

DOI: 10.12264/JFSC2024-0053

类固醇激素在达里湖瓦氏雅罗鱼渗透压调节机制中的作用

李雯^{1,2}, 黄晶¹, 邹宇婷^{1,2}, 张立民¹, 常玉梅¹

1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 为探究类固醇激素在达里湖瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)渗透压调节机制中的作用, 本研究设置为期 10 d 的 50 mmol/L NaHCO₃碱胁迫和淡水恢复双向跨境胁迫实验, 对不同处理组的血清类固醇激素含量及鳃组织相关基因表达量进行了关联分析, 并对关键基因启动子区进行了甲基化鉴定。结果发现: 不同处理组差异类固醇激素主要富集在 3 个通路。在类固醇生物合成通路, 胆固醇含量和参与其合成途径的关键基因(*hsd17b7*、*ebp*、*dhcr24*、*dher7*)表达量在碱胁迫组显著升高($P<0.05$), 在淡水恢复组极显著降低($P<0.01$); 在初级胆汁酸生物合成通路, 25-羟基胆固醇和 7 α ,25-二羟基胆固醇含量及其靶基因(*ch25h*、*cyp7a1*)表达量在碱胁迫组极显著升高, 在淡水恢复组极显著降低($P<0.01$); 在类固醇激素生物合成通路, 孕烯醇酮、17 α -羟孕酮、脱氢可的松和皮质醇含量在碱胁迫组极显著降低($P<0.001$), 在淡水恢复组显著升高($P<0.05$)。其中, 胆固醇是这 3 个通路共享的中间产物。另外, 合成胆固醇的关键基因 *ebp* 和催化其分解代谢的关键基因 *sult2b1* 的启动子区受甲基化修饰, 且均在碱胁迫组呈低甲基化水平, 在淡水恢复组呈高甲基化水平。上述研究表明, 胆固醇是类固醇激素相关通路的关键产物, 通过改变其合成和代谢关键基因启动子甲基化水平, 调控通路上其他关键基因在不同环境下差异表达, 影响类固醇激素含量, 参与达里湖瓦氏雅罗鱼在不同环境的渗透压调节。

关键词: 瓦氏雅罗鱼; 类固醇激素; 渗透压调节; 甲基化; 盐碱水

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)08-0867-16

瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、雅罗鱼亚科(Leuciscinae)、雅罗鱼属(*Leuciscus*), 主要分布于俄罗斯、蒙古国和中国等国的淡水河流和内陆湖泊^[1-2]。而生长于中国内蒙古达里湖的瓦氏雅罗鱼, 具有极高的耐盐碱特性, 能在碱度 53.57 mmol/L、pH 9.6、盐度为 6 的极端环境下生存并形成优势种群^[3-4]。围绕瓦氏雅罗鱼极端耐盐碱特性, 我国学者从生理生化^[5-7]、基因组^[8-10]、转录组^[2,11-12]、代谢组^[13]等方面开展了系统研究。另外, 达里湖瓦氏雅罗鱼还兼具生殖洄游特性, 每年 4 月末至 5 月初从达里湖洄游到周边淡水河道产卵^[14-15]。生殖洄游不仅要面临水体从高渗到低渗的转变,

还要经历基础代谢和性腺发育所需能量的新分配^[13]。因此, 解析瓦氏雅罗鱼耐盐碱特性和高效的渗透压调节能力的分子和生理机制, 是培育耐盐碱新品种的重要前提和保障。

类固醇激素(stEROid hormone)是一类以胆固醇为底物, 经过一系列酶促反应合成的脂类激素, 主要分为皮质类固醇(通常在肾上腺皮质中产生)和性类固醇(通常在性腺或胎盘中产生)^[16]。类固醇激素具有改善代谢、调节免疫、控制生殖系统发育及抗炎等作用^[17-18]。近年来, 随着各种组学技术的快速发展, 大量研究发现, 鱼类在生殖洄游过程中, 许多与类固醇激素相关的差异表达基因参与渗透压调节、性腺发育和能量消耗等生物

收稿日期: 2024-02-06; 修订日期: 2024-03-15.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32273120); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2023TD22).

作者简介: 李雯(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类抗逆分子生理机制. E-mail: 1471506486@qq.com

通信作者: 常玉梅, 研究员, 研究方向为鱼类抗逆分子机制解析及抗逆育种. E-mail: changyumei@hrfri.ac.cn

学过程。Yin 等^[19]通过转录组和代谢组分析发现, 刀鲚(*Coilia nasus*)在从海水到淡水的洄游产卵过程中, 参与其肝脏类固醇激素生物合成的相关基因和代谢物显著增加。Wei 等^[20]通过代谢组、转录组和血液生化联合分析发现, 鲫(*Carassius auratus*)从淡水转移至高碳酸盐碱环境下, 其肝脏类固醇生物合成途径受到干扰。Chen 等^[15]通过转录组差异表达谱分析发现, 达里湖瓦氏雅罗鱼由达里湖洄游至淡水河道产卵时, 肝脏类固醇激素生物合成通路相关基因显著上调表达。Wang 等^[13]通过分析达里湖瓦氏雅罗鱼不同洄游江段血清差异代谢物发现, 类固醇激素的生物合成途径参与了达里湖瓦氏雅罗鱼洄游产卵过程中的渗透调节和性腺促熟过程。上述研究表明, 类固醇激素参与了鱼类生殖洄游过程的生理可塑性, 但其分子调控机制不详。

鳃组织是硬骨鱼类体内离子转运和渗透压调节、酸碱平衡和氨氮代谢等生理稳态维持的重要器官^[21-23]。基于达里湖瓦氏雅罗鱼独特的生殖洄游特性及鳃组织高效的渗透压调节能力, 本研究通过室内模拟瓦氏雅罗鱼碱、淡水双向跨境实验, 比较不同环境下瓦氏雅罗鱼血清类固醇激素含量及鳃组织相关基因的表达差异, 筛选和鉴定参与瓦氏雅罗鱼渗透压调节的差异类固醇激素和关键调控基因, 探讨其可能的生物学功能和调控机制, 以期为鱼类耐盐碱机制解析、移植驯化和耐盐碱新品种培育提供理论依据和科学指导。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

达里湖瓦氏雅罗鱼为中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰实验站(126.63°E, 45.97°N)人工繁育的 F₃。随机挑选大小均匀、外观正常、体质量为(22.02±2.92) g 的鱼种 120 尾, 从室外土池转运至室内循环可控水族箱(258 cm×57.5 cm×49.5 cm)暂养 1 周, 每天早晚各投饵 1 次, 并及时清除饲料残渣及其代谢物, 每天换水 1/3。

1.2 室内双向跨境胁迫实验和样本采集

实验前, 所有实验鱼停食 48 h。首先将 120 尾达里湖瓦氏雅罗鱼等量($n=40$)放入 3 个循环水

族箱(177.8 cm×57.5 cm×35.5 cm)。其中一组为淡水组(FW)不做任何水质处理; 另外两组分别开展 50 mmol/L 碳酸氢钠碱胁迫和淡水恢复双向跨境胁迫实验。首先对两组实验鱼均进行为期 10 d 的 50 mmol/L 碳酸氢钠碱胁迫实验, 期间不投饵, 并每天定时换水 1/2 以保持水质清澈。其中一组作为碱胁迫组(FW-AW), 并在 1、5 和 10 d 采样, 分别记为 AW1、AW5 和 AW10, 淡水组(FW)为对照组; 另一组在碱胁迫 10 d 后将实验鱼全部转移至淡水中恢复 10 d, 作为淡水恢复组(AW-FW), 并在 1、5 和 10 d 采样, 分别记为 FW1、FW5 和 FW10, AW10 为对照组。碱度由 0.02 mmol/L 盐酸滴定法标定, 维持在 50 mmol/L 左右。

淡水组及碱胁迫组和淡水恢复组在对应的时间节点(1、5、10 d)每次采样 10 尾。首先采用 MS-222 (Sigma-Aldrich, 美国)麻醉实验鱼, 测量体长体重后, 用 2 mL 注射器尾静脉采血约 0.5 mL 置于 1.5 mL 离心管中, 4 °C 静置过夜后, 3500 r/min 离心 15 min, 分离上层血清转移至-80 °C 冰箱保存, 用于后续类固醇激素测定。同时采集两侧的鳃组织, 用锡箔纸包好后快速放入液氮速冻, 随后转移至-80 °C 冰箱保存, 用于后续的基因功能研究。

1.3 血清类固醇激素测定

1.3.1 样本前处理 筛选符合标准且单个样本量足的血清, 不同处理组中各筛选出 5 个样本($n=5$)。解冻后, 涡旋 10 s 混匀。取 100 μL 加入到对应编号的 2 mL 离心管中, 加入 400 μL 甲醇提取液。涡旋 10 min, 冰上静置 10 min, 4 °C、12000 r/min 离心 5 min。取 400 μL 上清液于对应 1.5 mL 离心管中, 20 °C 条件下浓缩至完全干。用 100 μL 纯甲醇复溶, 涡旋 5 min, 4 °C、12000 r/min 离心 3 min, 移取 80 μL 上清液用于 LC-MS/MS 上机分析。

1.3.2 色谱质谱采集 所有色谱分离均使用超高效液相色谱系统(ultra performance liquid chromatography, UPLC; ExionLCTM AD, SCIEX, 英国)进行。反相分离采用 Phenomenex Kinetex C18 色谱柱(1.7 μm, 100 mm×2.1 mm, Waters, 英国)。流动相包括 A 相(乙腈/水, 0.04%乙酸)和 B 相(乙腈/异丙醇, 0.04%乙酸)。流速为 0.35 mL/min, 柱温

保持在40 °C, 每个样品的进样量为5 μL。使用串联质谱仪(tandem mass spectrometry, MS/MS; OTRAP6500+, SCIEX, 英国)检测从色谱柱洗脱出来的代谢物。检测模式为正模式, 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)温度为550 °C, 质谱电压为5500 V, 气帘气(curtain gas, CUR)为35 psi。在三重四极杆中, 每个离子对根据优化的去簇电压(declustering potential, DP)和碰撞能(collision energy, CE)进行扫描检测。

1.3.3 样本含量测定 配制不同浓度的标准品溶液, 获取各个浓度标准品的对应定量信号的色谱峰强度数据。将检测到的所有样本的积分峰面积比值代入标准曲线线性方程进行计算, 进一步代入计算公式, 最终得到实际样本中该物质的含量。

样本中各物质的含量/(ng/mL)= $0.001 \times c \times V_1 \times (1000m + V_2) / (m \times V_3)$ 。

式中, c 为样本中积分峰面积代入标准曲线得到的浓度值, ng/mL; m 为移取的样本体积, mL; V_1 为复溶时所用溶液的体积, μL; V_2 为提取剂的总体积, μL; V_3 为分取体积, μL。

1.4 鳃组织 RNA 提取及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

根据瓦氏雅罗鱼转录组数据, 调取差异代谢物富集通路上的关键调控基因的 mRNA 序列, Primer Premier 5.0 设计引物, 由北京诺赛基因组研究中心合成引物(表 1)。根据 TRIzol (Thermo Fisher, 美国)操作说明, 提取不同处理组中各3尾鱼鳃组织样品($n=3$)的总 RNA, 利用 Nanodrop 8000 分光光度计(Thermo Scientific, 美国)测定浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测其 RNA 质量。根据 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本)试剂盒说明书反转录成单链 cDNA, -20 °C保存备用。以 18S rRNA 作为内参基因, 根据 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, 日本)试剂盒说明书, 在 ABI 7500 Fast Real-Time PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 上进行 RT-qPCR 检测。PCR 反应程序为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环; 最后 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。

表 1 RT-qPCR 基因定量表达引物信息

Tab. 1 Primer information for real-time quantitative PCR

基因 gene	引物序列(5'-3') sequence of primer (5'-3')	产物长度/bp product size
<i>hsd17b7</i>	F: TGGTTTGAGGAGGTGTTG R: TCATGGCCTTCTGATGCTG	174
<i>ebp</i>	F: GCCACGCAACCTGTCTATT R: TGGATGAAGCCACACACAGT	195
<i>dhcr24</i>	F: TGTTCTATGCCGTTCTTGG R: TGGCTGATTCCCTCTGCAAAC	153
<i>dhcr7</i>	F: GCCTGTGGTGGAGATCACTTAC R: GATGTCGGCAGTAAACGGTAG	162
<i>ch25h</i>	F: TCGGACAAGACTGGAACA R: CGGACTCAGAACGCATCAC	239
<i>cyp7a1</i>	F: GGAATTAAACAACCAGGACCAAC R: GCAACGTGATCTCCTCTCCTTAT	195
<i>sult2b1</i>	F: TCGTGCCTTGATAGTGAGC R: CATTGCGTGATGGAAGTGAG	158
<i>sts</i>	F: CACTGCCACCACCTAACTCTC R: ACCAGGAAACCAGACCAATAC	155
<i>hsd3b</i>	F: GTGAGGCAAAAGTGAATCCTGT R: TGTATCCCAAAGCCTAATGGTG	193
18S	F: GGAGGTTCGAAGACGATCAG R: GTGAGGTTCCCGTTGAG	183

1.5 鳃组织 DNA 提取及 DNA 甲基化特异性 PCR (MS-PCR)

按照基因组 DNA 提取纯化试剂盒(Invitrogen, 美国)说明书提取不同处理组中各 3 尾鱼鳃组织($n=3$)的总 DNA, 使用 Nanodrop 8000 分光光度计检测浓度和纯度, 1%琼脂糖凝胶电泳评估完整度。使用在线软件 MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer>)在基因启动子区(转录起始位点上游 2000 bp)的 CpG 岛上设计甲基化引物(M)和非甲基化引物(U), 由北京诺赛基因组研究中心合成(表 2)。根据 Mag-DNA Modification Kit (上海生工生物工程有限公司)说明书对不同处理组的鳃 DNA 进行重亚硫酸盐修饰, 并以此作为 DNA 模板进行 MS-PCR。反应程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 7 min, 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。使用 Image J 测定 PCR 产物的条带灰度值。

表2 MS-PCR 基因引物信息

Tab. 2 Primer information for MS-PCR

基因 gene	引物序列(5'-3') sequence of primer (5'-3')	产物长 度/bp product size
<i>Ebp</i> (M)	F: ATTGTAGAAATATCGCGTTATCGA R: CATTACATATTCCGAAAAAATCGTC	137
<i>Ebp</i> (U)	F: AATTGTAGAAATATTGTGTTATTGA R: CATTACATATTCCAAAAAAATCATC	139
<i>slut2b1</i> (M)	F: GCGGAAATAAGTTTATAGAATTACG R: CTAATCGAATATAAACCCACTAACG	149
<i>slut2b1</i> (U)	F: GGTGGAAATAAGTTTATAGAATTATGA R: AAAACTAACCAATATAAACCCACTAACG	150

1.6 数据处理

1.6.1 血清差异类固醇激素筛选及分析 基于多变量统计分析的正交偏最小二乘法判别分析模型(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)得到变量重要性投影(variable importance in projection, VIP), 同时结合单变量统计分析的P-value/FDR或者差异倍数(fold change, FC)筛选差异类固醇激素。差异显著的类固醇激素筛选标准: VIP>1, FC>2和FC<0.5或P<0.05。使用云平台工具(<https://hiplot.com.cn/cloud-tool>)对筛选的差异类固醇激素进行热图分析。利用KOBAS (v3.0)对差异代谢物进行KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)富集分析。

1.6.2 显著性分析 本研究所有数据均以“平均值±标准差”表示。所有RT-qPCR数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。采用SPSS19.0进行单因素方差分析(one-way ANOVA)以及Duncan多重比较检验差异类固醇激素含量、RT-qPCR数据以及基因条带灰

度值的差异显著性; 并利用GraphPad Prism 9.0.0绘制图表, 其中RT-qPCR数据的基因相对表达量与鳃组织转录组测序(RNA-seq)数据中的FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)值以双坐标轴的柱状图和折线图形式呈现。

2 结果与分析

2.1 血清差异类固醇激素分析

与淡水组(FW)的类固醇激素含量的热图分析显示, 达里湖瓦氏雅罗鱼的固醇、孕激素和皮质激素含量均在50 mmol/L碱胁迫组和淡水恢复组发生显著变化(图1)。其中胆固醇(cholesterol)、25-羟基胆固醇(25-hydroxycholesterol)和7 α , 25-羟基胆固醇(7 α , 25-hydroxycholesterol)含量在碱胁迫组(AW1、AW5、AW10)升高, 在淡水恢复组(FW1、FW5、FW10)降低; 而孕烯醇酮(pregnenolone)、17 α -羟孕酮(17 α -hydroxyprogesterone)、脱氢可的松(cortexolone)和皮质醇(cortisol)含量在碱胁迫组降低, 在淡水恢复组升高(图1)。不同处理组的差异显著性分析显示, 胆固醇在AW5和AW10中极显著升高(P<0.0001), 在FW1、FW5和FW10均极显著降低(P<0.0001, 图2a); 25-羟基胆固醇和7 α , 25-羟基胆固醇在AW1、AW5和AW10均极显著升高(P<0.01), 在FW1、FW5和FW10均极显著降低(P<0.01, 图2b, 2c); 孕烯醇酮和17 α -羟孕酮在AW1、AW5和AW10均极显著降低(P<0.001, 图2d, 2e), 孕烯醇酮在FW1、FW5和FW10均显著升高(P<0.05, 图2d), 17 α -羟孕酮在FW5中极显著升高(P<0.0001, 图2e); 脱氢可的

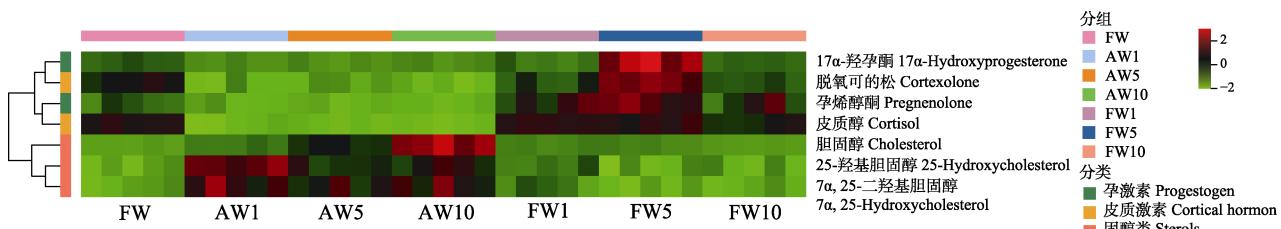


图1 瓦氏雅罗鱼不同处理组的血清差异类固醇激素含量热图分析

FW: 对照组; AW1、AW5 和 AW10: 碱胁迫组; FW1、FW5 和 FW10: 淡水恢复组。

Fig. 1 Heat map analysis of serum differential steroid hormone contents in different treatment groups of *Leuciscus waleckii*. FW: Control group; AW1, AW5 and AW10: bicarbonate alkalinity stress group; FW1, FW5 and FW10: freshwater restoration group.

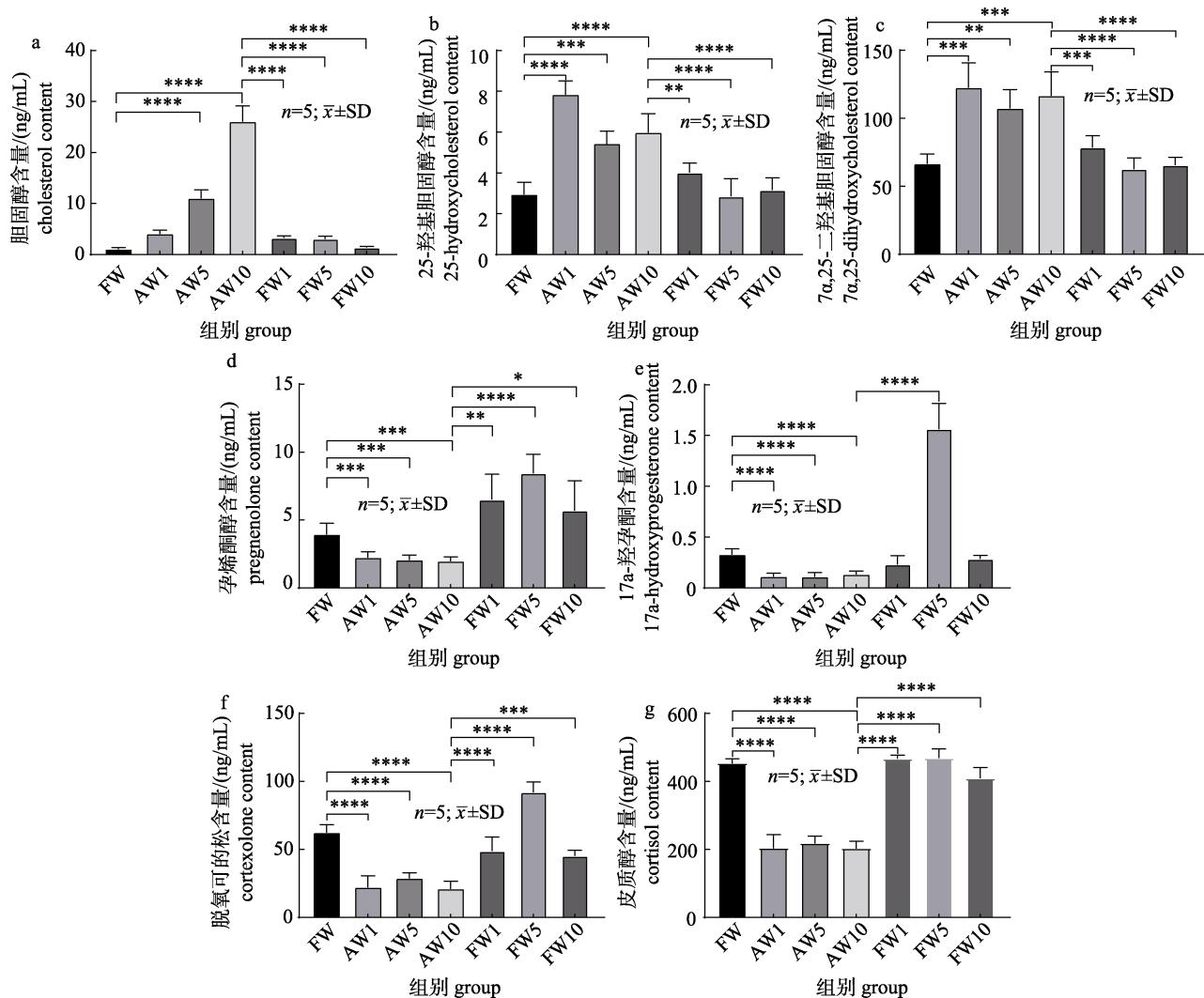


图2 瓦氏雅罗鱼不同处理组血清差异类固醇激素含量分析

a. 胆固醇含量; b. 25-羟基胆固醇含量; c. 7 α , 25-羟基胆固醇含量; d. 孕烯酮醇含量; e. 17 α -羟孕酮含量; f. 脱氧可的松含量; g. 皮质醇含量. FW: 对照组; AW1、AW5 和 AW10: 碱胁迫组; FW1、FW5 和 FW10: 淡水恢复组; 直方图上标记的*表示不同处理组间差异显著($P<0.05$), **、***和****表示不同处理组间差异极显著($P<0.01, P<0.001, P<0.0001$).

Fig. 2 Analysis of serum differential steroid hormone contents in different treatment groups of *Leuciscus waleckii*
a. Cholesterol content; b. 25-Hydroxycholesterol content; c. 7 α , 25-Hydroxycholesterol content; d. Pregnenolone content;
e. 17 α -Hydroxyprogesterone content; f. Cortexolone content; g. Cortisol content. FW: Control group; AW1,
AW5 and AW10: bicarbonate alkalinity stress group; FW1, FW5 and FW10: freshwater restoration group;

Marked * on the histogram indicates significant differences between species ($P<0.05$),
, *, and **** indicate highly significant differences between species ($P<0.01, P<0.001, P<0.0001$).

松和皮质醇在 AW1、AW5 和 AW10 均极显著降低($P<0.0001$), 在 FW1、FW5 和 FW10 均极显著升高($P<0.001$, 图 2f, 2g)。

2.2 差异类固醇激素的 KEGG 通路分析及通路关键基因差异表达分析

通过对差异类固醇激素的 KEGG 功能注释以及富集分析发现, 达里湖瓦氏雅罗鱼在室内双向跨境胁迫实验中差异表达的类固醇激素主要富集

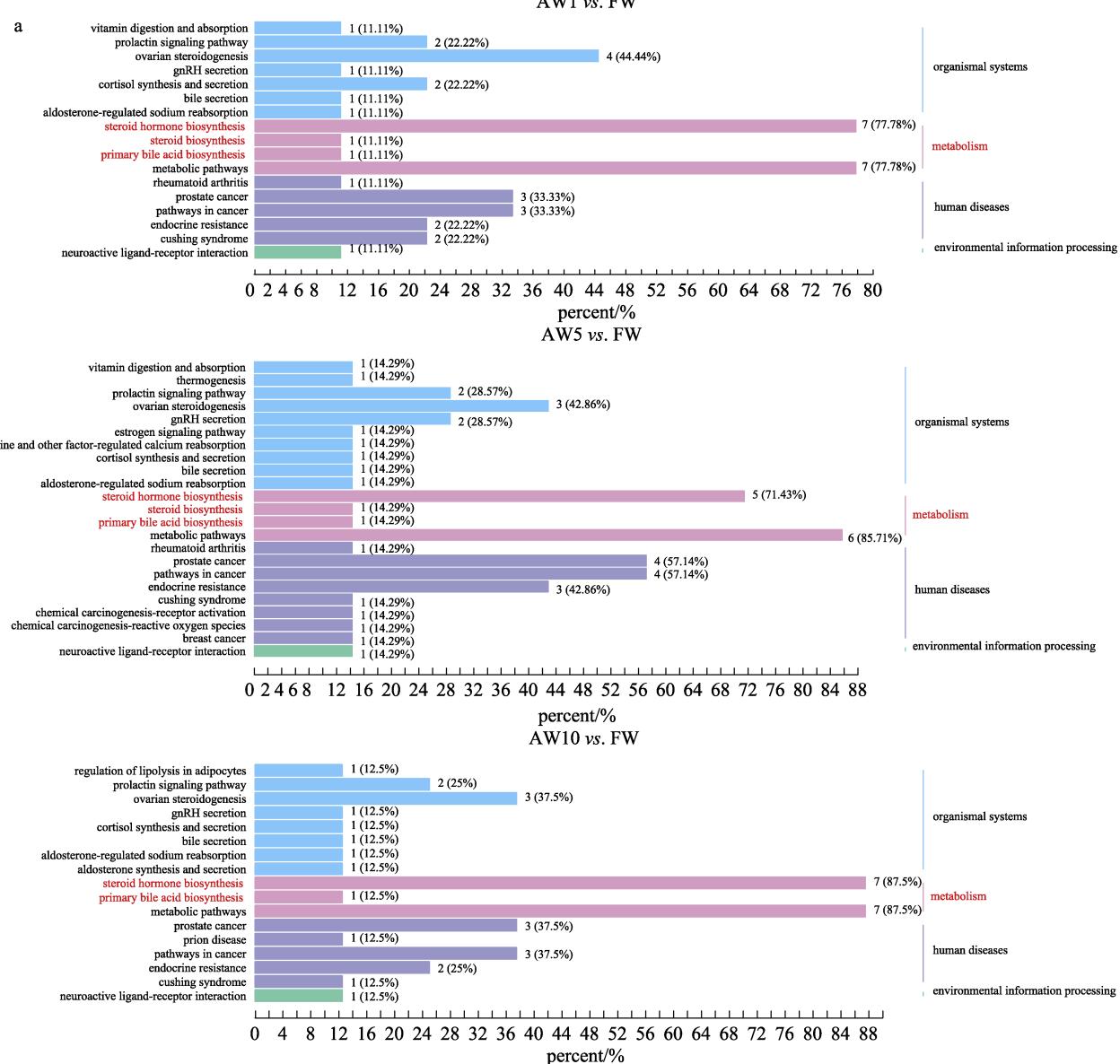
在类固醇生物合成(steroid biosynthesis)、初级胆汁酸生物合成(primary bile acid biosynthesis)及类固醇激素生物合成(steroid hormone biosynthesis)3个通路(图 3)。通过整合鳃组织转录组测序(待发表)和 RT-qPCR 的结果可以看出, 3个通路的关键基因表达趋势与不同处理组的差异类固醇激素含量水平基本相符。具体来看, *hsd17b7* 和 *dhcr24* 在 AW1、AW5 和 AW10 均极显著高表达($P<0.001$),

在 FW1、FW5 和 FW10 均极显著低表达($P<0.0001$, 图 4a, 4c); *ebp* 在 AW1、AW5 和 AW10 均显著高表达($P<0.05$), 且在 AW5 和 AW10 极显著高表达($P<0.0001$), 在 FW1、FW5 和 FW10 均极显著低表达($P<0.0001$, 图 4b); *dhcr7* 在 AW5 和 AW10 极显著高表达($P<0.0001$), 在 FW5 和 FW10 极显著低表达($P<0.01$, 图 4d); 另外, *ch25h* 和 *cyp7a1* 在 AW1、AW5 和 AW10 均极显著高表达($P<0.0001$), 在 FW1、FW5 和 FW10 均极显著低表达($P<0.01$, 图 4e, 4f); *sult2b1* 在 AW1、AW5 和 AW10 均极显著高表达($P<0.001$), *sts* 在 AW5 和 AW10 极显著高表达($P<0.0001$), *sult2b1* 和 *sts* 在 FW1、FW5 和

FW10 均极显著低表达($P<0.01$, 图 4g, 4h); *hsd3b* 在 AW1、AW5 和 AW10 均低表达, 在 AW1 极显著低表达($P<0.01$), 在 FW1、FW5 和 FW10 均极显著高表达($P<0.01$, 图 4i)。

2.3 鳕组织关键靶基因启动子区的甲基化鉴定

将通路中的差异表达基因与课题组全基因组重亚硫酸盐甲基化测序(whole genome bisulfite sequencing, WGBS)结果对比发现, *ebp* 和 *sult2b1* 基因启动子区域在不同处理组存在差异甲基化区域, 且均在碱胁迫组呈低甲基化水平, 而在淡水恢复组呈高甲基化水平(待发表)。其中 *sult2b1* 基因启动子区域的差异甲基化也通过了 MS-PCR 验



(待续 to be continued)

(续图3 Fig. 3 continued)

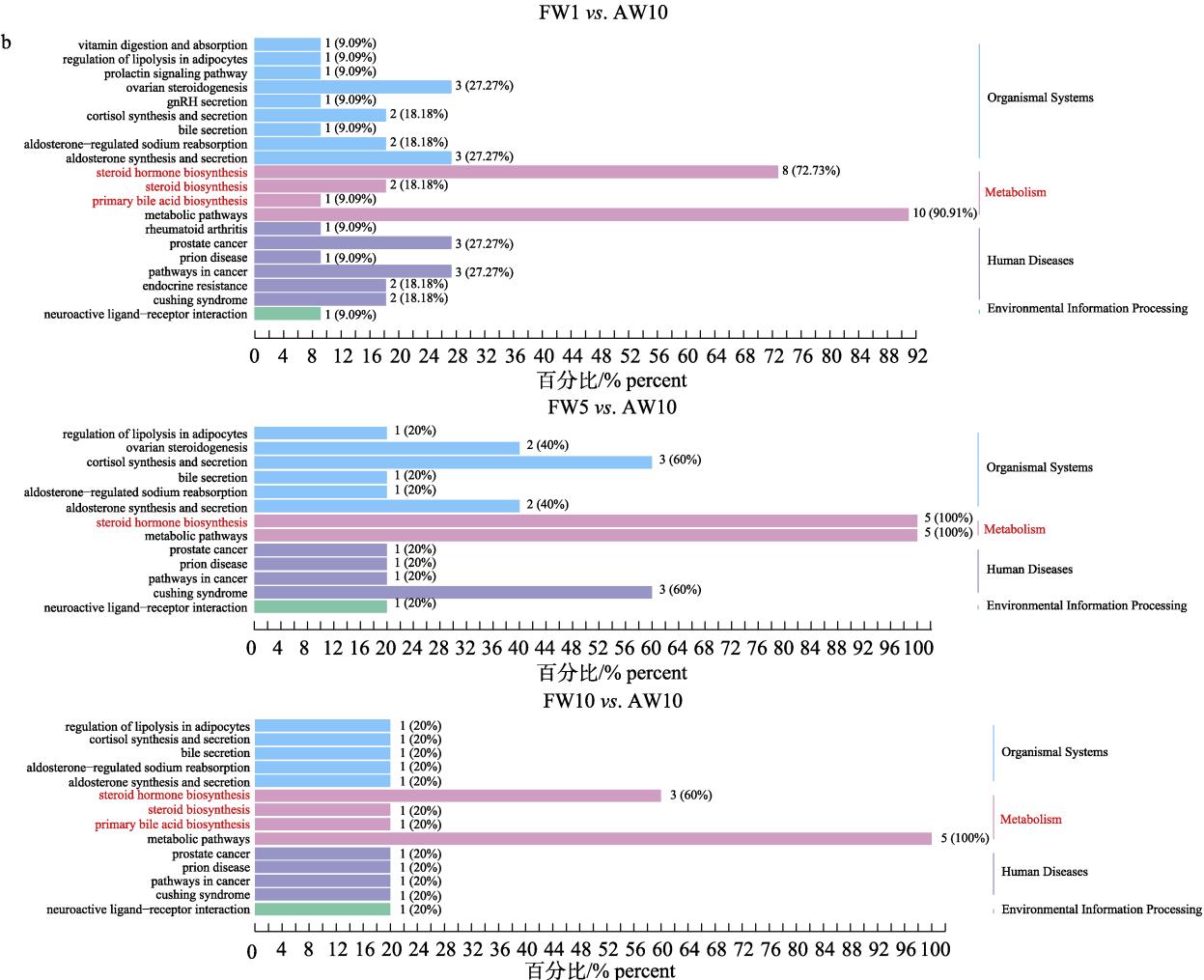


图3 瓦氏雅罗鱼不同处理组血清差异类固醇激素KEGG通路分析

a. 碱胁迫组与对照组差异类固醇激素的富集通路; b. 淡水恢复组与对照组差异类固醇激素的富集通路.

FW: 对照组; AW1、AW5 和 AW10: 碱胁迫组; AW10: 对照组; FW1、FW5 和 FW10: 淡水恢复组.

Fig. 3 Analysis of the KEGG pathway of steroid hormones in the serum of different treatment groups of *Leuciscus waleckii*

- a. The enrichment pathway of steroid hormones differs between the bicarbonate alkalinity stress group and the control group;
- b. The enrichment pathway of steroid hormones differs between the freshwater restoration group and the control group.

FW: Control group; AW1, AW5 and AW10: Bicarbonate alkalinity stress group; AW10: Control group;

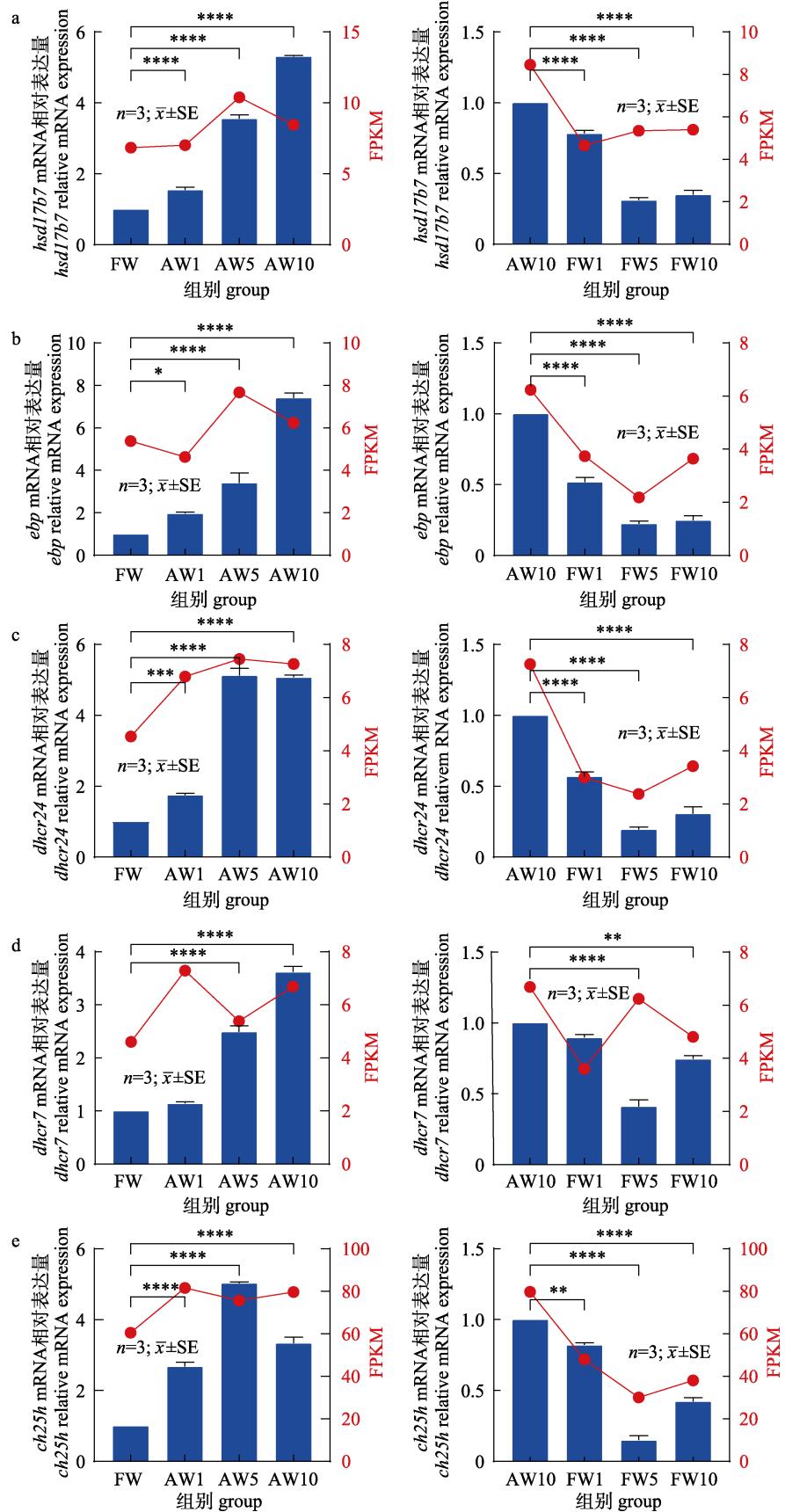
FW1, FW5 and FW10: Freshwater restoration group.

证。由图5可以看出, *sult2b1*基因的甲基化引物(M)和非甲基化引物(U)均在不同处理组的鳃组织DNA扩增出了PCR条带, 说明该基因启动子区域发生了部分甲基化。通过条带灰度值分析发现, 碱胁迫组不同时间节点(AW1、AW5和AW10)的PCR条带灰度值均极显著小于淡水对照组(FW)($P<0.001$, 图6a); 而淡水恢复组不同时间节点(FW1、FW5和FW10)的PCR条带灰度值均显著大于碱对照组(AW10)($P<0.05$, 图6b)。这与

WGBS测序结果相符。

3 讨论

一般来说, 硬骨鱼类的类固醇激素合成是由下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPI轴/HPA轴)和下丘脑-垂体-性腺轴(HPG轴)控制的, 前者主要控制应激和免疫, 后者控制生殖^[24-26]。大量研究发现, 类固醇激素参与多种生理过程, 如胚胎发育、新陈代谢、免疫反应和渗透压调节等^[17-18,27]。本研究通过对



(待续 to be continued)

(续图4 Fig. 4 continued)

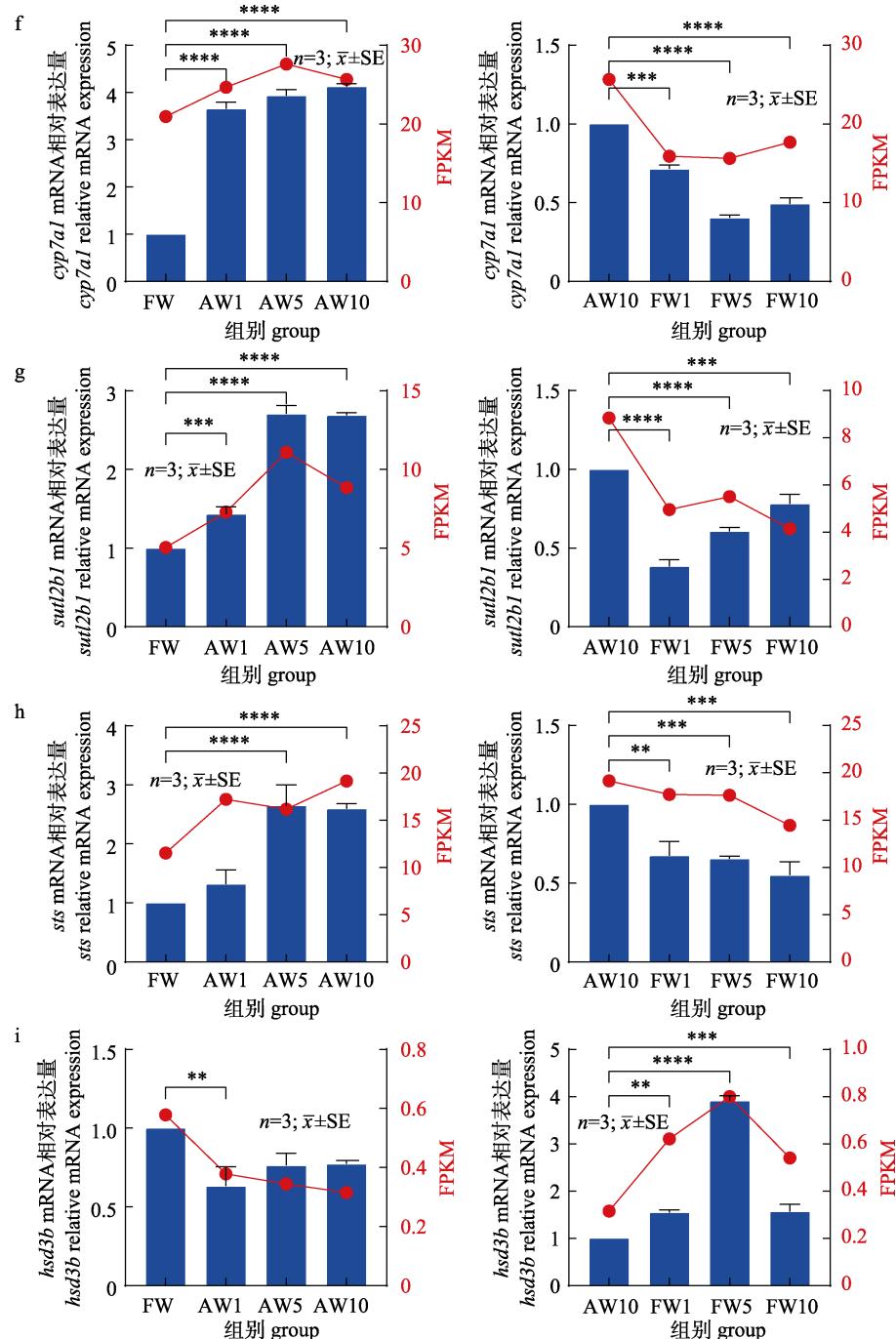


图4 通路相关基因在瓦氏雅罗鱼不同处理组鳃组织的相对表达量

a. *hsd17b7* 相对表达量; b. *ebp* 相对表达量; c. *dhcr24* 相对表达量; d. *dhcr7* 相对表达量; e. *ch25h* 相对表达量;
f. *cyp7a1* 相对表达量; g. *sult2b1* 相对表达量; h. *sts* 相对表达量; i. *hsd3b* 相对表达量. FW: 对照组; AW1、AW5 和 AW10: 碱胁迫组; FW1、FW5 和 FW10: 淡水恢复组; 直方图上标记的*表示不同比较组间差异显著($P<0.05$), **、***和****表示不同比较组间差异极显著($P<0.01, P<0.001, P<0.0001$).

Fig. 4 The relative expression levels of pathway related genes in gills of different treatment groups of *Leuciscus waleckii*
a. *hsd17b7* relative expression; b. *ebp* relative expression; c. *dhcr24* relative expression; d. *dhcr7* relative expression;
e. *ch25h* relative expression; f. *cyp7a1* relative expression; g. *sult2b1* relative expression; h. *sts* relative expression;
i. *hsd3b* relative expression. FW: control group; AW1, AW5 and AW10: bicarbonate alkalinity stress group;
FW1, FW5 and FW10: freshwater restoration group; Marked * on the histogram indicates significant differences between species
($P<0.05$), **, *** and **** indicate highly significant differences between species ($P<0.01, P<0.001, P<0.0001$).

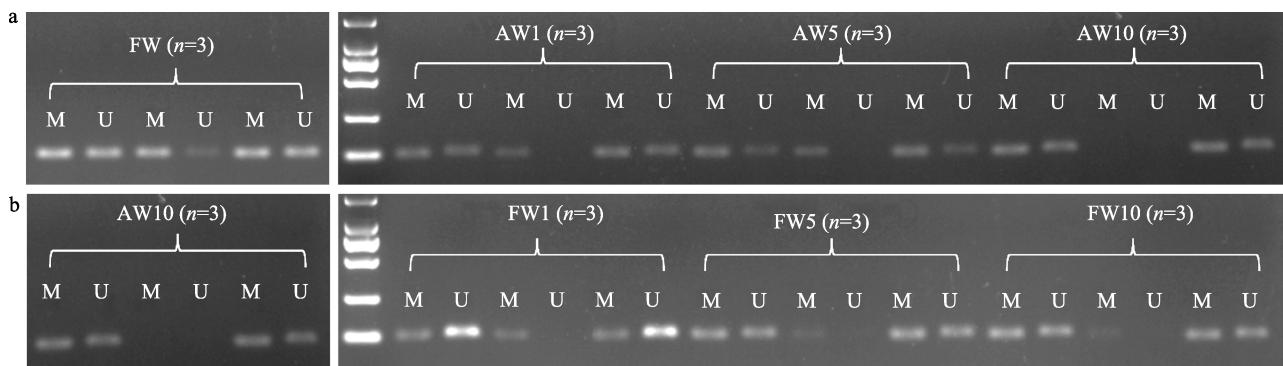


图 5 不同处理组鳃组织 *sult2b1* 基因启动子区域 MS-PCR 产物电泳图

a. 碱胁迫组(AW1、AW5 和 AW10)与对照组(FW); b. 淡水恢复组(FW1、FW5 和 FW10)与对照组(AW10).

M: 甲基化引物; U: 非甲基化引物.

Fig. 5 Electrophoretic patterns of MS-PCR products in the promoter region of *sult2b1* in gills of different treatment groups

a. Bicarbonate alkalinity stress group (AW1, AW5 and AW10) and control group (FW); b: Freshwater restoration group (FW1, FW5 and FW10) and control group (AW10). M: methylation primer; U: non-methylation primer.

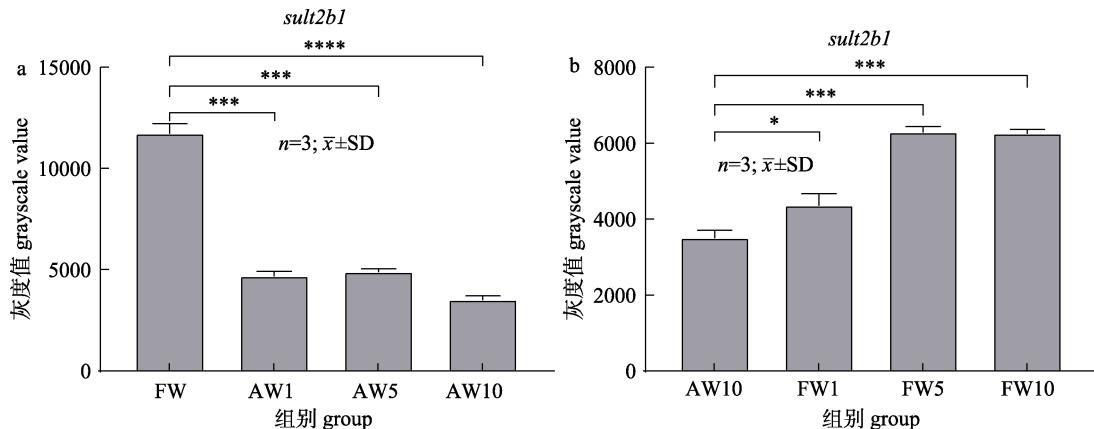


图 6 不同处理组鳃组织 *sult2b1* 基因启动子区域 MS-PCR 条带灰度值

a. *sult2b1* 在碱胁迫组与对淡水对照组中的甲基化引物条带灰度值; b. *sult2b1* 在淡水恢复组与碱胁迫组中的甲基化引物条带灰度值. FW: 对照组; AW1、AW5 和 AW10: 碱胁迫组; FW1、FW5 和 FW10: 淡水恢复组; 直方图上标记的*表示组间差异显著($P<0.05$), ***和****表示组间差异极显著($P<0.001$, $P<0.0001$).

Fig. 6 Grayscale values of MS-PCR bands in the promoter region of *sult2b1* in gills of different treatment groups

a. The grayscale values of methylated primer bands of *sult2b1* between bicarbonate alkalinity group and the control group;
b. The grayscale values of methylated primer bands of *sult2b1* in the freshwater restoration group and the control group.
FW: control group; AW1, AW5 and AW10: bicarbonate alkalinity stress group; FW1, FW5 and FW10: freshwater restoration group; Marked * on the histogram indicates significant differences between species ($P<0.05$), *** and **** indicate highly significant differences between species ($P<0.001$, $P<0.0001$).

不同处理组达里湖瓦氏雅罗鱼血清差异类固醇激素及鳃组织靶基因表达水平的关联分析发现, 胆固醇是类固醇生物合成、初级胆汁酸生物合成及类固醇激素生物合成通路中的共有且关键的中间产物, 由类固醇生物合成通路合成并参与下游胆汁酸和类固醇激素的合成(图 7)。这与 Xu 等^[28]在不同盐度驯养下的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肝组织转录组通路分析研究结果相符,

即参与类固醇生物合成和类固醇激素生物合成途径的差异表达基因显著富集, 且胆固醇是这些生物合成途径的中间产物。

胆固醇是动物细胞膜的组成部分, 在维持细胞膜结构完整性和流动性方面发挥重要作用, 通过改变其在细胞膜中的含量参与渗透压调节^[29-31]。Bao 等^[32]发现, 饲粮中添加适量的胆固醇可以促进鱼类肝脏中脂肪酸的积累, 从而调节细胞膜通

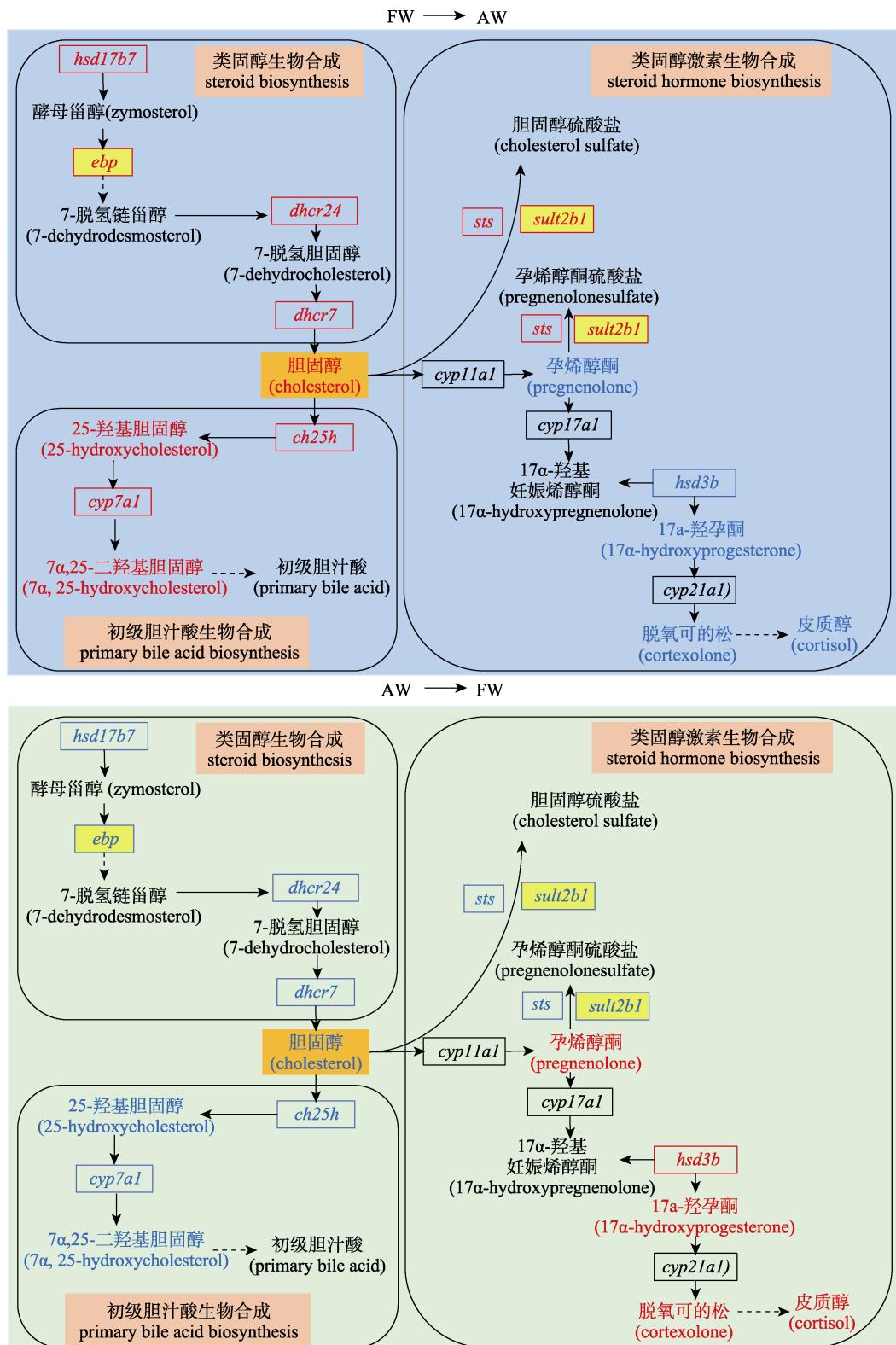


图 7 类固醇激素参与达里湖瓦氏雅罗鱼不同环境转变过程的渗透压调节

红色: 基因表达量和代谢物含量上调; 蓝色: 基因表达量和代谢物含量下调; 黄色: DNA 甲基化基因.

Fig. 7 Steroid hormones participate in osmoregulation in the transition of different water environments in *Leuciscus waleckii*
Red: increased gene expression and metabolite content; Blue: decreased gene expression and metabolite content;
Yellow: DNA methylation genes.

透性, 维持离子平衡。另外, Xu 等^[33]也发现在饲料中添加适量的胆固醇通过调节 HPI 轴提高鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶活性和血清皮质醇含量来改善尼罗罗非鱼的高渗适应。本研究发现, 50 mmol/L 碳酸氢钠碱胁迫使瓦氏雅罗鱼血清胆固醇含量显著增加(图 2a), 且参与其合成途径的关键基因(*hsd17b7*、*ebp*、*dhcr24*、*dhcr7*)的表达量同样也显著升高(图 4a、d), 这与 Xu 等^[34]在盐碱胁迫下瓦氏雅罗鱼肝脏中的胆固醇合成显著增加的研究结果一致。

胆固醇是胆汁酸生物合成的前体^[35-36]。胆汁酸是胆汁的重要成分, 在脂肪代谢中发挥重要作用^[37-38]。胆固醇 7a-羟化酶(*cyp7a1*)是初级胆汁酸合成的重要酶, 促进胆固醇分解代谢^[39]。本研究发现, 初级胆汁酸生物合成途径关键差异代谢物(25-羟基胆固醇、7 α , 25-二羟基胆固醇)及其靶基因(*ch25h*、*cyp7a1*)在碱胁迫下显著富集和高表达, 表明胆固醇可能通过 25-羟化酶通路, 由 *cyp7a1* 介导转化并促进初级胆汁酸合成(图 2b、c, 图 4e、f)。这与 Kortner 等^[39]在大西洋鲑(*Salmo salar*)和 Deng 等^[40]在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的研究结果相符, 通过喂食高水平胆固醇补充剂会促进 *cyp7a1* 的表达。淡水恢复后, 参与胆固醇合成和转化为初级胆汁酸通路的关键基因及其代谢物含量均呈下降态势, 表明类固醇生物合成和初级胆汁酸生物合成通路参与了达里湖瓦氏雅罗鱼由高渗到低渗的渗透压调节。

由图 6 可知, 在胆固醇合成通路中, *ebp* 基因处于关键调控位置, 这与 Chen 等^[41]对胆固醇合成通路的研究结果相符合。甲基化分析显示, 碱水胁迫使 *ebp* 基因启动子区的甲基化水平降低, 引发该基因及其通路上其他基因(*hsd17b7*、*dhcr24*、*dhcr7*)表达量增加(图 4a, 4c, 4d), 导致胆固醇的合成增加(图 2a); 相反地, 淡水恢复过程中, 该基因及其通路基因表达量均呈下降趋势, 表明 *ebp* 基因通过启动区的甲基化修饰调控胆固醇的生物合成, 以缓解渗透压变化对瓦氏雅罗鱼造成的机体损伤。因此本研究推测, 碱胁迫下达里湖瓦氏雅罗鱼可能通过降低 *ebp* 基因甲基化水

平, 提高胆固醇的合成, 促进脂肪酸的积累来调节细胞膜的通透性, 或者通过调节 HPI 轴来增强离子转运达到对高碱环境的适应。同样地, 胆固醇含量的变化也引发了下游胆汁酸合成通路相关基因表达和代谢物含量在不同环境下的变化, 进一步证实 *ebp* 基因是调控胆固醇合成的关键基因。

胆固醇也是类固醇激素生物合成的前体^[42-43]。碱胁迫下, 由羟基类固醇磺基转移酶基(*sult2b1*)催化胆固醇合成的胆固醇硫酸盐通路被激活(图 7)。达里湖瓦氏雅罗鱼鳃 *sult2b1* 的表达水平显著升高(图 4g), 这与盐度胁迫下尼罗罗非鱼肝脏 *sult2b1* 显著高表达的结果一致^[44]。胆固醇硫酸盐在维持细胞膜稳定、黏膜屏障的愈合和防止渗透诱导的细胞裂解等方面发挥着重要作用^[45-46]。星形胶质细胞在细胞外离子的调节中发挥着重要作用, 而胆固醇硫酸盐通过增加线粒体磷酸化、ATP 和糖原含量来影响星形胶质细胞代谢^[47-48]。同样地, *sult2b1* 也催化孕烯酮醇生成孕烯酮醇硫酸盐。孕烯酮醇硫酸盐通过与钾、钠、钙离子通道相互作用, 在维持细胞离子和渗透压稳态方面发挥重要作用^[49-52]。

另外, 碱胁迫下, 由细胞色素 p450 侧链裂解酶(*cyp11a1*)介导胆固醇合成的孕烯醇酮通路被抑制(图 7)。孕烯酮醇是孕酮、盐皮质激素、糖皮质激素、性激素等的合成前体^[53]。孕烯醇酮, 17 α -羟孕酮, 脱氧可的松和皮质醇的含量在碱胁迫组降低, 在淡水恢复组升高(图 2d~2g), 这与参与调控这些代谢物的基因表达趋势相符(图 4i)。大部分研究发现, 皮质醇是环境适应型激素, 在从淡水转移到海水后以及盐碱胁迫下含量增加^[54-56]。而本研究发现, 碱胁迫使皮质醇含量显著下降, 推测可能是由于 *sult2b1* 和 *sts* 基因表达的升高将一部分胆固醇和孕烯酮醇分别转化为胆固醇硫酸盐和孕烯酮醇硫酸盐。另外, 实验中所用的达里湖瓦氏雅罗鱼正处于产卵期, 碱水胁迫导致性腺发育阻滞^[13,57-58], 孕烯酮醇含量下降, 导致皮质醇含量降低。淡水恢复后, 达里湖瓦氏雅罗鱼性腺发育恢复, 孕烯酮醇含量增加, 引发性激素如 17 α -羟孕酮的含量增加。因此, 类固醇激素生物合

成通路既负责渗透压调节, 又参与性激素合成。

甲基化分析显示, *sult2b1* 基因在碱胁迫下的启动子区域发生低甲基化, 而在淡水恢复高甲基化(图 5, 图 6), 启动子区在不同环境下的表观修饰与基因表达呈显著负相关(图 4g), 表明胆固醇硫酸盐和孕烯酮醇硫酸盐的生物合成受表观调控的影响, 参与达里湖瓦氏雅罗鱼碱胁迫下的渗透压调节。

4 结论

(1) 达里湖瓦氏雅罗鱼在不同处理组的血清差异类固醇激素主要富集在类固醇生物合成、类固醇激素生物合成和初级胆汁酸生物合成3条通路。

(2) 结合鳃组织 RNA-seq 数据和 RT-qPCR 结果, 发现与通路相关关键基因的表达水平与其血清类固醇激素含量在不同环境下的表现形式基本相符。

(3) 胆固醇是富集通路共享且关键的中间产物。结合鳃组织 WGBS 数据和关键基因 MS-PCR 结果, 发现参与胆固醇合成的 *ebp* 和催化其分解代谢的 *sult2b1* 基因的启动子区受 DNA 甲基化修饰, 进而调控通路上其他关键基因的差异表达, 影响类固醇激素含量, 参与达里湖瓦氏雅罗鱼在不同环境的渗透压调节。

综上, 本研究从激素含量、基因表达和表观修饰等层面探究了达里湖瓦氏雅罗鱼渗透压调节机制, 为鱼类耐碱分子机制解析、移植驯化和耐碱新品种培育提供了理论依据和科学指导。

参考文献:

- [1] Chang Y M, He Q, Sun Y C, et al. Changes in plasma free amino acid levels in *Leuciscus waleckii* exposed to different environmental alkalinity levels[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 117-124. [常玉梅, 何强, 孙言春, 等. 碳酸盐碱度胁迫下瓦氏雅罗鱼血浆游离氨基酸水平的变化[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 117-124.]
- [2] Zhao X F, Liang L Q, Liew H J, et al. Identification and analysis of long non-coding RNAs in *Leuciscus waleckii* adapted to highly alkaline conditions[J]. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 665268.
- [3] Chi B J, Chang Y M, Yan X C, et al. Genetic variability and genetic structure of *Leuciscus waleckii* Dybowskii in Wusuli River and Dali Lake[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 228-235. [池炳杰, 常玉梅, 闫学春, 等. 瓦氏雅罗鱼达里湖群体和乌苏里江群体的遗传多样性和遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 228-235.]
- [4] Chang Y M, Tang R, Sun X W, et al. Genetic analysis of population differentiation and adaptation in *Leuciscus waleckii*[J]. Genetica, 2013, 141(10-12): 417-429.
- [5] Wang N, Chang Y M, Tang R, et al. Screening microsatellite markers associated with alkaline tolerance in *Leuciscus waleckii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(6): 1105-1114. [王楠, 常玉梅, 唐然, 等. 瓦氏雅罗鱼耐碱性状相关分子标记的筛选[J]. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1105-1114.]
- [6] Wang R F, Liu Y H, Wang J, et al. Physiological regulation of ionic in Amur ide (*Leuciscus waleckii*) during their spawning migration[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(4): 832-840. [王瑞芳, 刘玉辉, 王俊, 等. 瓦氏雅罗鱼生殖洄游过程中离子调节相关生理变化研究[J]. 水生生物学报, 2019, 43(4): 832-840.]
- [7] Chang Y M, Zhao X F, Liew H J, et al. Effects of bicarbonate stress on serum ions and gill transporters in alkali and freshwater forms of Amur ide (*Leuciscus waleckii*)[J]. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 676096.
- [8] Xu J, Li J T, Jiang Y L, et al. Genomic basis of adaptive evolution: The survival of Amur ide (*Leuciscus waleckii*) in an extremely alkaline environment[J]. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34(1): 145-159.
- [9] Wang S Y, Kuang Y Y, Liang L Q, et al. Resequencing and SNP discovery of Amur ide (*Leuciscus waleckii*) provides insights into local adaptations to extreme environments[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): Article No.5064.
- [10] Zhou Z X, Yang J Y, Lv H Z, et al. The adaptive evolution of *Leuciscus waleckii* in Lake Dali nur and convergent evolution of Cypriniformes fishes inhabiting extremely alkaline environments[J]. Genome Biology and Evolution, 2023, 15(5): evad082.
- [11] Xu J, Li Q, Xu L M, et al. Gene expression changes leading extreme alkaline tolerance in Amur ide (*Leuciscus waleckii*) inhabiting soda lake[J]. BMC Genomics, 2013, 14: Article No.682.
- [12] Chang Y M, Tang R, Dou X J, et al. Transcriptome and expression profiling analysis of *Leuciscus waleckii*: An exploration of the alkali-adapted mechanisms of a freshwater teleost[J]. Molecular BioSystems, 2014, 10(3): 491-504.
- [13] Wang S Y, Huang J, Liang L Q, et al. Distinctive metabolite profiles in migrating Amur ide (*Leuciscus waleckii*) reveal changes in osmotic pressure, gonadal development, and

- energy allocation strategies[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2022, 10: 997827.
- [14] Cui J, Xu J, Zhang S H, et al. Transcriptional profiling reveals differential gene expression of Amur ide (*Leuciscus waleckii*) during spawning migration[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(6): 13959-13972.
- [15] Chen B H, Xu J, Cui J, et al. Transcriptional differences provide insight into environmental acclimatization in wild Amur ide (*Leuciscus waleckii*) during spawning migration from alkalized lake to freshwater river[J]. *Genomics*, 2019, 111(3): 267-276.
- [16] Holst J P, Soldin O P, Guo T D, et al. Steroid hormones: Relevance and measurement in the clinical laboratory[J]. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2004, 24(1): 105-118.
- [17] Funder J W, Krozowski Z, Myles K, et al. Mineralocorticoid receptors, salt, and hypertension[J]. *Recent Progress in Hormone Research*, 1997, 52: 247-260; discussion 261-262.
- [18] Frye C A. Steroids, reproductive endocrine function, and affect. A review[J]. *Minerva Ginecologica*, 2009, 61(6): 541-562.
- [19] Yin D H, Lin D Q, Ying C P, et al. Metabolic mechanisms of *Coilia nasus* in the natural food intake state during migration [J]. *Genomics*, 2020, 112(5): 3294-3305.
- [20] Wei X F, Liu Y J, Li S W, et al. Stress response and tolerance mechanisms of NaHCO₃ exposure based on biochemical assays and multi-omics approach in the liver of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, 253: 114633.
- [21] Matey V, Richards J G, Wang Y X, et al. The effect of hypoxia on gill morphology and ionoregulatory status in the Lake Qinghai scaleless carp, *Gymnocypris przewalskii*[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2008, 211(7): 1063-1074.
- [22] Guh Y J, Lin C H, Hwang P P. Osmoregulation in zebrafish: Ion transport mechanisms and functional regulation[J]. *EXCLI Journal*, 2015, 14: 627-659.
- [23] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste[J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(1): 97-177.
- [24] Löhr H, Hammerschmidt M. Zebrafish in endocrine systems: Recent advances and implications for human disease[J]. *Annual Review of Physiology*, 2011, 73(1): 183-211.
- [25] Liu C S, Zhang X W, Deng J, et al. Effects of prochloraz or propylthiouracil on the cross-talk between the HPG, HPA, and HPT axes in zebrafish[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(2): 769-775.
- [26] Stacey N. Hormones, pheromones and reproductive behavior [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1): 229-235.
- [27] Tokarz J, Möller G, de Angelis M H, et al. Steroids in teleost fishes: A functional point of view[J]. *Steroids*, 2015, 103: 123-144.
- [28] Xu Z X, Gan L, Li T Y, et al. Transcriptome profiling and molecular pathway analysis of genes in association with salinity adaptation in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136506.
- [29] Pang S, Guo M C, Zhang X, et al. Myclobutanil developmental toxicity, bioconcentration and sex specific response in cholesterol in zebrafish (*Denio rerio*)[J]. *Chemosphere*, 2020, 242: 125209.
- [30] Oakes V, Domene C. Influence of cholesterol and its stereoisomers on members of the serotonin receptor family[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(8): 1633-1649.
- [31] Tseng Y C, Hwang P P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, 148(4): 419-429.
- [32] Bao Y G, Shen Y D, Li X J, et al. A new insight into the underlying adaptive strategies of euryhaline marine fish to low salinity environment: Through cholesterol nutrition to regulate physiological responses[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 855369.
- [33] Xu C, Li E C, Xu Z X, et al. Growth and stress axis responses to dietary cholesterol in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in brackish water[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: Article No.254.
- [34] Xu J, Li Q, Xu L M, et al. Gene expression changes leading extreme alkaline tolerance in Amur ide (*Leuciscus waleckii*) inhabiting soda lake[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: Article No.682.
- [35] Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, 43(8): 779-804.
- [36] Javitt N B. Bile acid synthesis from cholesterol: Regulatory and auxiliary pathways[J]. *FASEB Journal*, 1994, 8(15): 1308-1311.
- [37] Staels B, Fonseca V A. Bile acids and metabolic regulation: Mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(Suppl 2): S237-S245.
- [38] Schonewille M, de Boer J F, Groen A K. Bile salts in control of lipid metabolism[J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2016, 27(3): 295-301.

- [39] Kortner T M, Björkhem I, Krasnov A, et al. Dietary cholesterol supplementation to a plant-based diet suppresses the complete pathway of cholesterol synthesis and induces bile acid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *The British Journal of Nutrition*, 2014, 111(12): 2089-2103.
- [40] Deng J M, Bi B L, Kang B, et al. Improving the growth performance and cholesterol metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soyabean meal-based diets using dietary cholesterol supplementation[J]. *The British Journal of Nutrition*, 2013, 110(1): 29-39.
- [41] Chen W J, Xu J Z, Wu Y D, et al. The potential role and mechanism of circRNA/miRNA axis in cholesterol synthesis [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2023, 19(9): 2879-2896.
- [42] Miller W L. Steroid hormone synthesis in mitochondria[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013, 379(1/2): 62-73.
- [43] Miller W L, Auchus R J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders[J]. *Endocrine Reviews*, 2011, 32(1): 81-151.
- [44] Xu Z X. Energy metabolism and cholesterol nutrition of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* under salinity stress[D]. Shanghai: East China Normal University, 2017. [徐志鑫. 盐度胁迫下尼罗罗非鱼的能量代谢及其胆固醇营养的研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2017.]
- [45] Strott C A, Higashi Y. Cholesterol sulfate in human physiology: What's it all about?[J]. *Journal of Lipid Research*, 2003, 44(7): 1268-1278.
- [46] Xu D K, Ma R J, Ju Y, et al. Cholesterol sulfate alleviates ulcerative colitis by promoting cholesterol biosynthesis in colonic epithelial cells[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): Article No.4428.
- [47] Bélanger M, Magistretti P J. The role of astroglia in neuroprotection[J]. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2009, 11(3): 281-295.
- [48] Prah J, Winters A, Chaudhari K, et al. Cholesterol sulfate alters astrocyte metabolism and provides protection against oxidative stress[J]. *Brain Research*, 2019, 1723: 146378.
- [49] Harteneck C. Pregnanolone sulfate: From steroid metabolite to TRP channel ligand[J]. *Molecules*, 2013, 18(10): 12012-12028.
- [50] Mellon S H. Neurosteroid regulation of central nervous system development[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2007, 116(1): 107-124.
- [51] Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, et al. Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(24): 21493-21501.
- [52] Grimm C, Kraft R, Schultz G, et al. Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine[J]. *Molecular Pharmacology*, 2005, 67(3): 798-805.
- [53] Henderson E, Weinberg M, Wright W A. Pregnanolone[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1950, 10(4): 455-474.
- [54] McCormick S D. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish[J]. *American Zoologist*, 2001, 41(4): 781-794.
- [55] Kammerer B D, Cech Jr J J, Kültz D. Rapid changes in plasma cortisol, osmolality, and respiration in response to salinity stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 157(3): 260-265.
- [56] Zhang Y T, Yang J, Geng L W, et al. Effects of salinity stress on antioxidant enzymes and serum cortisol in *Luciobarbus capito*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 56-62. [张宇婷, 杨建, 耿龙武, 等. 盐度胁迫对大鳞鲃抗氧化酶和血清皮质醇的影响[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 56-62.]
- [57] Zhu Y H, Wu J M, Leng X Q, et al. Metabolomics and gene expressions revealed the metabolic changes of lipid and amino acids and the related energetic mechanism in response to ovary development of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0235043.
- [58] Zhang X H, Wang J J, Wang C W, et al. Effects of long-term high carbonate alkalinity stress on the ovarian development in *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Water*, 2022, 14(22): 3690.

Role of steroid hormones in osmoregulation mechanism of *Leuciscus waleckii* in Dali Lake

LI Wen^{1,2}, HUANG Jing¹, ZOU Yuting^{1,2}, ZHANG Limin¹, CHANG Yumei¹

1. National and Local Joint Engineering Laboratory for Freshwater Fish Breeding; Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The Amur ide (*Leuciscus waleckii*) in Lake Dali exhibits remarkable salt-alkali resistance, thriving in environments with an alkalinity of 53.57 mmol/L and pH of 9.6. It also demonstrates reproductive migration behavior, migrating annually to freshwater rivers to spawn. During this migration, the fish must face the transition of high-permeability to low-permeability water, which involves immense energy redistribution for basic metabolism and gonadal development. Steroid hormones, which are lipid hormones synthesized from cholesterol through a series of enzymatic reactions, play a crucial role in osmoregulation, gonadal development, and energy consumption during fish reproductive migration. To explore the role of steroid hormones in the osmoregulatory pressure mechanism of *Leuciscus waleckii*, we conducted a 10 d bidirectional cross-border stress experiment involving 50 mmol/L NaHCO₃ alkalinity stress followed by freshwater recovery. We analyzed serum steroid hormone levels, gene expression related to gill tissue in different treatment groups, and examined the methylation of key genes in promoter regions. Our results showed that differences in steroid hormones were primarily associated with three pathways. In the steroid biosynthesis pathway, the cholesterol and key genes involved (*hsd17b7*, *ebp*, *dhcr24*, and *dhcr7*) significantly increased in the alkalinity stress group ($P<0.05$) and significantly decreased in the freshwater recovery group ($P<0.01$). In the primary bile acid biosynthesis pathway, 25-hydroxycholesterol and 7 α , 25-hydroxycholesterol, along with their target genes (*ch25h* and *cyp7a1*), significantly increased in the alkalinity stress group and significantly decreased in the freshwater recovery group ($P<0.01$). In the steroid hormone biosynthesis pathway, Pregnenolone, 17 α -hydroxyprogesterone, cortexolone, and cortisol significantly reduced in the alkalinity stress group ($P<0.001$) and significantly increased in the freshwater recovery group ($P<0.05$). Cholesterol, an intermediate product shared by these three pathways, also showed notable changes. Additionally, the promoter regions of the key genes involved in cholesterol synthesis and metabolism, *ebp* and *sult2b1*, exhibited low methylation levels in the alkalinity stress group and high methylation levels in the freshwater recovery group. These findings suggest that cholesterol is a crucial component of the steroid hormone-related pathways. It influences the methylation levels of key gene promoter regions involved in its synthesis and metabolism, thereby regulating the differential expression of other key genes in response to different environmental conditions. This regulation impacts the content of steroid hormones and plays a role in the osmoregulation of *Leuciscus waleckii* in varying environments. The results of this study provide a theoretical basis and scientific guidance for understanding the molecular mechanisms of fish alkali resistance, as well as for the transplantation and domestication of fish, and the cultivation of novel alkali-resistant varieties.

Key words: *Leuciscus waleckii*; steroid hormone; osmoregulation; methylation; saline alkali water

Corresponding author: CHANG Yumei. E-mail: changyumei@hrfri.ac.cn