

doi: 10.7541/2023.2022.0131

翘嘴鲌 $mtf-1$ 表达特征分析及镉胁迫对其节律性表达的影响

潘亚雄^{1*} 周俊^{1*} 张宇^{1,2} 陶晋升¹ 潘佳琳¹ 唐昭阳¹ 樊轶为¹ 胡名广¹
李慧菊¹ 张建社¹ 褚武英¹

(1. 长沙学院生物与环境工程学院, 长沙 410022; 2. 盐城工学院海洋与生物工程学院, 盐城 221051)

摘要: 为了研究翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)金属调节转录因子-1(Metal-regulated transcription factor-1, $mtf-1$)序列特征、组织表达及重金属镉胁迫对其昼夜节律性表达的影响, 研究对翘嘴鲌 $mtf-1$ 基因启动子顺式调控元件和序列特征, 以及该基因在不同组织中的表达模式进行了分析, 并对水体镉胁迫下翘嘴鲌脑组织中 $mtf-1$ 基因表达昼夜节律性变化进行了研究。结果表明, 翘嘴鲌 $mtf-1$ 启动子中存在锌指蛋白ZNF136、ZNF384和ZNF143结合位点, 表明其表达受金属离子的潜在调控, 另外, 翘嘴鲌 $mtf-1$ 启动子中还发现核心生物钟基因ROR β 结合位点, 表明 $mtf-1$ 基因可能参与昼夜节律调控。基因结构域分析表明翘嘴鲌 $mtf-1$ 基因存在一个高度保守的DNA结合域及一个不保守的反式激活域。 $mtf-1$ 基因在翘嘴鲌不同组织中均有表达, 其中脑组织中表达量最高、肾脏其次。在自然条件下, 翘嘴鲌脑组织中 $mtf-1$ 基因呈现昼低夜高的表达趋势, 其基因表达峰值相位为ZT 12.65h(一日中的黄昏时期), 这与翘嘴鲌昼伏夜出, 黄昏最活跃的生活习性相符。在水体镉胁迫下, 翘嘴鲌脑组织 $mtf-1$ 基因昼夜都呈现持续低表达, 昼夜表达差异不显著, 表明水体镉胁迫能显著抑制翘嘴鲌 $mtf-1$ 基因表达, 破坏鲌鱼脑组织 $mtf-1$ 昼夜节律。

关键词: $mtf-1$; 组织表达; 镉胁迫; 昼夜节律; 翘嘴鲌

中图分类号: Q344⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)02-0316-07



金属硫蛋白(Metallothioneins, MTs)基因参与了鱼类对水体重金属胁迫下的解毒反应, 它通过与细胞内重金属结合, 降低游离重金属离子浓度从而降低重金属的毒性, 其基因表达的精准调控对鱼类抵抗重金属毒性具有重要意义。金属调节转录因子-1($mtf-1$)是金属诱导MTs基因表达调控的关键转录因子^[1], 其通过与MTs基因启动子上的金属响应元件(Metal-responsive elements, MREs)的结合, 进而调控MTs的表达。 $mtf-1$ 属于核质穿梭蛋白, 在细胞未受到外界刺激的条件下, 大部分 $mtf-1$ 存在于细胞质中, 当细胞受到重金属胁迫时, 它会积聚到细胞核中, 与基因启动子上的MREs元件结合, 通过激活MTs等靶基因的转录, 在重金属的解毒、氧化应激的保护等生理过程中发挥重要作用^[2-4]。 $mtf-1$ 基因序列高度保守, 在小鼠(*Rattus norvegicus*)、人类

(*Homo sapiens*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、斑马鱼(*Danio rerio*)和水豚(*Hydrochoerus hydrochaeris*)等多个物种中均被鉴定研究^[5], 其蛋白质序列包含一个高度保守的DNA结合域和一个由三种转录激活域组成的反式激活域, 3种转录激活域分别为酸性、脯氨酸和富含丝氨酸/苏氨酸的区域^[6]。关于 $mtf-1$ 功能的研究主要集中在哺乳动物^[7, 8], 小鼠肝脏敲低 $mtf-1$ 基因后对重金属的耐受性大大减弱, $mtf-1$ 参与了哺乳动物谷胱甘肽合成等抗氧化通路的调控^[9], $mtf-1$ 基因在鱼类的研究相对较少^[1, 10, 11]。

镉是一种生物非必需的有毒重金属, 由于生物半衰期长, 即使是较低的浓度, 也容易在生物体内蓄积, 进而导致器官损伤等毒性作用。鱼类作为长期生活在水中的低等脊椎动物, 直接与水体中的重金属接触, 对镉具有较高的敏感性^[12]。镉在鱼类中

收稿日期: 2022-04-06; 修订日期: 2022-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(32002364); 湖南省自然科学基金(2021JJ40628)资助 [Supported by National Natural Science Foundation of China (32002364); Hunan Natural Science Foundation Project (2021JJ40628)]

作者简介: 潘亚雄(1989—), 男, 讲师; 研究方向为鱼类生理代谢调控。E-mail: biopyx@163.com 周俊(2000—), 男, 本科; 研究方向为生物制药。E-mail: aabbzj1117@163.com *共同第一作者

通信作者: 褚武英, 教授; 研究方向为水生动物营养与品质调控。E-mail: chuwuying18@qq.com

主要通过鳃和胃肠道的吸收,在鳃、肝脏和肾脏等器官中持续蓄积,进而导致鱼类器官损伤,代谢紊乱等毒性效应^[13]。近年来,越来越多的研究表明镉会对生物体的昼夜节律产生毒性干扰,其通过扰乱脑组织核心生物钟基因节律性表达,进而导致生物代谢紊乱,氧化应激损伤等^[14-16]。与哺乳类一样,鱼类活动也具有稳定的昼夜节律性,我们前期在翘嘴鲌中克隆得到了与哺乳类同源的全部核心生物钟基因($CLOCKs$ 、 $BMAL1$ 、 $PERs$ 、 $CRYs$ 、 $RORs$ 和 $REV-ERBs$ 等),证实了翘嘴鲌和哺乳类一样,具有同样的由核心生物钟基因振荡调控的昼夜节律性机制^[17]。 $mtf-1$ 作为细胞对重金属响应和 MTs 基因表达的重要调节因子,其是否介导了重金属镉的节律毒性效应还并未有研究。

翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)是中国特有的淡水名贵鱼类,被广泛养殖^[18]。但翘嘴鲌对水质要求较高,对水体环境污染的耐受性差,易受水质影响而导致存活率较低^[19]。本研究鉴定得到翘嘴鲌 $mtf-1$ 的cDNA全长序列,对其组织表达模式及序列特征进行了分析,并研究了其在翘嘴鲌脑组织中的昼夜表达特征,及镉对翘嘴鲌 $mtf-1$ 昼夜节律的影响,为探究重金属镉对鱼类生物节律毒性效应提供了资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验翘嘴鲌均从长沙市望城区团山湖村翘嘴鲌养殖场购入,翘嘴鲌平均体重为200 g,将翘嘴鲌置于室内实验基地进行养殖,所有鱼每天在早上9:00和下午5:00饱食投喂饵料鱼2次,保证实验鱼的生物周期性一致。翘嘴鲌首先在LD光制(12h光照/12h黑暗)下驯养2周,在驯养结束后,进行正式实验,养殖用水为已曝气去氯的自来水。实验中所用的镉为 $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$,购自上海国药控股有限公司。通过一定比例将 $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ 和蒸馏水混合配制为原液,保存待用。

1.2 实验方法

组织表达实验鱼的养殖及样本的收集 采购的翘嘴鲌用12h光照/12h黑暗的LD光制驯养两周,待翘嘴鲌状态稳定,禁食24h后,选取规格一致、健康的翘嘴鲌6尾(雌雄鱼比例1:1)进行取样。用100 mg/L MS-222(3-氨基苯甲酸乙酯甲磺酸)对鱼进行麻醉,然后放置在冰上解剖,快速取其肠道(中肠)、肝脏、脑、肾脏、脾脏、心脏、鳃和肌肉(背肌上的白肌)8个组织,置入无RNA酶EP管中,液氮速冻后,放入 $-80^{\circ}C$ 冰箱保存备用。

镉胁迫实验鱼的养殖及样本的收集 采购

的翘嘴鲌分为正常组和胁迫组两个处理组,随机放入6个50 cm×50 cm×90 cm的室内玻璃缸中,用12h光照/12h黑暗的LD光制驯养两周,在驯养结束后,进行时期两周的镉胁迫养殖。在此期间,每天提供持续通气,保证溶氧充足。每天早上9:00和下午5:00饱食投取饵料鱼2次、0.5h后清理剩余饵料鱼和粪便、用已曝气去氯的自来水换取缸中30%的水。镉胁迫组换的水中要溶入适量的 $CdCl_2$ 原液,经稀释后加入缸中,保持水体中的Cd浓度在20 μg Cd/L。用pH测定计分别测定缸中pH,使pH维持在7.2—7.4、水温(24 ± 1) $^{\circ}C$ 。两周胁迫结束,翘嘴鲌禁食24h后开始取样。取样时间节点分别是06:30(ZT0)、09:30(ZT3)、12:30(ZT6)、15:30(ZT9)、18:30(ZT12)、21:30(ZT15)、24:30(ZT18)、次日03:00(ZT21)和次日06:30(ZT24),ZT0表示每天光照开始的时间。每个时间点随机选取3尾鱼,用100 mg/L MS-222对鱼进行麻醉,然后放置在冰上解剖,快速取脑组织,置入无RNA酶EP管中,液氮速冻后,放入 $-80^{\circ}C$ 冰箱保存备用。

总RNA的提取以及cDNA的合成 冷冻的组织样品放入已加研磨珠和1 mL RNAiso Plus的无酶EP管中,使用高速匀浆仪匀浆。后续步骤参照TaKaRa的RNAiso Plus说明书进行。为验证总RNA浓度和纯度,采用超微量核酸蛋白分析仪对其进行测定。总RNA的完整性通过1%的琼脂糖凝胶电泳检测,当28s与18s条带亮度为2:1且条带清晰可见时,表明提取的RNA具有较高的完整性。取1 μg 的总RNA采用TaKaRa公司的PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒进行逆转录。合成的单链cDNA收集保存至 $-80^{\circ}C$ 供后续分析。

引物合成及序列分析 采用Primer 5.0软件设计qPCR引物,并送擎科生物有限公司合成(表1)。采用MegaAlign v7.1.0软件对翘嘴鲌 $mtf-1$ 与其他物种的同源性进行分析。使用bioedit v7.2.5默认设置的ClustalW程序进行多序列比对,再通过GeneDoc

表1 定量引物

Tab. 1 Quantitative primers

引物名称 Primers	引物序列 Forward primer sequences (5'—3')	用途 Application
Sc- $mtf-1$	CATCCTCTGGTCGGGTGTA CCATCAGGGTCAGTCATAAA	RT-qPCR
Sc- $mtf-1$	TTAGCAGCCAGTACAGTTTG GACAGTAGCGGTGACAGAG	RT-PCR
Sc- $rpl-13$	CACAAGAAGGAGAAGGCTCG GGT	内参引物
Sc- β -actin	TTTGGCTCTCTTGGCACGGAT CCACAGCCGAGAGGGAAAT CCATCTCCTGCTCGAAGTC	内参引物

v6中文版进行优化编辑,得到序列比对结果。使用 JASPER 2022(<https://jaspar.genereg.net>)转录因子预测数据库对翘嘴鲌 *mtf-1* 基因转录起始位点上游 2 kb 区域进行转录因子结合位点预测。

实时荧光定量 PCR 通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测基因表达量。在 RT-qPCR 分析中,每个样品检测 3 个技术重复。RT-qPCR 的反应总体积一共为 25 μ L,反应成分为 SYBR Premix Ex TaqTM II 12.5 μ L, cDNA 1 μ L, 上下游引物各为 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。qPCR 条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s; 58 $^{\circ}$ C 退火、延伸 30 s; 39 个循环; 溶解温度在 65—95 $^{\circ}$ C。组织表达实验以 *rpl-13* 为内参, 节律分析实验以 β -actin 为内参。

1.3 数据处理及分析

所有数据以 mean $\pm$ SE 表示。荧光定量 PCR 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达量。采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,利用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Tukey's multiple comparisons test 比较不同组织之间的差异, $P < 0.05$ 水平下差异显著。翘嘴鲌脑组织 *mtf-1* 基因的昼夜节律通过 SPSS 20.0 独立样本 *t* 检验进行显著性分析后,采用 matlab 7.0 通过函数方程式 $f(t) = M + A \cos(t\pi/12 - \varphi)$ 对定量数据进行余弦拟合。方程中 $f(t)$ 给定时间内基因表达水平; M 为平均值; A 为振荡振幅; φ 为峰值相位,即最高振幅所在时间点换算出的角度。当不同时间点基因表达量单因素方差分析显著性差异 $P < 0.05$ 和余弦拟合 $P < 0.3$ 时,则视该基因具有昼夜节律性^[20, 21]。

2 结果

2.1 *mtf-1* 基因氨基酸序列比对及同源性分析

翘嘴鲌 *mtf-1* cDNA 全长为 2758 bp, 由 816 个氨基酸组成。氨基酸比对结果表明,翘嘴鲌 *mtf-1* 具有一个典型的 DNA 结合域和一个反式激活域(包括:

酸性、脯氨酸和丝氨酸/苏氨酸丰富区域),以及核定位信号(NLS)和核输出信号(NES) (图 1), 其中 DNA 结合域高度保守,反式激活域区域高度可变。*mtf-1* 氨基酸序列同源性分析表明,翘嘴鲌 *mtf-1* 与其他物种具有较高的序列同源性,其中与斑马鱼 *mtf-1* 基因同源性为 77.1%,与人类 *mtf-1* 基因同源性为 56.8%,表明在进化中不同物种 *mtf-1* 趋向保守。

2.2 *mtf-1* 上游转录因子结合位点预测

对翘嘴鲌 *mtf-1* 基因转录起始位点上游 2 kb 序列进行转录因子结合位点预测分析,鉴定得到多个重要转录因子结合位点(图 2),如核心时钟基因类视黄醇相关孤儿受体 β (ROR β)、MAF 蛋白家族中的 MAFF 和 MAFG、锌指转录因子 Klf4 以及多种锌指蛋白结合位点等,但翘嘴鲌 *mtf-1* 基因启动子区域并未找到金属响应元件(MRE)。

2.3 *mtf-1* 基因的组织表达

为了研究翘嘴鲌 *mtf-1* 基因在不同组织中的表达水平,对 8 个不同组织(心、肝、脾、肾、鳃、肠、脑和白肌)的 cDNA 进行半定量 PCR(RT-PCR)及实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测(图 3),翘嘴鲌 *mtf-1* 在所检测的组织中均有表达,其在脑组织中表达量最高,其次是肾脏以及心脏组织,在肠道、鳃、肌肉和肝脏中低表达,实时荧光定量 PCR 分析和半定量 PCR 两种不同检测方法,检测结果相似。

2.4 *mtf-1* 基因在脑的昼夜节律表达分析

采用实时荧光定量对翘嘴鲌脑组织中 *mtf-1* 基因 24h 昼夜节律表达进行分析,并使用 matlab 分析其昼夜节律性,结果表明 *mtf-1* 基因在正常组的翘嘴鲌脑中表现出昼低夜高的表达趋势,其表达峰值对应的时间点为 ZT=12.65(黄昏时期;表 2),镉胁迫后, *mtf-1* 基因呈现持续低表达,昼夜表达差异不显著,且在多个时间点表达量均低于对照组(图 4),表明重金镉抑制了翘嘴鲌脑组织 *mtf-1* 基因表达,并导致

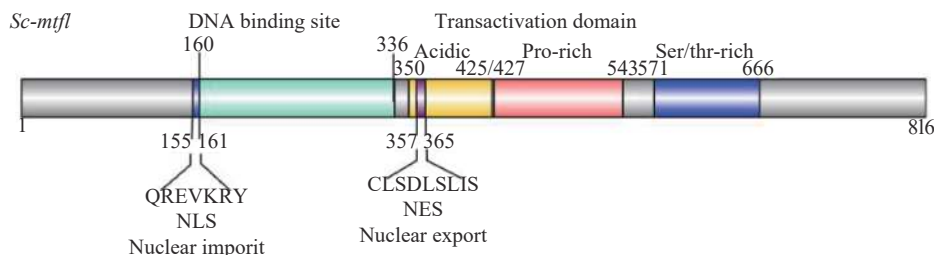


图 1 翘嘴鲌 *mtf1* 结构域

Fig. 1 Function domain of *mtf1* of *Siniperca chuatsi*

鳊鱼 *mtf1* 基因结构域参考斑马鱼基因结构域预测,包括 DNA 结合域、反式激活域、核定位信号(NLS)和核输出信号(NES)^[22]

The functional domains of *Sc-mtf1* were predicted according to *mtf1* of zebrafish, including DNA binding domain, transactivation domain, nuclear localization signal (NLS) and nuclear export signal (NES)^[22]

翘嘴鲌 *mtf-1* 表达由昼低夜高变为昼夜持续低表达。

3 讨论

转录因子 *mtf-1* 协调 *MTs* 基因的表达, 对于降低重金属对机体的毒性作用有重要意义。翘嘴鲌 *mtf-*

1 由 816 个氨基酸组成, 只有 1 个 *mtf-1* 亚型, 与绝大多数哺乳类和鱼类只有 1 个 *mtf-1* 亚型一致, 但在大西洋鲑和鲤中发现 2 个以上 *mtf-1* 亚型, 这可能是由于鲤科鱼类和鲑科鱼类特有的全基因组倍增所导致^[23,24]。翘嘴鲌 *mtf-1* 序列包含 1 个 DNA 结合域和 3 个不同的

```

TATCTTTATA GAATATTTGC AAAAGGTAAT GCAGTGAATT CCATACATAT TTTTGTGTGT -1940
TTTGACATTG TATCCTAGTA CACTGGGTTT GAAATGAAAC AATGATTGAG GTCACAGTGC -1880
TGACTTTCAA CTTGAAGGCT ACATGTGTAC ATTGCTACA CTGTTCAATT RORB AATGCTGAAA -1820
GTCAGCAATT DMRTC2 TAACCTCATA GTCATTGTTT AATTTGAGAT ACAATATTCT GAAATACTGA -1760
GGCAATGCAA MAFF AAAAAATGTA TTTCTGTCTA ATCTGTCTGT CTGATGGACA ATTTGAATGA -1700
ATCCTTGGAT GCAATGATTG TCATTTTGCA CCTACTACAT TTCAAAACAT GCAGATTCTG -1640
CTCAACAATT GTCCTTGACT CTGTATTGAC TTGCAGCGGG CAGTAACCAC TCAGTAGCAG -1580
AGGCCTTGCT TCTCTCCTA GATGCCCTCC CAGAGCCTGT GGTTCCTTC TCCTTTATC -1520
AACAGTGCCT TGAAAGCTGC TCAAATGCCA GTCAGTGTGA GAAAGTGAGT GAGACAGGCC -1460
ACTGTTAATC GCTGTTAATT ACCATTAATC TATTACAAAG ATGTGTTAAA ATTCTAAAAG -1400
TTAACCTCTG GCTTTTTTGA TATAATGTTA ATTTCTTTTG TCTCTAGGTT ATTTCCATGC -1340
TACCTCAGTG CCATCAAAAT GTGTTCAACT ATTTAGCTGC CTTTCTCCGC GAACTGTTGA -1280
AGAATTCTGC TAGCAACCGA TTAGATGTCA ACATCTTGGG TAAGAAAAGG AAGCAGGTTG -1220
CACTTCAGTC TCTTTCATTT VENTX GTGAATGTGT TATTATTAGG TTTTGCTTTG TGCTTTAGTC -1160
AGCATGTGTT AAGTGAAGAG AAATACGAAT AAAGCAGTGG GAAGTGAAAA TGAATGAATG -1100
AAAAATCCTGT TTTATCTGT TATATTTATG ACTCGAGGAC TGTTTGCACT TACTTTCTTT PRDM1 -1040
TCAATACTCT AAGGGAAGGG ACTATAAGGG AATTGTAAGA ACGTGTAAT ATGATAATTA FOXA1 -980
TTTAAATCC KLf4 TTTATTTTTT ACATTGAATT TTTTCTCAT CTTCTGTCAC ATTCGTTGAA -920
ACATGAAAAA AAATTACTCT GCTAATAAAG ATAGATAATA AACATTACAA CTAAGAAAAG -860
GAATCTGTTA TACTATGCAA TATGAATAAT TTATTTCTT TCTGCATAGC CACCATTITT -800
GCCTCCTTGC TCCTGAAATC ACCCATGAAG CAGGATCTTG CAGAAAAGCG GAAGACTCAG POU4F1 -740
GAGTTCTTTC AGAACTTCTT GACCCAAGGC TCCTCCTAGA TGGAGGCCTT GTCCTTCATG SPIC -680
CTGAAGTTGA AACTAAAAA ATATACAGTC CAGTATTTGA AATAAACTGT AATGATTCTT -620
TATATTTCTA GATGGATCTT TGTATAGATA TATAGTATAA TTAGTGTGAG ATGAAGAGAA -560
AAGTGACAGC ZNF136 TCTTATCTGA TATTAGTTG TTTCAAAGCA ATGTTTGTGA TCTGTTTATG -500
CACAAAGTTT ATTGTATATT GTTGAGCGTC TGTAGAGACC TAACAATTTT TAATGTCCTGT -440
ATATTTTATT TAATAAAAAA TAATTGTAT TTTAGTGTG CTGATTTCAG CAGCATATTG SOX8 -380
ATTTTATATA ZNF384 TAAACTATT GGAAACAAGG TGTTTGTAC TGGTGATTTT TTCAAATAAA -320
ATTTTATCT GAGTCCATGT TGCCAATCAC AAGCAAATAA ATTAACACTA ATTTGTTTAT -260
AGTGCGTGTG TGCACAAGAG AATATCTTTA CATACTTCA GCTTATTTAA TCATATCTAC -200
AACATAAAAA GTCAAAAAGT TGCATCTTTA GAAAGAATAA GGTGTGATGT TTTAATTTAG -140
CATTAGGAAT Nr2e1 TATATTAAAT TTCCATAAT TCATCACGAA TGGCTGTAAG TCTGTGACGT -80
TGTATGGTAT CCTAGGGAGG GGATAGAAAG AAAGTGCTAA ACATCCAAAG CATAGGAATA ZNF143 -20
AGGCTTAAAT ATTAACACAG GGGAGGGGAT AGAAAGAAAG TGCTAAACAT CCAAAGCATA +40
TSS

```

图 2 翘嘴鲌 *mtf-1* 基因 5' 上游 2 kb 区域预测的转录因子结合位点的示意图。

Fig. 2 Schematic representation of predicted putative transcription factor binding motifs in the 2 kb region upstream of the 5'-upstream of the *Siniperca chuatsi mtf-1* gene.

用下划线突出显示的序列表示预测的转录因子结合位点, TSS 指转录起始位点 Sequences highlighted with underlining show putative transcription factor binding sites, TSS refer to transcription start site

激活域(富含酸性氨基酸的区域、接着是富含脯氨酸的区域以及富含丝氨酸/苏氨酸的区域),此外还有核定位信号(NLS)和核输出信号(NES),与哺乳类 $mtf-1$ 基因功能域结构高度一致。序列同源性分析发现翘嘴鲌 $mtf-1$ 氨基酸序列与斑马鱼 $mtf-1$ 基因同源性为77.1%,与人类 $mtf-1$ 基因同源性为56.8%,虽然翘嘴鲌 $mtf-1$ 序列与哺乳动物 $mtf-1$ 序列保守性不高,但其DNA结合区域却与哺乳类 $mtf-1$ 基因DNA结合域高度相似,说明翘嘴鲌 $mtf-1$ 基因可能与哺乳类 $mtf-1$ 基因调控相似的靶基因表达。

组织表达分析表明翘嘴鲌 $mtf-1$ 在所检测的各个组织均有表达,其中在脑、肾脏及心脏中具有较高表达。鲤中的研究也发现 $mtf-1$ 基因在脑组织中最高表达^[12],与本研究结论相似。研究表明 $mtf-1$ 对

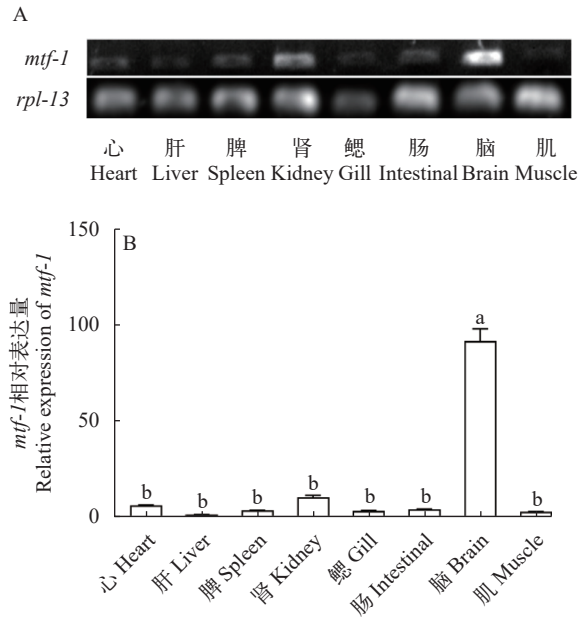


图3 $mtf-1$ 在翘嘴鲌不同组织的表达水平

Fig. 3 Expression levels of $mtf-1$ in different tissues of *Siniperca chuatsi*

A. $mtf-1$ 半定量胶图; B. 翘嘴鲌 $mtf-1$ 不同组织表达水平; 所得结果均以平均值±标准误(means±SE)表示; 字母表示显著性水平; $P<0.05$ 表示显著差异

A. semi-quantitative gel map of $mtf-1$; B. expression levels of $mtf-1$ in different tissues; the obtained results are expressed as mean±standard error (means±SEM); letters indicate the significance level; $P<0.05$ indicates a significant difference

表2 翘嘴鲌脑 $mtf-1$ 基因的节律性参数

Tab. 2 Rhythmical parameters of $mtf-1$ gene in brain of *Siniperca chuatsi*

分组 Team	振幅 Amplitude	中值 Mesor	峰值相位 Acrophase	峰值对 应区时	P value	P
正常投喂 Control	0.11	2.91	3.31	ZT12.65	0.97	<0.05
镉胁迫处理 Cd exposure	0.32	2.65	0.97	ZT3.71	0.12	<0.05

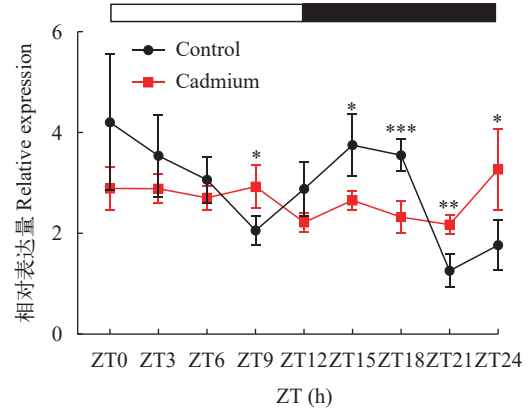


图4 镉胁迫对翘嘴鲌脑组织 $mtf-1$ 基因的节律表达

Fig. 4 The effect of cadmium on rhythmic expression of $mtf-1$ gene in the brain of *Siniperca chuatsi*

白色条带为光照阶段, 黑色条带为黑暗阶段; *表示正常组与胁迫组不同时间点组织表达的显著差异($P<0.05$); 图中数据均为平均值±标准误差($n=3$)

The white band is the light stage, and the black band is the dark stage; * indicates the significant difference in tissue expression between the normal group and the Cd stress group at different time points ($P<0.05$). The data in the figure are the mean±standard error ($n=3$)

中枢神经系统组织的发育是不可缺少的^[25], 此外, 小鼠中的研究发现 $mtf-1$ 还对小鼠胚胎肝脏的正常发育和功能尤为重要^[26, 27], 表明 $mtf-1$ 在机体发育过程中发挥着重要的作用。我们对翘嘴鲌 $mtf-1$ 的5'上游区域转录因子结合位点进行预测, 在翘嘴鲌 $mtf-1$ 启动子上鉴定到多个转录因子靶向位点, 包括锌指蛋白ZNF136、ZNF384、ZNF143、ROR β 、MAFF、MAFG和SPIC等。类视黄醇相关孤儿受体 β (ROR β)核心生物钟基因, 在生物的昼夜节律维持中发挥着重要的作用^[28]。锌指蛋白(ZNFs)是蛋白质中含量最丰富的一类, 它涉及转录调控、DNA修复、细胞迁移等众多过程^[29]。研究表明, 在黄颡鱼和鮑等物种 $mtf-1$ 启动子上存在MRE位点^[1, 30], 表明 $mtf-1$ 存在自调节, 但在翘嘴鲌启动子上并没有发现MRE位点, 说明 $mtf-1$ 自调节在鱼类中并不是普遍存在。

昼夜节律支配着大多数物种的休息/活动周期, 并影响生物体代谢水平与周期变化^[31]。大量研究表明, 重金属镉通过诱导氧化应激进而导致器官损伤, 代谢紊乱等毒性效应^[32, 33]。近期, 越来越多的研究也表明包括镉在内的重金属具有很强的内分泌毒性效应, 会通过影响脑垂体褪黑素等激素的分泌, 进而导致生物昼夜节律发生紊乱^[34, 35]。鱼类中的研究表明脑组织是水体重金属镉的重要毒性靶器官^[36], 但关于重金属镉对鱼类昼夜节律影响的相关研究还较少。本研究发现水体镉胁迫导致翘嘴鲌脑组织 $mtf-1$ 基因昼夜节律发生紊乱, 正常组 $mtf-$

I 基因在翘嘴鲌脑组织中呈现昼低夜高的表达趋势, 峰值对应区时 ZT 12.65h, 在镉胁迫下, *mtf-1* 基因相比正常组持续低表达, 基因表达峰值提前至 ZT 3.71h, 同时增幅减弱, 昼夜表达差异不显著。研究发现, 物质代谢和细胞稳态等都受生物节律调控, 如肝脏中发现 100 多个代谢相关的基因呈现昼夜节律性变化, 扰乱生物节律则会导致代谢紊乱, 细胞损伤^[37, 38]。*mtf-1* 作为重要的重金属解毒反应调控基因, 其脑组织基因表达昼夜节律紊乱将对镉毒性效应具有较大的促进作用。本研究也表明水体镉胁迫对鱼类脑组织具有昼夜节律毒性效应。

参考文献:

- [1] Chen G H, Lv W, Xu Y H, *et al.* Functional analysis of *MTF-1* and *MT* promoters and their transcriptional response to zinc (Zn) and copper (Cu) in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Chemosphere*, 2020(246): 125792.
- [2] Chen S W, Wu K, Lv W H, *et al.* Functional analysis of two zinc (Zn) transporters (*ZIP3* and *ZIP8*) promoters and their distinct response to *MTF1* and *RREB1* in the regulation of Zn metabolism [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**(17): 6135.
- [3] Jackson A C, Liu J, Vallanat B, *et al.* Identification of novel activators of the metal responsive transcription factor (*MTF-1*) using a gene expression biomarker in a microarray compendium [J]. *Metallomics*, 2020, **12**(9): 1400-1415.
- [4] Talukder M, Bi S S, Jin H T, *et al.* Cadmium induced cerebral toxicity via modulating *MTF1*-*MTs* regulatory axis [J]. *Environmental Pollution*, 2021(285): 117083.
- [5] Günther V, Lindert U, Schaffner W. The taste of heavy metals: Gene regulation by *MTF-1* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*, 2012, **1823**(9): 1416-1425.
- [6] Radtke F, Georgiev O, Müller H P, *et al.* Functional domains of the heavy metal-responsive transcription regulator *MTF-1* [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**(12): 2277-2286.
- [7] Li Y, Kimura T, Laity J H, *et al.* The zinc-sensing mechanism of mouse *MTF-1* involves linker peptides between the zinc fingers [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, **26**(15): 5580-5587.
- [8] Radtke F, Heuchel R, Georgiev O, *et al.* Cloned transcription factor *MTF-1* activates the mouse metallothionein I promoter [J]. *The EMBO Journal*, 1993, **12**(4): 1355-1362.
- [9] Wimmer U, Wang Y, Georgiev O, *et al.* Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: *MTF-1*/metallothioneins and glutathione [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**(18): 5715-5727.
- [10] Chen W Y, John J A C, Lin C H, *et al.* Expression pattern of metallothionein, *MTF-1* nuclear translocation, and its dna-binding activity in zebrafish (*Danio rerio*) induced by zinc and cadmium [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007, **26**(1): 110-117.
- [11] Ferencz Á, Hermesz E. Identification and characterization of two *mtf-1* genes in common carp [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, **148**(3): 238-243.
- [12] Pan Y X, Luo Z, Zhuo M Q, *et al.* Oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated Cd-induced hepatic lipid accumulation in zebrafish *Danio rerio* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2018(199): 12-20.
- [13] Kim Y, Park H R, Yeo W J, *et al.* The correlation between bioaccumulation and pattern of stress-related genes expression of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) by cadmium exposure [J]. *Ocean Science Journal*, 2017, **52**(2): 231-242.
- [14] Jiménez-Ortega V, Cardinali D P, Fernández-Mateos M P, *et al.* Effect of cadmium on 24-hour pattern in expression of redox enzyme and clock genes in rat medial basal hypothalamus [J]. *Biometals*, 2010, **23**(2): 327-337.
- [15] Jiménez Ortega V, Cano-Barquilla P, Scacchi P A, *et al.* Cadmium-induced disruption in 24-h expression of clock and redox enzyme genes in rat medial basal hypothalamus: prevention by melatonin [J]. *Frontiers in Neurology*, 2011(2): 13.
- [16] Jiménez-Ortega V, Cano Barquilla P, Fernández-Mateos P, *et al.* Cadmium as an endocrine disruptor: correlation with anterior pituitary redox and circadian clock mechanisms and prevention by melatonin [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, **53**(12): 2287-2297.
- [17] Wu P, Li Y L, Cheng J, *et al.* Daily rhythmicity of clock gene transcript levels in fast and slow muscle fibers from Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J]. *BMC Genomics*, 2016, **17**(1): 1008.
- [18] Zhang R Q, Hao Y Y, Song Y D, *et al.* Predation behavior of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) regulated by visual and lateral line sensory [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, **27**(10): 1136-1144. [张瑞祺, 郝月月, 宋银都, 等. 鳊视觉和侧线感觉调控捕食行为的动态观察 [J]. 中国水产科学, 2020, **27**(10): 1136-1144.]
- [19] Hongyan W, Jinliang Z, Shoujie T, *et al.* Pollution status and risk analysis on heavy metals in muscles of *Siniperca chuatsi* from East China [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2020(2): 268-278.
- [20] Liu J J, Chu W Y, Zhu X, *et al.* Embryonic development characteristics and rhythmic expression analysis of *RORα* gene under starvation in *Siniperca chuatsi* [J]. *Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2021, **39**(5): 190-197. [刘晶晶, 褚武英, 朱鑫, 等. 鳊 *RORα* 基因的胚胎发育特征及饥饿对其节律性表达影响分析 [J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2021, **39**(5): 190-197.]
- [21] Chen Y H, Li H H, Wang L X, *et al.* Effects of GSK4112 on circadian rhythmicity expression of *Nr1d1* and *Ulk1b* in liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, **40**(2): 584-590. [陈圆华, 李虹辉, 王利香, 等. GSK4112 对尼罗罗非鱼肝脏 *Nr1d1* 和 *Ulk1b* 基因昼夜节律性表达的影响 [J]. 基因组学与应用生物学, 2021, **40**(2): 584-590.]
- [22] Chen W Y, John J A C, Lin C H, *et al.* Molecular cloning and developmental expression of zinc finger transcription factor *MTF-1* gene in zebrafish *Danio rerio* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **291**(4): 798-805.
- [23] Christensen K A, Davidson W S. Autopolyploidy genome duplication preserves other ancient genome duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(2): e0173053.

- [24] Li J T, Hou G Y, Kong X F, *et al.* The fate of recent duplicated genes following a fourth-round whole genome duplication in a tetraploid fish, common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Scientific Reports*, 2015, **5**(1): 1-9.
- [25] Lichtlen P, Georgiev O, Schaffner W, *et al.* The heavy metal-responsive transcription factor-1 (*MTF-1*) is not required for neural differentiation [J]. *Biological chemistry*, 1999, **380**(6): 711-715.
- [26] Günes Ç, Heuchel R, Georgiev O, *et al.* Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator *MTF-1* [J]. *The EMBO Journal*, 1998, **17**(10): 2846-2854.
- [27] Lichtlen P, Schaffner W. Putting its fingers on stressful situations: the heavy metal-regulatory transcription factor *MTF-1* [J]. *Bioessays*, 2001, **23**(11): 1010-1017.
- [28] André E, Conquet F, Steinmayr M, *et al.* Disruption of retinoid-related orphan receptor β changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice [J]. *The EMBO Journal*, 1998, **17**(14): 3867-3877.
- [29] Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, *et al.* Zinc-finger proteins in health and disease [J]. *Cell Death Discovery*, 2017, **3**(1): 1-12.
- [30] Lee S Y, Nam Y K. Molecular cloning of metal-responsive transcription factor-1 (*MTF-1*) and transcriptional responses to metal and heat stresses in Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* [J]. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 2017, **20**(1): 1-13.
- [31] Lazado C C, Skov P V, Pedersen P B. Innate immune defenses exhibit circadian rhythmicity and differential temporal sensitivity to a bacterial endotoxin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(55): 613-622.
- [32] Cuypers A, Plusquin M, Remans T, *et al.* Cadmium stress: an oxidative challenge [J]. *Biometals*, 2010, **23**(5): 927-940.
- [33] Patra R C, Rautray A K, Swarup D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration [J]. *Veterinary Medicine International*, 2011(2011): 457327.
- [34] Lafuente A. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013(59): 395-404.
- [35] Xiao B, Chen T M, Zhong Y. Possible molecular mechanism underlying cadmium-induced circadian rhythms disruption in zebrafish [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, **481**(3-4): 201-205.
- [36] Zheng J L, Yuan S S, Wu C W, *et al.* Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016(180): 36-44.
- [37] Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, *et al.* Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(42): 41519-41527.
- [38] Reinke H, Asher G. Circadian clock control of liver metabolic functions [J]. *Gastroenterology*, 2016, **150**(3): 574-580.

CHARACTERISTICS OF *MTF-1* AND CADMIUM STRESS ON RHYTHMIC EXPRESSION IN CHINESE PERCH *SINIPERCA CHUATSI*

PAN Ya-Xiong¹, ZHOU Jun¹, ZHANG Yu^{1,2}, TAO Jin-Sheng¹, PAN Jia-Lin¹, TANG Zhao-Yang¹, FAN Yi-Wei¹, HU Ming-Guang¹, LI Hui-Ju¹, ZHANG Jian-She¹ and CHU Wu-Ying¹

(1. School of Biological and Environmental Engineering, Changsha University, Changsha 410022, China; 2. School of Marine and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 221051, China)

Abstract: To study the characteristics of *mtf-1* gene of *Siniperca chuatsi* and the effects of cadmium stress on the circadian rhythm of *mtf-1* gene in brain, we analyzed cis-regulatory elements of *mtf-1* gene promoter, sequence characteristics and tissues expression patterns of *mtf-1* gene, and explored the circadian rhythm changes of *mtf-1* gene expression in brain of *Siniperca chuatsi* under cadmium stress. The results showed that there were binding sites of zinc finger proteins including *ZNF136*, *ZNF384* and *ZNF143* in the *mtf-1* promoter of *S. chuatsi*, indicating that their expression is potentially regulated by metal ions. In addition, *ROR β* binding sites of the core clock gene were also found in the *mtf-1* promoter of *S. chuatsi*, indicating that the *mtf-1* gene is potentially involved in circadian rhythm regulation. The analysis of function domain indicated that *mtf-1* gene has a highly conserved DNA binding domain and a non-conserved trans-activation domain. *mtf-1* gene is expressed in different tissues of *S. chuatsi*, among which the highest expression level is found in brain tissue, followed by kidney. Under natural conditions, *mtf-1* gene showed a trend of high expression at night and low expression in the brain at day. The expression peak phase occurs at ZT 12.65h (nightfall), which is consistent with its life habits. Under cadmium stress, the *mtf-1* gene in the brain of *S. chuatsi* presented continuous low expression level, and with no significant difference between day and night, indicating that the *mtf-1* gene expression in the brain of *S. chuatsi* could be significantly inhibited by cadmium, and the circadian rhythm of *mtf-1* in the brain tissue of *S. chuatsi* is damaged.

Key words: *mtf-1*; Tissue expression; Cadmium stress; Circadian rhythm; *Siniperca chuatsi*