑组织中 *htr1aa* 基因的甲基化程度较低。但是 2 组不同程度驯化的翘嘴鱥的总体甲基化率有显著差异($P<0.05$)(表 4)。

3 讨论

3.1 翘嘴鱥 *htr1a* 基因同源性及进化分析

本研究通过鱥基因组网站发现翘嘴鱥 *htr1a* 基因有两个亚型，分别是 *htr1aa* 和 *htr1ab*。翘嘴鱥 *htr1aa* 和 *htr1ab* cDNA 序列全长分别为 1284 bp、1251 bp，分别编码 427 和 416 个氨基酸，经预测该多肽的相对分子质量分别是 47.13 kD 和 46.96 kD，理论等电点为 8.46 和 9.25。翘嘴鱥 *htr1aa* 与 *htr1ab* 与其他物种比较发现基因结构高度保守，同时氨基酸序列比对显示 *htr1a* 基因的功能结构域具有高度的保守性。翘嘴鱥 *htr1aa* 和 *htr1ab* 与其他鱼类的 *htr1aa* 和 *htr1ab* 分别聚为一个小分支，翘嘴鱥 *htr1aa* 和 *htr1ab* 与其他鱼类同源性在都大于 70%，与哺乳动物的亲缘关系不是相近，但也达到了 60% 左右，结合以上的分析，进一步证实翘嘴鱥 *htr1a* 基因在进化中的保守地位。

3.2 翘嘴鱥 *htr1a* 基因及食欲基因的表达分析

在不同驯化程度的翘嘴鱥中，*htr1aa* 基因的表达显示出差异，*htr1aa* 在经二次驯化的 mRNA 表达显著低于经一次驯化的翘嘴鱥，与此同时抑制性食欲因子 *pomc* 的表达在两次驯化组中显著低于一次驯化的翘嘴鱥。在禁食斑马鱼中，发现血清素水平的变化，会影响其受体基因 *htr1aa* 的表达，与此同时食欲基因的表达也受到影响^[30]。

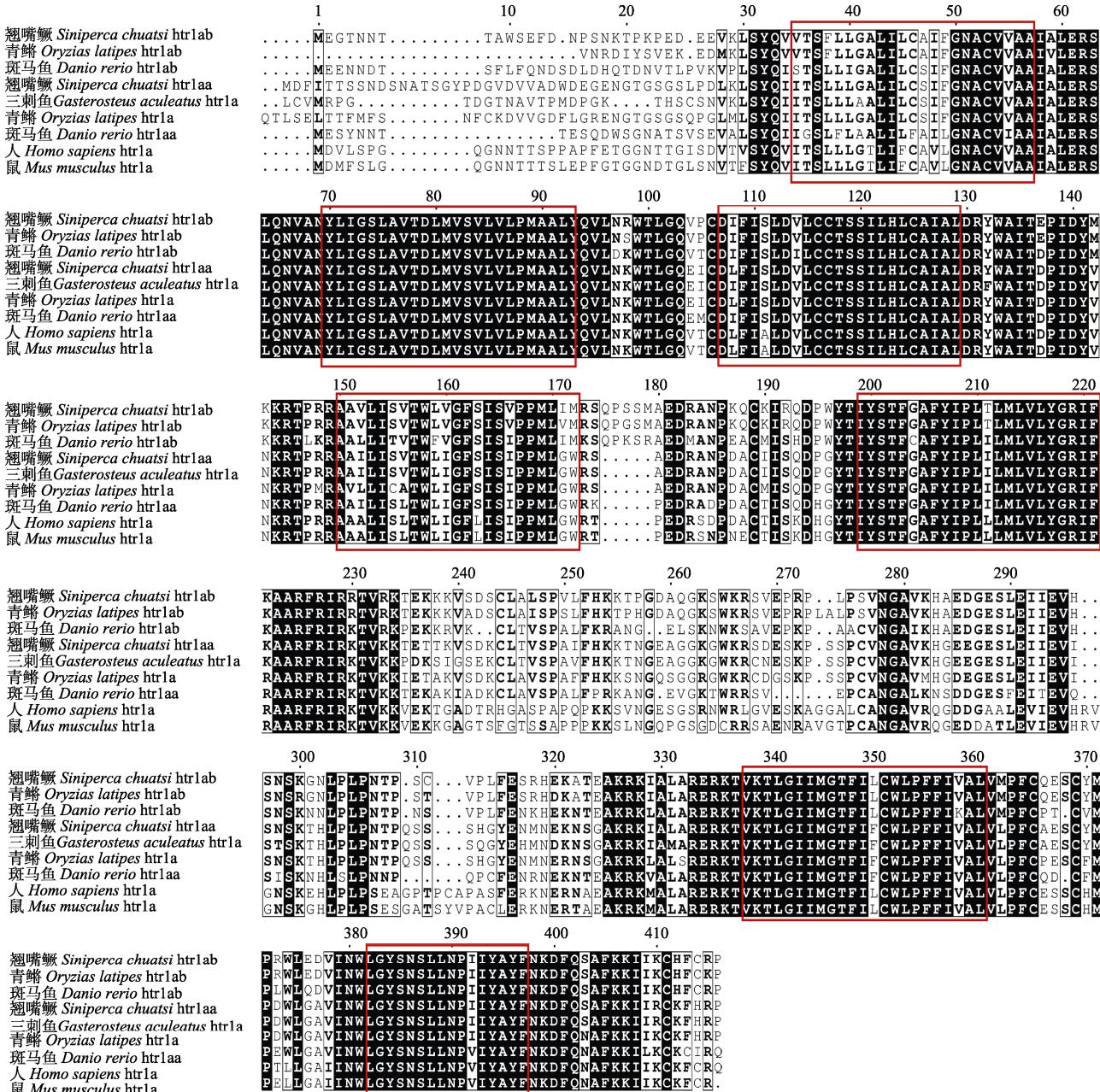


图 2 人、鼠、三刺鱼、青鳉、斑马鱼与翘嘴鳜 htr1aa 和 htr1ab 氨基酸多重序列比对
方框内是功能结构域。

Fig. 2 Amino acid sequences alignments of htr1aa and htr1ab between *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gasterosteus aculeatus*, *Oryzias latipes*, *Danio rerio* and *Siniperca chuatsi*
The box indicates function domains.

有研究报道，在虹鳟中，激活 5-HT1A 受体会导致虹鳟食物摄入的抑制^[20]，在鹅^[31]和鸡^[32]中也有相同报道。窦亚琪等^[29]在翘嘴鳜驯化过程中，表明训练 2 次比训练 1 次的翘嘴鳜更容易、更快地接受死饵料鱼，这与笔者的结果相符。这些对食物摄入量的影响不同于哺乳动物在 5-HT1A 受

体中观察到的影响，这表明了不同类别脊椎动物大脑 5-HT 系统中存在功能差异。5-HT1A 受体还与多个细胞信号通路^[33]耦合，而 MAPK/ERK 一旦被激活，可以调节许多直接早期基因(IEGs)的转录活动^[34]，例如原癌基因(proto-oncogene *c-Fos*)、早期生长反应因子 1 (early growth response 1，

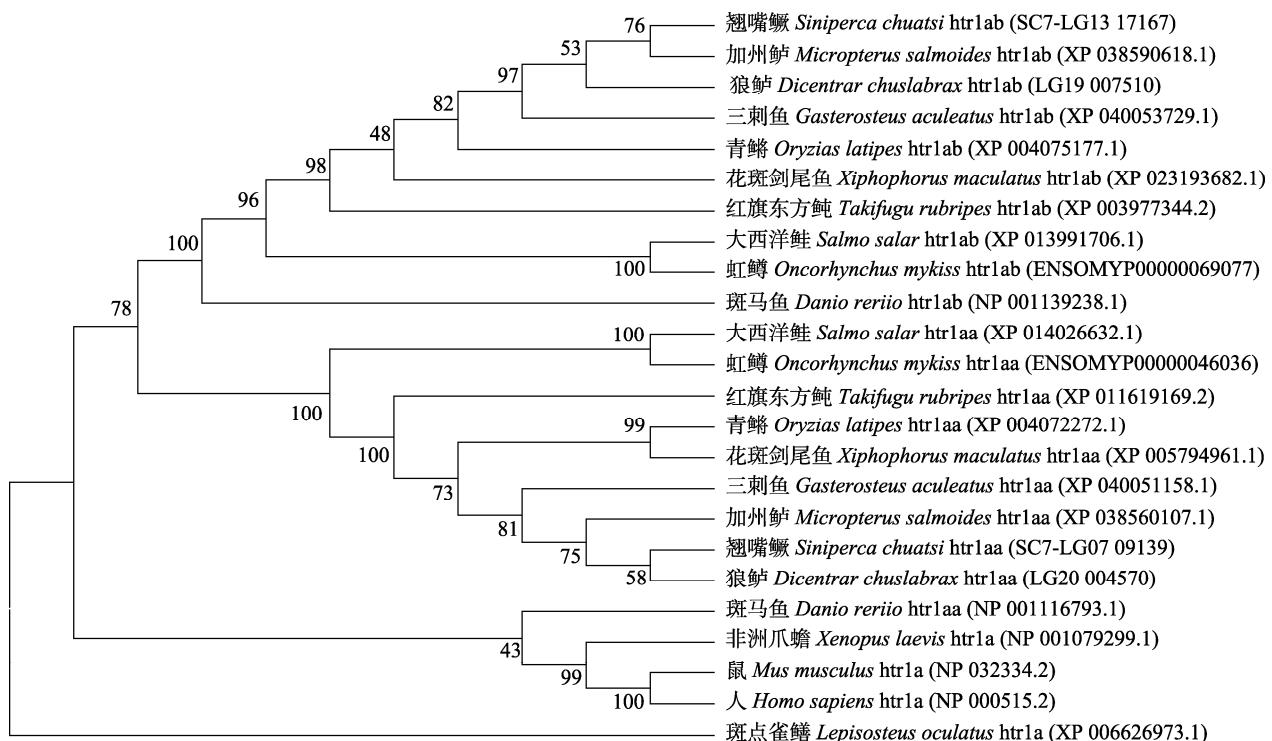


图3 根据翘嘴鳜 htr1aa 和 htr1ab 的氨基酸序列与其他物种的同源蛋白构建的系统进化树
括号内编号为基因在 Ensembl 或 NCBI 数据库中的编号。

Fig. 3 Phylogenetic tree derived from the amino acid sequences of htr1aa and htr1ab mandarin fish and homologous proteins from various species
The numbers in parentheses are the numbers of genes in Ensembl or NCBI database.

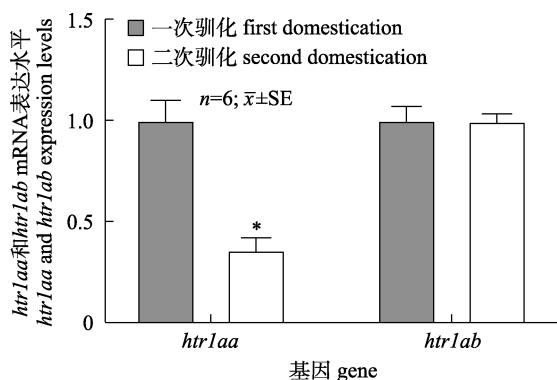


图4 经不同程度驯化后翘嘴鳜脑组织 htr1aa 和 htr1ab 基因表达水平检测

*表示两组之间存在显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 4 Detection of htr1aa and htr1ab gene expression levels in brain tissue of mandarin fish after different degrees of domestication
Significant level is marked with * ($P<0.05$).

Egr1, 也被称为 *Zif268*)。翘嘴鳜食性驯化研究中报道证实转录因子 *c-fos* 和 *zif268* 表达水平在一次驯化和两次驯化中出现显著差异^[29]。而 Liang 等^[35]在翘嘴鳜社会学习研究中通过学习记忆通路抑制

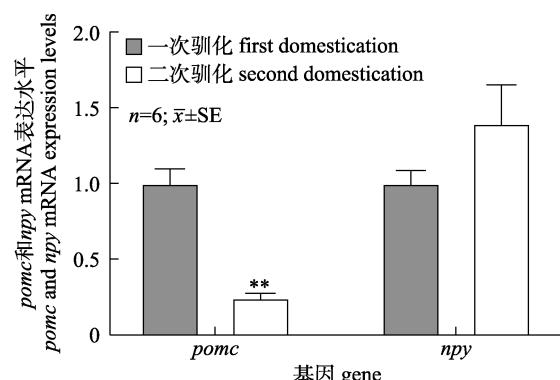


图5 经不同程度驯化后翘嘴鳜脑组织食欲基因表达水平检测

**表示两组之间存在显著性差异($P<0.01$)。

Fig. 5 Detection of appetite related gene expression level after different degrees of domestication
Significant level is marked with ** ($P<0.01$).

剂鳜脑室注射发现 *c-fos* 的表达受到抑制而 *pome* 的表达激活, 从而证实 *c-fos-pome* 信号传导途径参与了学习记忆对翘嘴鳜摄食及食性巩固的调控。综上结果表明 5-HT1A 受体在翘嘴鳜驯化过程中, 可能通过对学习记忆通路的调控, 改变翘

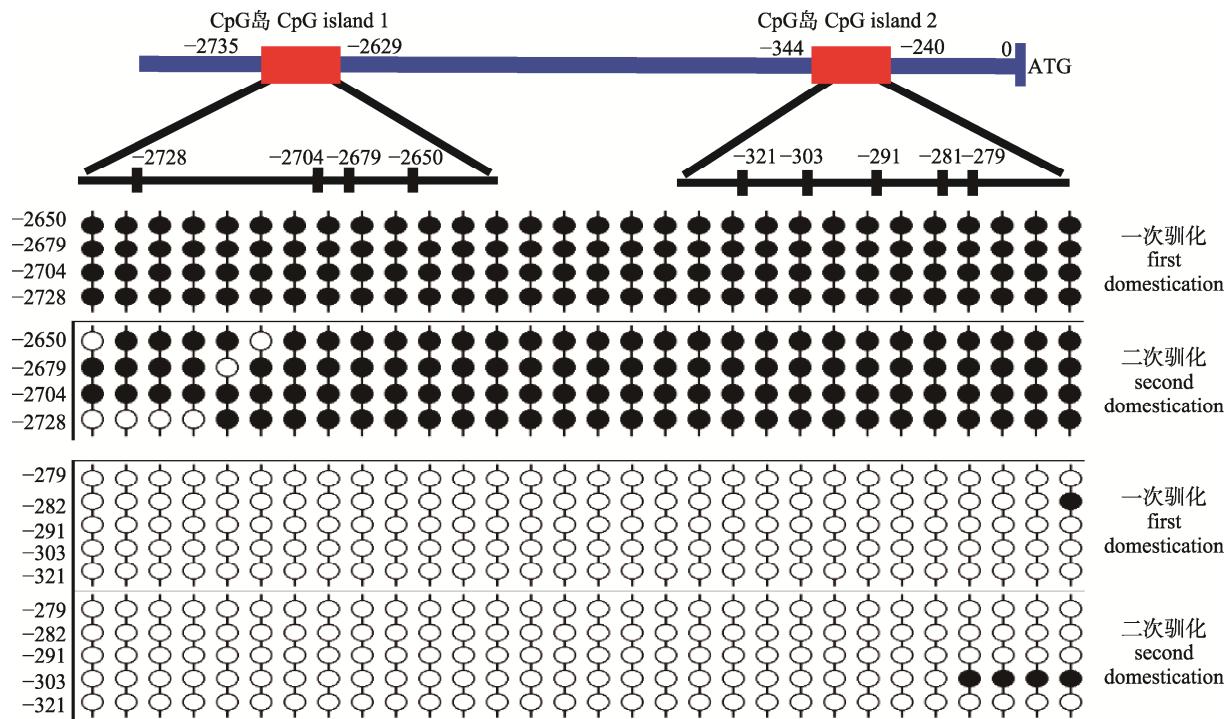


图6 翘嘴鳜 *htr1aa* 基因 CpG 岛分布、CpG 位点信息及翘嘴鳜不同驯化程度 *htr1aa* 基因 DNA 甲基化水平
数字代表潜在的启动区甲基化位点, ●代表甲基化位点, ○代表未甲基化位点。

Fig. 6 The distribution and locations of CpG islands of *htr1aa* gene, and DNA methylation levels of *htr1aa* gene in different domestication levels in mandarin fish
The numbers correspond to potential CpG methylation sites, Filled (black) circles correspond to methylated Cs, and unfilled (white) circles correspond to unmethylated Cs.

表3 *htr1aa* 的 5'-侧翼区域中 CpG1 岛中每个 CpG 位点的甲基化概率

Tab. 3 Methylation status of each CpG1 (cytosine-guanine) site in the CpG island in the 5'-flanking region of *htr1aa*

CpG1 位点	CpG1 position	-2727	-2678	-2670	-2649	共计 total
一次驯化/% first domestication		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
二次驯化/% Second domestication		86.7	100.0	96.7	93.3	94.2
显著性 Prominence		0.038	1.000	0.313	0.150	0.007*

注: 表中的百分数代表每个 CpG 位点发生甲基化的概率; *表示显著差异($P<0.05$)。

Note: The percentages in the table represent the chance of methylation of each CpG site; * indicates significant differences ($P<0.05$).

表4 *htr1aa* 的 5'-侧翼区域中 CpG2 岛中每个 CpG 位点的甲基化概率

Tab. 4 Methylation status of each CpG2 (cytosine-guanine) site in the CpG island in the 5'-flanking region of *htr1aa*

CpG2 位点	CpG2 position	-320	-302	-290	-281	-278	共计 total
一次驯化/% first domestication		0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.7
二次驯化/% second domestication		0.0	13.3	0.0	0.0	0.0	2.7
显著性 prominence		1.000	0.038	1.000	0.313	1.000	0.176

注: 表中的百分数代表每个 CpG 位点发生甲基化的概率。

Note: The percentages in the table represent the chance of methylation of each CpG site.

嘴鳜 *pomc*、*npy* 基因的表达从而巩固翘嘴鳜食性。

3.3 翘嘴鳜 *htr1a* 基因的甲基化分析

笔者比较了 *htr1aa* 基因启动子区在不同驯化程度的翘嘴鳜脑组织的甲基化程度。结果表明,

经两次驯化的翘嘴鳜甲基化率显著低于一次驯化。DNA 甲基化通常抑制基因的转录, 其阻断转录因子与基因作用区域的结合, 导致转录激活的抑制是作用机制之一^[36-38]。而窦亚琪等^[29]研究证

实在翘嘴鱥食性转变驯化过程中 *C/EBPD*, *zif268* 和 *c-fos* 等转录因子的表达水平显著上调。而转录因子可以抑制或促进基因的表达, 例如有关于人的研究报道确定了 *CEPB*, 作为一个转录因子, 显著抑制了 *htr1a* 表达^[39]。由此认为, *htr1a* 的 DNA 甲基化可能在翘嘴鱥摄食相关基因表达中发挥重要的调控作用。

4 总结

本研究通过对翘嘴鱥 *htr1aa* 基因的结构分析、表达分析及甲基化分析, 初步说明 *htr1a* 基因在翘嘴鱥食性转变驯化中的作用, 为进一步研究翘嘴鱥 5-HT1A 受体信号通路在学习记忆中的作用提供理论基础, 为解决生产中鱥饲料养殖过程中难驯化及驯化不稳定问题提高理论依据。

参考文献:

- [1] Guillette L M, Morgan K V, Hall Z J, et al. Food preference and copying behaviour in zebra finches, *Taeniopygia guttata*[J]. *Behavioural Processes*, 2014, 109: 145-150.
- [2] Brown C, Laland K. Social enhancement and social inhibition of foraging behaviour in hatchery-reared Atlantic salmon[J]. *Journal of Fish Biology*, 2002, 61(4): 987-998.
- [3] Brown C, Laland K N. Social learning in fishes: A review[J]. *Fish and Fisheries*, 2003, 4(3): 280-288.
- [4] Magnhagen C, Staffan F. Social learning in young-of-the-year perch encountering a novel food type[J]. *Journal of Fish Biology*, 2003, 63(3): 824-829.
- [5] Huber L, Range F, Voelkl B, et al. The evolution of imitation: What do the capacities of non-human animals tell us about the mechanisms of imitation? [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 2009, 364(1528): 2299-2309.
- [6] Braithwaite V A, Salvanes A G V. Environmental variability in the early rearing environment generates behaviourally flexible cod: Implications for rehabilitating wild populations[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2005, 272(1568): 1107-1113.
- [7] Peng J, Dou Y Q, Liang H, et al. Social learning of acquiring novel feeding habit in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4399.
- [8] Chapman B B, Ward A J W, Krause J. Schooling and learning: Early social environment predicts social learning ability in the guppy, *Poecilia reticulata*[J]. *Animal Behaviour*, 2008, 76(3): 923-929.
- [9] Diéguez C, Vazquez M J, Romero A, et al. Hypothalamic control of lipid metabolism: Focus on leptin, ghrelin and melanocortins[J]. *Neuroendocrinology*, 2011, 94(1): 1-11.
- [10] Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake[J]. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2008, 18(2): 158-168.
- [11] Feijó F M, Bertoluci M C, Reis C. Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review[J]. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2011, 57(1): 74-77.
- [12] de Pedro N, Pinillos M L, Valenciano A I, et al. Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: Involvement of CRF[J]. *Peptides*, 1998, 19(3): 505-511.
- [13] Ruibal C, Soengas J, Aldegunde M. Brain serotonin and the control of food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of changes in plasma glucose levels[J]. *Journal of Comparative Physiology A*, 2002, 188(6): 479-484.
- [14] He Y H, Li L, Liang X F, et al. Inhibitory neurotransmitter serotonin and excitatory neurotransmitter dopamine both decrease food intake in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(1): 175-183.
- [15] Mennigen J A, Harris E A, Chang J P, et al. Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain[J]. *Regulatory Peptides*, 2009, 155(1-3): 99-104.
- [16] Hoyer D, Martin G. 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome[J]. *Neuropharmacology*, 1997, 36(4-5): 419-428.
- [17] Tecott L H. Serotonin and the orchestration of energy balance[J]. *Cell Metabolism*, 2007, 6(5): 352-361.
- [18] Kopf B S, Langhans W, Geary N, et al. Serotonin 2C receptor signaling in a diffuse neuronal network is necessary for LPS anorexia[J]. *Brain Research*, 2010, 1306: 77-84.
- [19] Ebenezer I S, Surujbally A. The effects of 8-hydroxy-2-(dimethylamino)-tetralin (8-OH-DPAT) on food intake in non-deprived C57BL6 mice[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 559(2-3): 184-188.
- [20] Pérez Maceira J J, Mancebo M J, Aldegunde M. The involvement of 5-HT-like receptors in the regulation of food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2014, 161: 1-6.
- [21] Rowan M J, Cullen W K, Moulton B. Buspirone impairment of performance of passive avoidance and spatial learning tasks in the rat[J]. *Psychopharmacology*, 1990, 100(3): 393-398.
- [22] Mendelson S D, Quartermain D, Francisco T, et al. 5-HT1A receptor agonists induce anterograde amnesia in mice

- through a postsynaptic mechanism[J]. European Journal of Pharmacology, 1993, 236(2): 177-182.
- [23] Misane I, Johansson C, Ove Ögren S. Analysis of the 5-HT1A receptor involvement in passive avoidance in the rat[J]. British Journal of Pharmacology, 1998, 125(3): 499-509.
- [24] Winsauer P J, Rodriguez F H, Cha A E, et al. Full and partial 5-HT1A receptor agonists disrupt learning and performance in rats[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1999, 288(1): 335-347.
- [25] Madjid N, Tottie E E, Lüttgen M, et al. 5-Hydroxytryptamine 1A receptor blockade facilitates aversive learning in mice: interactions with cholinergic and glutamatergic mechanisms [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2006, 316(2): 581-591.
- [26] Dou Y Q, Liang X F, Gao J J, et al. Single nucleotide polymorphisms in pepsinogen gene, growth hormone gene and their association with food habit domestication traits in *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(5): 485-493. [窦亚琪, 梁旭方, 高俊杰, 等. 鲢 pep 和 gh 基因 SNP 标记与驯食性状的关联分析[J]. 中国水产科学, 2020, 27(5): 485-493.]
- [27] Mennigen J A, Harris E A, Chang J P, et al. Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain[J]. Regulatory peptides, 2009, 155(1-3): 99-104.
- [28] Ruibal C, Soengas J, Aldeguende M. Brain serotonin and the control of food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of changes in plasma glucose levels[J]. Journal of Comparative Physiology A, 2002, 188(6): 479-484.
- [29] Dou Y, He S, Liang X F, et al. Memory function in feeding habit transformation of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. International journal of molecular sciences, 2018, 19(4): 1254.
- [30] Mechaly A S, Richardson E, Rinkowitz S. Activity of etv5a and etv5b genes in the hypothalamus of fasted zebrafish is influenced by serotonin[J]. General and Comparative Endocrinology, 2017, 246: 233-240.
- [31] Reis L C, Marinho V R. Influence of 5-HT1A agonist on the feeding behavior of *Coturnix japonica* (Galliformes: Aves)[J]. Brazilian Journal of Biology, 2005, 65(4): 675-681.
- [32] Saadoun A, Cabrera M C. Effect of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT on food and water intake in chickens[J]. Physiology & Behavior, 2002, 75(3): 271-275.
- [33] Raymond J R, Mukhin Y V, Gettys T W, et al. The recombinant 5-HT1A receptor: G protein coupling and signalling pathways[J]. British Journal of Pharmacology, 1999, 127(8): 1751-1764.
- [34] Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades[J]. Current Opinion in Cell Biology, 1996, 8(2): 205-215.
- [35] Liang H, He S, Liang X F, et al. Feeding habit transition induced by social learning through CaMKII signaling in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. Aquaculture, 2021, 533: 736211.
- [36] Maier H, Colbert J, Fitzsimmons D, et al. Activation of the early B-cell-specific mb-1 (Ig-alpha) gene by Pax-5 is dependent on an unmethylated Ets binding site[J]. Molecular and Cellular Biology, 2003, 23(6): 1946-1960.
- [37] Rose N R, Klose R J. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 2014, 1839(12): 1362-1372.
- [38] Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, et al. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain[J]. Developmental Cell, 2001, 1(6): 749-758.
- [39] Liu Y P, Wu X, Meng J H, et al. Transcription factor CEBPB inhibits the expression of the human HTR1A by binding to 5' regulatory region *in vitro*[J]. Genes, 2019, 10(10): 802.

Expression of 5-HT1A receptor and DNA methylation analysis in Chinese perch, *Siniperca chuatsi*

ZHUANG Wuyuan^{1,2}, LIANG Xufang^{1,2}, XIAO Qianqian^{1,2}, ZHANG Zhilu^{1,2}, CAI Wenjing^{1,2}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University; Chinese Perch Research Center of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Engineering Research Center of Green development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, China

Abstract: To explore the role of the 5-HT1A receptor in feeding and food consolidation during domestication of Chinese perch, *Siniperca chuatsi*, we obtained the *htr1a* gene sequence of the Chinese perch genome using homologous sequence alignment and evolutionary tree analysis. *Htr1a* has two isoforms, *htr1aa* and *htr1ab*, which encode amino acid sequences that have high homology with those of zebrafish (*Danio rerio*) and medaka (*Oryzias latipes*), with a similarity of more than 70%. The evolutionary relationship is closest between Chinese perch and wolf perch (*Dicentrarchus labrax*). The results indicated that the *htr1a* gene of Chinese perch is highly conserved in evolution. The expression and methylation of the *htr1a* gene in mandarin fish were also analyzed. Compared with the first domestication group, the expression of the *htr1aa* gene and DNA methylation were significantly decreased in the second domestication group ($P<0.05$), while *htr1ab* gene expression was not significantly different between the two groups ($P>0.05$). The expression of *pomc* was related to food intake, which was obviously lower than that of a domesticated animal ($P<0.05$). The above results indicated that methylation of the promoter region of the *htr1aa* gene may change its transcription level during food domestication of Chinese perch, thus affecting the expression of key factors in the learning and memory pathways, inhibiting appetite factor *pomc*. Therefore, DNA methylation of *htr1aa* may play an important role in regulating the expression level of feeding related genes in Chinese perch. The results of this study further elucidate the mechanism of learning and memory in the transformation of feeding habits in fish and provide a theoretical solution to the difficult and unstable domestication of Chinese perch.

Key words: *Siniperca chuatsi*; 5-HT1A receptor; DNA methylation; *pomc*; *npy*

Corresponding author: LIANG Xufang. E-mail: xufang_liang@hotmail.com