文章编号：1674-5566(2024)05-1064-10　　DOI:10. 12024/jsou. 20240404498

水流对斑马鱼体色和肥满度的影响

丁长晨[1,2]，黄亚娟[1,2]，司玉凤[1,2]，鲍宝龙[1,2]

（1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室，上海　201306；2. 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：为了探究水流对鱼类体色的影响，比较了不同流速水流养殖下斑马鱼皮肤黑色素细胞数量和基因的表达，结果表明：相对于低流速(0. 010 m/s)，在高流速(0. 022 m/s)下养殖斑马鱼3个月后，皮肤黑色素细胞数量显著增加，尤其是鱼体尾部区域；实时荧光定量PCR(RT-qPCR)结果显示高流速组斑马鱼皮肤黑色素细胞标记基因*kita*、*mitfa*和*tyrp1a*相对表达量显著升高，黄色素细胞标记基因*csf1ra*显著降低，虹彩细胞标记基因*pnp4a*无显著变化，表明高流速水流诱导黑色素细胞而抑制黄色素细胞的形成。RT-qPCR结果显示，相比于低流速组，高流速组斑马鱼皮肤中黑色素细胞形成抑制因子基因*asip1*的相对表达量显著减少，与黑色素细胞形成相关的黑皮质素受体基因*mc1r*、阿黑皮素原基因*pomca*无显著性变化，视黄酸合成相关的视黄醛脱氢酶基因*raldh2*和*raldh3*显著下调，提示水流刺激可通过降低*asip1*的表达来诱导黑色素细胞形成；水流刺激瞬时受体通道蛋白基因*trpv4*和压电式机械敏感通道蛋白基因*piezo2*的表达上调，而*piezo1*无显著性变化。以上结果表明，水流能诱导斑马鱼黑色素细胞的形成，可能是通过皮肤机械力感受蛋白Trpv4或Piezo2介导水流刺激减少*asip1*表达的结果。Asip1除了调控黑色素细胞形成以外还调控脂肪的积累，相比于低流速组，高流速组斑马鱼肥满度也显著下降，GO富集分析显示差异表达基因主要富集到甘油三酯分解代谢、高密度脂蛋白颗粒、脂质结合等条目，差异表达基因显著富集的KEGG通路有：氨基糖和核苷酸糖的代谢、PPAR信号通路、亚油酸代谢、花生四烯酸代谢等。RT-qPCR检测与脂肪代谢相关的脂肪酸过饱和酶2基因*fads2*显著上调，瘦素基因*lep*无显著性差异，提示水流可能通过Asip1影响Fads2进而影响脂肪降解。本研究首次报道了水流对鱼类体色的影响，为理解目前越来越普遍的流水养殖对鱼类体色和肥满度的影响提供了初步的理论基础。

关键词：水流；斑马鱼；体色；肥满度；机械力感受蛋白

中图分类号：S 917　　**文献标志码：**A

高密度的鱼类养殖越来越普遍，无论是工厂化的开放流水模式和循环水模式，还是室外池塘跑道式流水养殖等[1]，相比于传统池塘养殖，流水养殖在提高养殖水体的溶氧量，减少鱼类排泄物和饲料沉积，稳定水体微生物种群等方面更具优势[2]。因此，水流影响鱼类的相关研究越来越受到研究者的重视，许多研究报道了水流在鱼类的摆尾频率[3]、游泳姿势[4]、繁殖生长[5]以及生理生化[6]等方面发挥了作用。同时，有研究发现高流速水流促进大菱鲆皮肤中先天免疫的标记物：组织蛋白酶D和溶菌酶的合成，表明水流能影响到免疫系统屏障之一的皮肤。但是皮肤作为与水流直接作用的组织，相关研究侧重于体表侧线系统对于水流的感知[7-8]，水流是否影响鱼类的体色还不清楚。此外，体色也是养殖鱼类重要特征之一，是影响人们消费的重要因素之一[9]，因此，明确水流对鱼类体色的作用具有现实意义。

为了探究水流是否影响鱼类体色的形成，本研究以模式生物斑马鱼为实验对象，比较在不同强度的水流刺激下斑马鱼色素细胞数量的差异及相关基因的表达，初步探究水流对斑马鱼体色的影响，为后续方便利用基因敲除技术开展分子机制研究奠定基础。

收稿日期：2024-04-16　　**修回日期：**2024-05-22

基金项目：国家重点研发计划(2022YFD2400401)

作者简介：丁长晨(2000—)，男，硕士研究生，研究方向为发育生物学。E-mail:dcc103423556@126.com

通信作者：鲍宝龙，E-mail:blbao@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 斑马鱼来源和规格

本研究所用的野生型斑马鱼饲养于上海海洋大学本实验室。选取40日龄的斑马鱼仔鱼进行水流实验。本研究中所有样本采集、实验流程、研究方法均严格按照《上海海洋大学实验室动物伦理规范》和上海海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 水流实验

实验在斑马鱼循环水系统中进行,设置高流速组(实验组)和低流速组(对照组)各3个平行,每个平行20尾,共120尾。通过控制出水阀门的大小设置流速大小,使用流速仪(LS300-A,1.5%,福建徕斯达)检测出水口水体流速,高流速组流速为0.022 m/s,低流速组流速为0.010 m/s。光照周期为14 h,水流处理时长为90 d。

1.3 斑马鱼各部位黑色素细胞数目统计

取处理时长90 d的斑马鱼,高流速组和低流速组随机各选取9尾,使用浓度为1.5 g/L的3-乙氧酰基苯胺甲硫酸盐(MS-222)溶液进行麻醉,置于蔡司体视镜1×视野下拍照。使用Adobe Photoshop 2020按照实际直尺和斑马鱼皮肤在同一倍数下等比例放大的原理,划定合适大小的画框,画框对应实际面积为0.02 mm^2,画框放大后,使用Image J软件进行计数[10]。使用GraphPad Prism 9.0.0软件对数据进行T-Test(unpaired)分析。

1.4 斑马鱼肥满度统计

取处理时长90 d的斑马鱼,高流速组和低流速组随机各选取9尾,使用浓度为1.5 g/L的MS-222溶液进行麻醉,电子天平(JA3003,上海舜宇恒平科学仪器有限公司)称重后使用卷尺(DL9010B,得力)测量体长。肥满度计算公式为体质量与体长的立方的比值。使用GraphPad Prism 9.0.0软件进行T-Test(unpaired)分析。

1.5 斑马鱼皮肤RNA的提取与转录组测序

取处理时长90 d的斑马鱼,每平行随机取2尾,高流速组和低流速组各6尾斑马鱼,使用1.5 g/L的MS-222溶液对其进行麻醉,取同一侧皮肤,液氮速冻后储存在−80 ℃。Trizol法提取皮肤总RNA。将3个平行样混合送至上海欧易生物医学科技有限公司,质检合格后在illumina Novaseq™ 6000平台上测序。

1.6 差异表达基因GO和KEGG通路富集分析

统计每个GO条目中所包括的差异表达基因个数,并用超几何分布算法计算每个GO条目中差异表达基因富集的显著性,利用Fisher精确检验计算生物过程Biological Process(BP)、细胞组分Cellular Component(CC)、分子功能Molecular Function(MF)中的每个Term。

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)是有关Pathway的主要公共数据库,利用KEGG数据库对差异蛋白编码基因进行Pathway分析(结合KEGG注释结果),并用超几何分布检验的方法计算每个Pathway条目中差异表达基因富集的显著性。

1.7 cDNA合成和实时荧光定量PCR

使用HiSlid™ cDNA Synthesis Kit for qPCR (with dsDNase)试剂盒对前一步得到的皮肤组织RNA反转录,具体步骤参考试剂盒说明书。

用斑马鱼β-肌动蛋白基因*β-actin*作为实时荧光定量PCR实验的内参基因[10],每个基因3个重复。采用的引物见表1,PCR反应在96孔板中进行,配置20 μL的PCR体系,其中2×qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL,模板cDNA 1 μL,上游引物0.4 μL,下游引物0.4 μL,ddH_2O 8.2 μL。具体的PCR程序:预变性95 ℃ 30 s,变性95 ℃10 s,退火并延伸60 ℃ 30 s,40个循环;95 ℃15 s。使用$2^{-\Delta\Delta C_t}$法计算相应基因的相对表达量[11],使用GraphPad Prism 9.0.0软件进行统计学T-Test (unpaired)分析。

2 结果

2.1 高流速水流诱导皮肤黑色素细胞数量增多

对高流速组和低流速组斑马鱼身体不同部位皮肤的黑色素细胞的数量进行统计,发现相比于低流速组,高流速组在身体后半段处黑色素细胞数量显著增多(图版),具体为1、2、3、4、5处显著增多,在6、7处无明显变化(图1)。

2.2 高流速水流促进皮肤黑色素细胞标记基因表达而抑制黄色素细胞标记基因表达

由于黄色素细胞和红彩细胞难以在显微镜下直接观察统计,故采用RT-qPCR检测斑马鱼皮肤中黄色素细胞和虹彩细胞的标记基因*csf1ra*和虹彩细胞的标记基因*pnp4a*的表达,来比较其受水流的影响。相比于低流速组,*csf1ra*的表达显著降低,*pnp4a*无显著性变化,黑色素细胞标记基

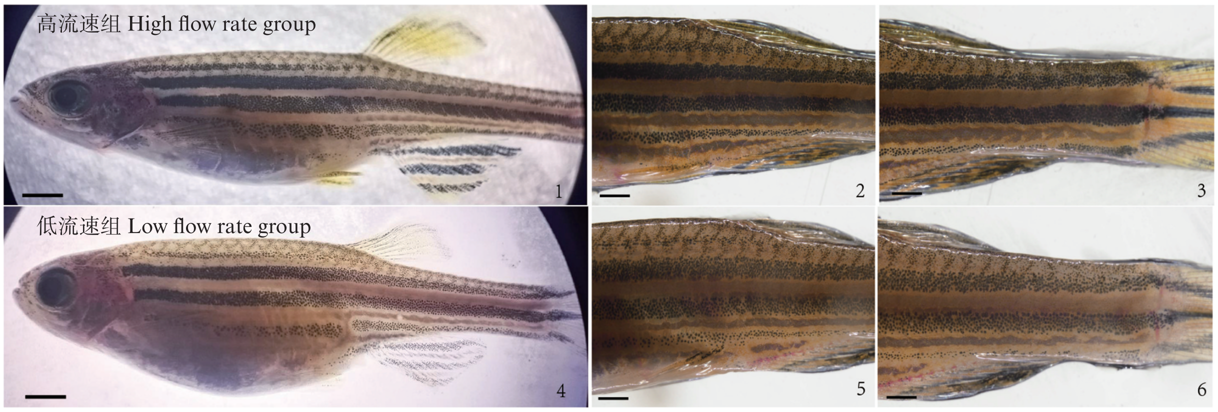
因 *mitfa*、*kita* 和 *tyrp*1 的表达量在高流速组斑马鱼皮肤中均显著上升，表明高流速水促进斑马鱼黑色素细胞的形成而抑制黄色素细胞的形成，结果符合黑色素细胞数量增多的统计结果（图 2）。

表 1 荧光实时定量PCR引物序列
Tab. 1 Primer sequence of qRT-PCR

引物 Primer	引物序列(5′- 3′) Primer sequence	退火温度 Annealing temperature/℃	长度 Length/bp
kita-F	AGTGCGTCTCAAGGTGTCAG	60	143
kita-R	GCACTTGTCCATCAATCGGC		
mitfa-F	CCTCTGAGATGATGGCGTGT	60	251
mitfa-R	TTTGCCGCCAATGAAACCAC		
*tyrp*1*a*-F	GCAGTCGACTTCAGTCACGA	60	260
*tyrp*1*a*-R	TAGTCCTCCACACTCTCGCA		
*csf*1*ra*-F	AGACTACATTTGCTGCGCTA	60	484
*csf*1*ra*-R	TTCGATCAAAACCCCGAGA		
*pnp*4*a*-F	TCAAGTGCCAGGACTCGTTC	60	413
*pnp*4*a*-R	CTTACAGATGTCCAGCGCCA		
*asip*1-F	CATGCCAATGGAGGAACAGC	60	194
*asip*1-R	GCACACAGTTCGGCGGAG		
pomca-F	GCCCCTGAACAGATAGAGCC	60	192
pomca-R	CTCGTTATTTGCCAGCTCGC		
*mc*1*r*-F	GCTTGCCAGCATCACCTCTA	60	145
*mc*1*r*-R	GTGGACATGGGCCAAGATGA		
*raldh*2-F	GAGAGGTGAAGAACGACCCG	60	150
*raldh*2-R	GGTTGTACGTGGGGAAGACC		
*raldh*3-F	TCAAGCCGCGGAAGGTTATT	60	199
*raldh*3-R	CATCGACCGGCATGGTTTTC		
*trpv*4-F	CAGTATCTTCAGTCCCACGAA	60	256
*trpv*4-R	GCTCCACATACTGTTTGCATC		
*piezo*1-F	AGGATGTTCAATCATAACTCGG	60	208
*piezo*1-R	AGTCCATCACAGCTCGAAG		
*piezo*2-F	GCGTTATTATTGTCTGCAAGCTC	60	200
*piezo*2-R	CAGGTTAGGCAATATTATCCCA		
Lep-F	CATCATCGTCAGAATCAGGG	60	199
Lep-R	ATCTCGGCGTATCTGGTCAA		
*fads*2-F	TCAGCGGACACCTCAACTTC	60	149
*fads*2-R	CGCAAATGCTCCGTACAAGG		
β-actin-F	AGGTCATCACCATTGGCAAT	60	131
β-actin-R	GATGTCGACGTCACACTTCAT		

2.3 高流速水流抑制黑色素细胞形成抑制因子 *asip*1 和视黄酸合成酶 *raldh*2/3 的基因表达

为了解高流速水流影响了哪些黑色素细胞发育的上游因子和是否通过视黄酸来介导黑色素细胞的形成，对促黑激素 α-msh 的前体蛋白阿黑皮素原基因 *pomca*、黑色素细胞形成抑制因子基因 *asip*1、黑皮质素受体基因 *mc*1*r*、视黄酸合成酶基因 *raldh*2/3 的表达进行检测，相比于低流速组，高流速组 *pomca* 基因的表达无显著性变化，*asip*1 显著降低，*mc*1*r* 无显著性变化，*raldh*2 和 *raldh*3 均显著降低（图 3）。表明高流速水流通过抑制 *asip*1 的表达来介导斑马鱼黑色素细胞形成，不通过视黄酸途径。



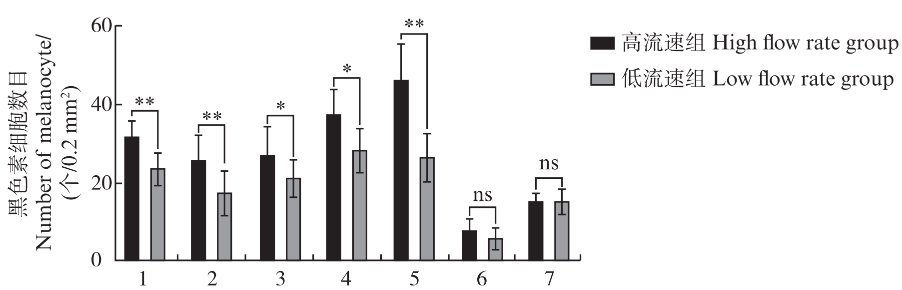
1、4表示高流速组和低流速组斑马鱼整体观；2、5表示高流速组和低流速组斑马鱼身体中部局部观；3、6表示高流速组和低流速组斑马鱼身体尾部局部观。

Number 1 and 4 represent the overall view of zebrafish in the high flow and low flow group; Number 2 and 5 represent the localized view of the middle part of the body of zebrafish in the high flow and low flow group; Number 3 and 6 represent the localized view of the tail of the body of zebrafish in the high flow and low flow group.

图版　高流速和低流速组斑马鱼整体观及身体中部和尾部局部观

Plate　The overall view and the localized view of the middle and tail of the body of zebrafish between the high flow group and low flow group

(a)



(b)

(a)黑色素细胞计数部位，1-7表示选取的具体位置；(b)黑色素细胞计数结果；ns. 无显著差异；$^*P<0.05$；$^{**}P<0.01$。

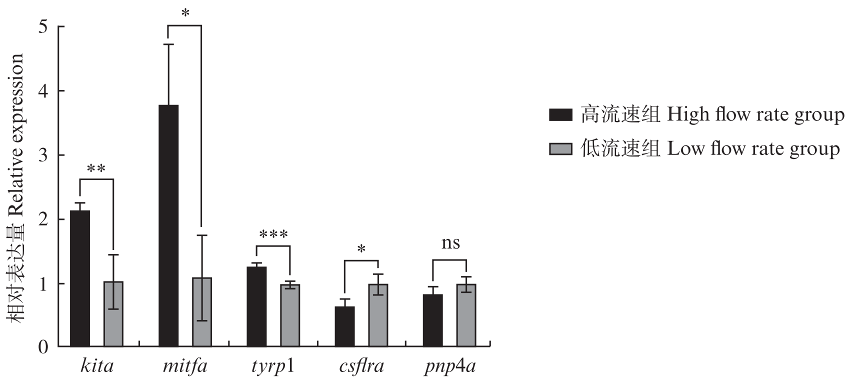
(a) Count site of melanophore, 1-7 represent the specific selected site; (b) Result of melanophore count; ns. No significant difference; $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$.

图1　高流速组和低流速组斑马鱼各部位黑色素细胞数量

Fig. 1　Number of melanophores of zebrafish in different parts of body between two different flow rate groups

2.4　高流速水流促进皮肤机械力感受蛋白基因 *trpv*4和*piezo*2的表达

为了解水流通过哪些机械力感受蛋白来影响黑色素细胞的调控，通过RT-qPCR对斑马鱼皮肤中机械力感受蛋白基因*trpv*4、*piezo*1/2的表达进行检测，结果显示，相比于低流速组，高流速组*trpv*4和*piezo*2显著上调，*piezo*1无显著变化(图4)。表明高流速水流促进了斑马鱼皮肤中*trpv*4和*piezo*2表达，皮肤可能通过*trpv*4和*piezo*2来响应高流速水流产生的机械刺激。

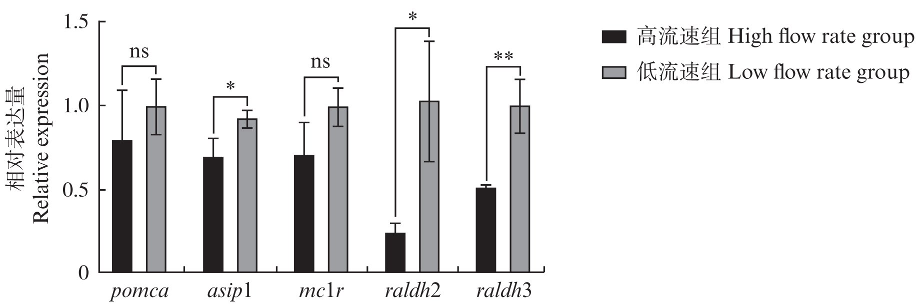


ns. 无显著差异; *P<0. 05; **P<0. 01; ***P<0. 001。

ns. No significant difference; *P<0. 05; **P<0. 01; ***P<0. 001.

图2　高流速组和低流速组斑马鱼皮肤中色素细胞标记基因的相对表达量

Fig. 2　The relative expression of marker genes for pigment cells in zebrafish skin between two different flow rate groups

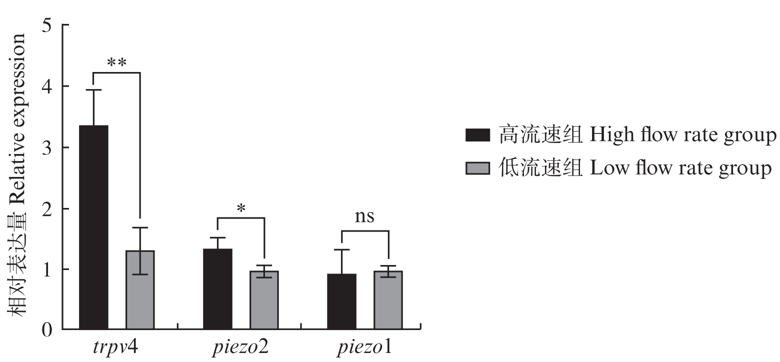


ns. 无显著差异; *P<0. 05; **P<0. 01。

ns. No significant difference; *P<0. 05; **P<0. 01.

图3　高流速组和低流速组斑马鱼皮肤中黑色素细胞发育相关基因的相对表达量

Fig. 3　Relative expression of genes related to melanophore development in zebrafish skin between two different flow rate groups



ns. 无显著差异; *P<0. 05; **P<0. 01。

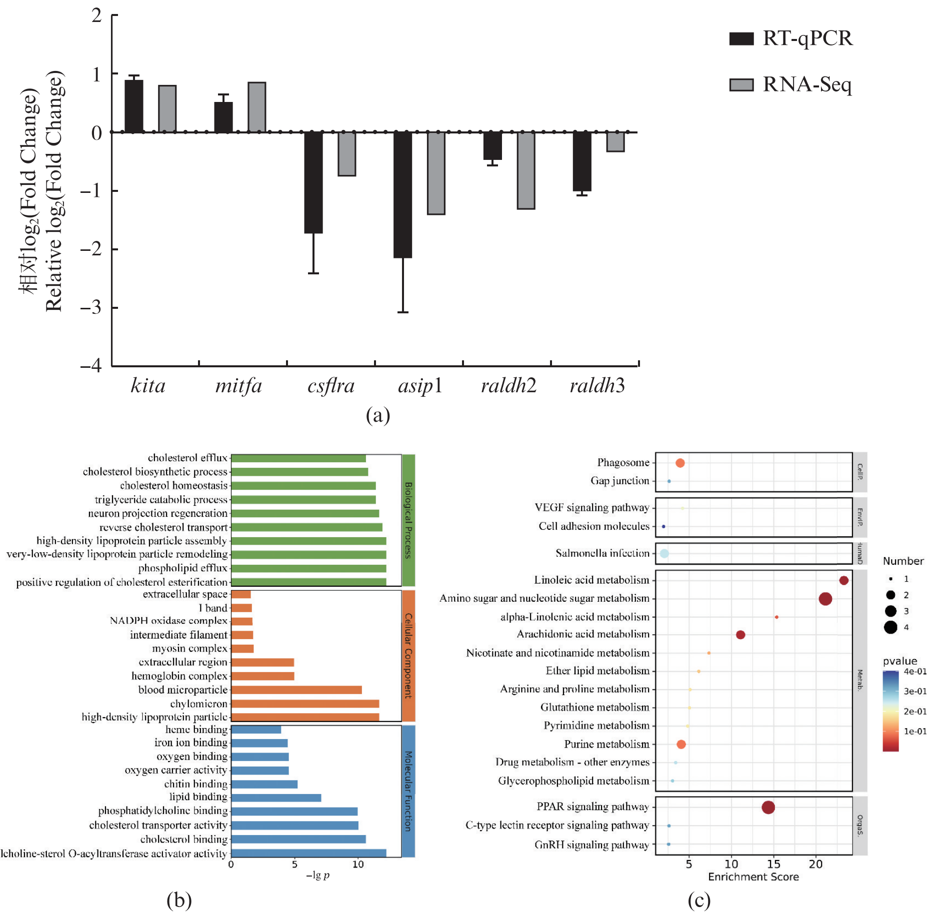
ns. No significant difference; *P<0. 05; **P<0. 01.

图4　高流速组和低流速组斑马鱼皮肤中机械力感受蛋白基因的相对表达量

Fig. 4　The relative gene expression of mechanosensitive protein in zebrafish skin between two different flow rate groups

2.5　高流速水流对皮肤转录组水平的影响

为了进一步了解水流对皮肤组织的影响，比较分析了高流速组和低流速组斑马鱼的同一侧皮肤的转录组。转录组测序结果显示共检测到21 403个基因，选择q-value＜0.05&|$\log_2$fold change|＞1的作为差异表达基因，相比于低流速组，检测到高流速组斑马鱼皮肤中有44个基因表达量显著上调，37个基因表达量显著下调。同时，将黑色素细胞形成相关基因RT-qPCR检测结果与转录组中$\log_2$(Fold Change)值进行了比较发现，相比于低流速组，在高流速组中的变化趋势一致(图5)。



(a) 黑色素细胞形成相关基因RNA-Seq与RT-qPCR验证结果；(b) GO富集分析结果；(c) KEGG通路富集分析结果。

(a) Validation results of RNA-Seq and RT-qPCR for melanocyte formation-related genes; (b) GO enrichment analysis results; (c) KEGG pathway enrichment analysis results.

图5　高流速组和低流速组斑马鱼皮肤转录组分析

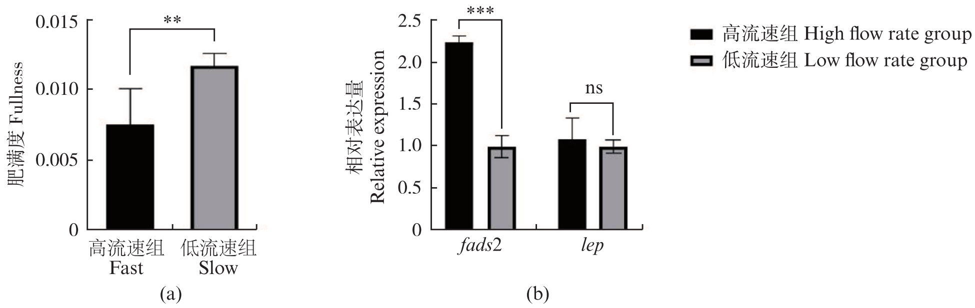
Fig. 5　Transcriptome analysis of zebrafish skin between two different flow rate groups

对差异表达基因进行GO富集分析，发现在BP水平上，差异表达基因主要富集在胆固醇酯化的正向调节(Positive regulation of cholesterol esterification)、甘油三酯分解代谢(Triglyceride catabolic process)、高密度脂蛋白颗粒组装(High-density lipoprotein particle assembly)等条目；在CC水平上，差异表达基因主要富集在高密度脂蛋白颗粒(High-density lipoprotein particle)、乳糜微滴(Chylomicron)、细胞外区域(Extracellular region)等条目；在MF水平上，差异表达基因主要富集在磷脂酰胆碱-甾醇o酰基转移酶激活剂活性(Phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity)、胆固醇结合(Cholesterol binding)、脂质结合(Lipid binding)等条目(图5)。差异表达基因的KEGG通路富集分析结果显示富集到的top20通路为氨基糖和核苷糖代谢(Amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、PPAR信号通路(PPAR signaling pathway)、亚麻酸代谢(Linoleic acid metabolism)、花生四烯酸代谢(Arachidonic acid metabolism)、α-亚麻酸代谢(alpha-Linolenic acid metabolism)、嘌呤代谢(Purine metabolism)、吞噬体(Phagosome)、烟酸和烟酰胺代谢(Nicotinate and nicotinamide metabolism)、醚脂质代谢(Ether lipid metabolism)、精氨酸和脯氨酸代谢(Arginine and proline metabolism)、谷胱甘肽代谢(Glutathione metabolism)、嘧啶代谢(Pyrimidine metabolism)、VEGF信号通路(VEGF signaling pathway)、沙门氏菌感染(Salmonella infection)、毒物代谢(Drug metabolism)、甘油磷脂代谢(Glycerophospholipid metabolism)、间隙连接(Gap junction)、C型凝集素受体信号通路(C-type lectin receptor signaling pathway)、GnRH信号通路(GnRH signaling pathway)、信号黏附分子(Cell adhesion molecules)(图5)。根据富集到的条目和通路，表明长期的高流

速水流刺激影响了皮肤脂代谢以及不饱和脂肪酸的代谢过程。

2.6 高流速水流促进斑马鱼肥满度降低和皮肤脂肪酸过饱和酶*fads*2上调

由于Asip1除了在体色调控中发挥作用，还被认为参与调节能量平衡、体质量增长和诱导肥胖，此外，转录组的GO和KEGG也富集了脂代谢相关条目和通路（图5），因此，我们进一步比较了衡量鱼类肥胖指标的肥满度指数，并对皮肤中脂肪酸代谢相关基因脂肪酸过饱和酶基因*fads*2和瘦素基因*lep*的表达进行RT-qPCR检测，结果表明：相比于低流速组，高流速组斑马鱼肥满度显著降低，高流速组斑马鱼皮肤*fads*2显著上调，瘦素基因*lep*无显著变化（图6）。



（a）斑马鱼肥满度；（b）脂肪酸过饱和酶基因*fads*2和瘦素基因*lep*的相对表达量；ns. 无显著差异；$^{**}P<0.01$；$^{***}P<0.001$。
（a）Zebrafish fullness；（b）Relative expression of genes *fads*2 and *lep*；ns. No significant difference；$^{**}P<0.01$；$^{***}P<0.001$.

图6 高流速组和低流速组斑马鱼肥满度和皮肤脂肪代谢相关基因的相对表达量

Fig. 6 Zebrafish fullness and relative expression of genes related to skin fat metabolism in zebrafish skin between two different flow rate groups

3 讨论

3.1 高流速水流诱导皮肤黑色素细胞数量增多

本研究设置了两种流速差异明显的斑马鱼养殖环境，发现高流速组斑马鱼体表的黑色素细胞数量相比低流速组明显更多，黑色素细胞标记基因*kita*、*mitfa*和*tyrp*1*a*的表达也显著上升，黄色素细胞标记基因*csf*1*ra*的表达则显著减少而虹彩细胞的标记基因则无显著性变化，说明强水流刺激能诱导斑马鱼黑色素细胞的形成而抑制黄色素细胞的形成。色素细胞的发育调控模式并非单一，有众多研究报道黑色素细胞、黄色素细胞以及虹彩细胞之间存在相互作用，所以其受水流影响的调控机制还需要进一步研究。

通过比较身体不同部位黑色素细胞数量的差异，发现高流速组和低流速组之间的黑色素细胞数目的差异体现在斑马鱼身体的后半部分，推测跟皮肤表面接受到的水流刺激强度不均一有关。高流速组的斑马鱼在鱼缸中尾部摆动要更为剧烈，身体后半段接收到的水流刺激相对更多。研究发现大黄鱼身体后半段栉鳞显著多于前半段身体[12]，栉鳞被认为是调节水流的，可以减小尾部摆动时产生的阻力。牙鲆背面有眼侧皮肤接触水流，皮肤分布的是栉鳞并且有很多黑色素细胞，而牙鲆贴底无眼侧很少接触到水流，皮肤主要是圆鳞也很少有黑色素细胞分布，这间接表明水流刺激黑色素细胞形成。

3.2 高流速水流抑制黑色素细胞发育的抑制因子基因*asip*1的表达

Pomc为阿黑皮素原，经过转录翻译后剪切产生的促黑激素α-MSH能和黑皮质素受体Mc1r结合启动下游通路，促进黑色素细胞的发育[14]；而Asip1为内源性抑制因子，可通过与α-MSH竞争性结合Mc1r，抑制黑色素细胞。本研究对调控黑色素细胞发育相关基因的表达进行检测，发现*asip*1在高流速组中显著下调，*pomca*和*mc*1*r*无显著性差异，说明高流速水流刺激抑制了*asip*1的表达，使得黑色素细胞增殖分化的阻碍减小从而促进黑色素细胞的形成。此外，视黄酸也能促进鱼类黑色素细胞的发育[15-16]，而检测到斑马鱼皮肤中的视黄酸合成酶基因为*raldh*2和*raldh*3[17]均在高流速组中下调，表明视黄酸不参与水流对斑马鱼黑色素细胞的诱导。

3.3 高流速水流刺激斑马鱼皮肤机械力感受蛋白基因的表达

在本研究中，检测到*piezo*2和*trpv*4在高流速组中上调，而*piezo*1无显著变化，表明高流速水流

促进了斑马鱼皮肤中*trpv*4和*piezo*2表达,提示皮肤可能通过*trpv*4和*piezo*2来响应水流产生的机械刺激。研究发现半滑舌鳎通过无眼侧和有眼侧头部皮肤上大量游离的神经丘中的瞬时受体电位通道蛋白Trpv4能感知周围水流的变化而发挥机械感觉的功能[18]。Piezo1/2为最新发现的机械力感受蛋白,在触摸、压力、流体剪切力等机械刺激下,可引起膜内外的离子浓度变化,在组织形成、生理活动等中发挥重要作用[19]。在过表达*Syt*4的羊驼黑色素细胞中发现Trpm1调节钙离子的流入是介导Syt4影响黑色素生成的关键[20]。此外Trpa1是Par-2诱导角质形成细胞中黑素体吞噬作用所必需的[21]。所以与Trpm1和Trpa1同为Trp通道家族的Trpv4,可能具有类似的功能。推测水流机械刺激被Piezo2或者Trpv4接收后,引发了膜内外的离子的浓度变化,间接降低了*asip*1的表达,所以后续还需要使用crisper/cas9基因编辑技术在斑马鱼中进行基因敲除验证具体是Trpv4还是Piezo2在发挥作用。

3.4 高流速水流促进斑马鱼肥满度降低和皮肤脂代谢的改变

肥满度是反映鱼类生长和肥瘦的指标,本研究发现高流速组斑马鱼肥满度显著低于低流速组,与已报道的高流速海流下养殖的越冬大黄鱼的肥满度显著降低的结果相一致[22]。强水流环境下更高频率的摆尾导致更多能量的消耗,与能量相关的糖类代谢和脂类代谢均会受到影响,因此高流速组的斑马鱼肥满度显著低于低流速组,与高流速组的斑马鱼相对更瘦小这外征相一致。

对高流速组和低流速组斑马鱼的皮肤进行转录组测序,差异表达基因的GO和KEGG富集分析结果显示差异基因富集在甘油三酯分解代谢、脂质结合、花生四烯酸代谢、PPAR信号通路等脂类代谢和脂肪酸相关条目和通路上,说明高流速水流在改变斑马鱼机体脂肪的代谢和积累的同时,还对皮肤脂肪的代谢产生了影响。有研究表明Asip1参与能量代谢、体质量增长以及肥胖诱导的调节[23],并且在小鼠中,Agouti通过Ca^{2+}依赖性机制刺激脂肪酸和甘油三酯的合成[24]。脂肪酸去饱和酶2(Fads2)是催化脂肪酸链第12位碳原子形成双键的去饱和酶类,控制着油酸、亚油酸和其他多种不饱和脂肪酸的合成和含量[25],被认为在皮脂腺细胞的脂质稳态中发挥关键作用[26]。本研究RT-qPCR结果显示*fads*2在高流速组中显著上调,说明高流速水流通过Asip1影响*fads*2的表达促进了皮肤中脂肪的降解。目前,斑马鱼的Asip1的上游调控因子还不清楚,瘦素Leptin能结合瘦素受体抑制下丘脑中与Asip1相类似的Agrp[27],并且瘦素的表达和功能都与脂肪具有强相关性[28],但是在本研究中未检测到*lep*产生显著性变化,说明水流并不是通过影响*lep*来影响*asip*1的表达,后续还需要探究*asip*1的表达由上游哪些因子调控。

综上所述,本实验首次报道水流刺激能诱导斑马鱼黑色素细胞,其可能的机制是皮肤中的机械力感受蛋白Trpv4或Piezo2在接受到水流机械刺激后下调*asip*1,促进了黑色素细胞的形成,明确其分子机制有待将来进一步的研究,同时高流速养殖也降低了斑马鱼的肥满度,为越来越普遍的流水养殖对鱼类肥满度的影响提供理论基础。

参考文献:

[1] 赵晨. 大菱鲆工厂化循环水养殖与流水养殖经济效益比较研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
ZHAO C. Turbot factory circulating water aquaculture and water aquaculture economic benefit comparison research [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.

[2] 阴晴朗, 罗永巨, 郭忠宝, 等. 池塘循环水槽养殖模式研究进展[J]. 水产学杂志, 2019, 32(5): 76-82.
YIN Q L, LUO Y J, GUO Z B, et al. Research advances on in-pond raceway system: a review novation of traditional [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 32(5): 76-82.

[3] 钱振家, 徐金铖, 张成林, 等. 不同流速对豹纹鳃棘鲈摆尾频率和血液生理的影响[J]. 南方水产科学, 2023, 19(2): 89-97.
QIAN Z J, XU J C, ZHANG C L, et al. Effect of different flow velocity on tail beat frequency and blood physiology of *Plectropomus leopardus* [J]. South China Fisheries Science, 2023, 19(2): 89-97.

[4] 李丹, 林小涛, 朱志明, 等. 不同流速下杂交鲟幼鱼游泳状态与活动代谢研究[J]. 水生生物学报, 2011, 35(4): 578-585.
LI D, LIN X T, ZHU Z M, et al. Effects of flow rate on swimming states and activity metabolism in juvenile hybrid sturgeon[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(4): 578-585.

[5] 李大鹏, 庄平, 严安生, 等. 光照、水流和养殖密度对史氏鲟稚鱼摄食、行为和生长的影响[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 54-61.
LI D P, ZHUAN P, YAN A S, et al. The influences of illumination, water current and stocking density on feeding, behavior and growth in juveniles *Acipenser*

schrenckii[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(1): 54-61.

[6] 张静, 胡长圣, 刘前, 等. 流速对卵形鲳鲹游泳行为及运动生理的影响[J]. 中国水产科学, 2024, 31(4): 381-390.
ZHANG J, HU C S, LIU Q, et al. Effect of flow velocity on swimming behavior and exercise physiology of *Trachinotus ovatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2024, 31(4): 381-390.

[7] MOGDANS J. Sensory ecology of the fish lateral-line system: morphological and physiological adaptations for the perception of hydrodynamic stimuli[J]. Journal of Fish Biology, 2019, 95(1): 53-72.

[8] 李超, 王晓杰, 宋佳坤. 鱼类的侧线机械感受系统和仿生学等应用研究[J]. 科学通报, 2017, 62(22): 2509-2519.
LI C, WANG X J, SONG J K. Structure and function of the mechanosensory lateral line system in fish and biomimetic[J]. Chinese Science Bulletin, 2017, 62(22): 2509-2519.

[9] VISSIO P G, DARIAS M J, DI YORIO M P, et al. Fish skin pigmentation in aquaculture: the influence of rearing conditions and its neuroendocrine regulation[J]. General and Comparative Endocrinology, 2021, 301: 113662.

[10] 卢培钰,冯毅栋,鲍宝龙. *aldh3a2a*敲除对斑马鱼体色的影响[J]. 上海海洋大学学报,2024, 33(2):317-326.
LU P, FENG Y D, BAO BL. Role of *aldh3a2a* on the body color formation in zebrafish[J]. Journal of Shanghai Ocean University,2024, 33(2):317-326.

[11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[12] 王晶, 高磊, 鲍宝龙. 牙鲆、大黄鱼和小黄鱼不同部位鳞片类型的比较[J]. 动物学杂志, 2017, 52(5): 850-856.
WANG J, GAO L, BAO B L. Comparative analysis on scale types from different body part in flounder, large yellow croaker and small yellow croaker[J]. Chinese Journal of Zoology, 2017, 52(5): 850-856.

[13] 彭康康, 张博, 鲍宝龙, 等. 黑化牙鲆不同部位皮肤黑色素细胞和鳞片形态的比较[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(5): 708-715.
PENG K K, ZHANG B, BAO B L, et al. Comparative analysis of skin melanophore and scales in different parts of melanized Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(5): 708-715.

[14] LEAL E, ANGOTZI A R, GREGÓRIO S F, et al. Role of the melanocortin system in zebrafish skin physiology[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 130: 591-601.

[15] SHAO C W, BAO B L, XIE Z Y, et al. The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry[J]. Nature Genetics, 2017, 49(1): 119-124.

[16] CHEN Q R, SATO K, YOKOI H, et al. Developmental regulatory system of ocular-side-specific asymmetric pigmentation in flounder: critical role of retinoic acid signaling[J]. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2020, 334(3): 156-167.

[17] 廖永冠, 李育媚, 鲍宝龙. *opn1lw2*基因在红光诱导斑马鱼皮肤色素细胞形成中的作用[J]. 动物学杂志, 2021, 56(4): 608-616.
LIAO Y G, LI Y M, BAO B L. The role of *opn1lw2* in the formation of skin pigment cells in zebrafish (*Danio rerio*) under red irradiation[J]. Chinese Journal of Zoology, 2021, 56(4): 608-616.

[18] 商晓梅. 半滑舌鳎游离神经丘形态特征及其分子水平功能解析研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
SHANG X M. Morphological characterisation and molecular level function analysis of free neuromasts in *Cynoglossus semilaevis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.

[19] JIN P, JAN L Y, JAN Y N. Mechanosensitive ion channels: structural features relevant to mechanotransduction mechanisms[J]. Annual Review of Neuroscience, 2020, 43: 207-229.

[20] JIA Q, HU S X, JIAO D X, et al. Synaptotagmin-4 promotes dendrite extension and melanogenesis in alpaca melanocytes by regulating Ca^{2+} influx via TRPM1 channels[J]. Cell Biochemistry and Function, 2020, 38(3): 275-282.

[21] WANG Y P, LI Z, WU W, et al. TRPA1 promotes melanosome phagocytosis in keratinocytes via PAR-2/CYLD axis[J]. Journal of Dermatological Science, 2022, 106(3): 181-188.

[22] LV H R, QU X Y, CHU Z J, et al. Integration of transcriptomics and metabolomics reveals the effects of sea currents on overwintering of large yellow croaker *Larimichthys crocea* in cage culture[J]. Aquaculture, 2024, 578: 740054.

[23] GODINO-GIMENO A, SÁNCHEZ E, GUILLOT R, et al. Growth performance after agouti-signaling protein 1 (*Asip1*) overexpression in transgenic zebrafish[J]. Zebrafish, 2020, 17(6): 373-381.

[24] MOUSSA N M, CLAYCOMBE K J. The yellow mouse obesity syndrome and mechanisms of agouti-induced obesity[J]. Obesity Research, 1999, 7(5): 506-514.

[25] 李金金, 张晶晶, 年洪娟. Δ12-脂肪酸去饱和酶FAD2的基本特性及其在胁迫中的功能[J]. 生命科学研究, 2013, 17(2): 174-178.
LIN J J, ZHANG J J, NIAN H J. Characteristics of △12-fatty acid desaturase FAD2 and its functions under stress[J]. Life Science Research, 2013, 17(2): 174-178.

[26] FLORI E, MASTROFRANCESCO A, OTTAVIANI M, et

al. Desaturation of sebaceous-type saturated fatty acids through the SCD1 and the FADS2 pathways impacts lipid neosynthesis and inflammatory response in sebocytes in culture [J]. Experimental Dermatology, 2023, 32 (6): 808-821.

[27] FRIEDMAN J M. Leptin and the endocrine control of energy balance[J]. Nature Metabolism, 2019, 1(8): 754-764.

[28] ZHANG Y Y, CHUA S JR. Leptin function and regulation [J]. Comprehensive Physiology, 2018, 8(1): 351-369.

Effect of water flow on body color and fullness of zebrafish

DING Changchen[1,2], HUANG Yajuan[1,2], SI Yufeng[1,2], BAO Baolong[1,2]

(1. *Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources*, *Ministry of Education*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*; 2. *National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*)

Abstract: To investigate the effects of water flow on fish body color, the number of melanophore and gene expression in zebrafish skin were investigated under water flow culture with two different flow rates 0.010 m/s (low flow rate) and 0.022 m/s (high flow rate). The results showed that compared with low flow rate, the number of skin melanophore increased significantly after 3 months of culturing zebrafish under higher flow rate, especially in the caudal region of the body of the fish, the expression levels of the skin melanophore marker genes *kita*, *mitfa* and *tyrp*1*a* were significantly increased as well. Meanwhile, the relative expression level of the xanthophore marker gene *csf*1*ra* was significantly decreased, and there was no significant change in the iridophore marker gene *pnp*4*a*, indicating that the high flow rate water induced the formation of melanophore and inhibited the formation of xanthophore. The RT-qPCR results showed that the expression of melanophore formation inhibitor gene *asip*1 was significantly decreased in the skin of zebrafish in the high-flow group compared with that in the low-flow group; the melanocortin receptor gene *mc1r* and the amelanocortinogen gene *pomca*, which are related to melanophore formation, were not significantly changed; and the retinoid dehydrogenase genes *raldh*2 and *raldh*3, which are related to retinoic acid synthesis, were significantly down-regulated; water flow stimulation upregulated the transient receptor channel protein gene *trpv*4 and the piezoelectric mechanosensitive channel protein gene *piezo*2, whereas there was no significant change in *piezo*1. The above results indicate that the high flow rate water flow induces melanophore formation in zebrafish, possibly as a result of reduced *asip*1 expression mediated by water flow stimulation through the skin mechanosensitive proteins Trpv4 and Piezo2. Asip1 regulates fat accumulation in addition to melanophore formation, and indeed zebrafish body fullness reduces significantly in the high water flow group compared with low flow rate group. GO enrichment analysiss showed differentially expressed genes was mainly enriched to entries for triglyceride catabolism, HDL particles, lipid binding, *etc* and differentially expressed genes was significantly enriched in the following KEGG pathways: aminoglycan and nucleotide sugar metabolism, PPAR signaling pathway, linoleic acid metabolism, and arachidonic acid metabolism, *etc*. RT-qPCR showed the fatty acid peroxidase 2 gene *fads*2, which is associated with lipid metabolism, was significantly up-regulated, and there was no significant difference in the leptin gene *lep*, indicating that water flow may affect fat degradation through Asip1 affecting Fads2. In conclusion, this study for the first time reported the effect of water flow on fish body color and proposed a preliminary signaling regulatory pathway, which provides a preliminary theoretical basis for understanding the effect of water flow culture on fish body color and fullness.

Key words: water flow; zebrafish; body color; body fullness; mechanosensitive channel protein