

doi: 10.7541/2023.2023.0051

## 鳊*Shh*基因分子特征和时空表达规律及其对肌肉生长的调控

孟杨杨<sup>1,2</sup> 朱鑫<sup>2</sup> 成嘉<sup>2</sup> 陈琳<sup>2</sup> 褚武英<sup>2</sup> 宾石玉<sup>1\*</sup> 张建社<sup>2\*</sup>

(1. 广西师范大学生命科学学院, 珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室, 桂林 541006; 2. 长沙学院生物与化学工程学院, 水生动物营养与品质调控湖南省重点实验室, 长沙 410022)

**摘要:** 研究从鳊(*Siniperca chuatsi*)基因组中获得*Shh*(Sonic hedgehog)基因序列, 对该基因编码的蛋白质和同源进化特征进行了分析。鳊*Shh*基因的开放阅读框(ORF)为1242 bp, 编码413个氨基酸, 分子量为46.01 kD, 等电点(pI)为6.57, 脂溶系数为82.83, 亲水性平均系数为-0.292, 拥有一个跨膜区, 被推定为亲水性膜结合蛋白。*Shh*蛋白具有两个结构域, 即Hh-N和Hh-C结构域。鳊*Shh*蛋白与自身所属的鲈形目鱼类*Shh*蛋白同源性较高。通过实时荧光定量PCR技术检测了鳊*Shh*基因的时空表达水平。结果显示: *Shh*的表达量在神经胚期表达显著上调, 并在胚胎发育中后阶段保持较高水平。*Shh*在鳊不同组织中存在一定的表达差异, 在脑、肠道中表达量较高, 而在红肌、白肌等组织中表达量相对较低。通过环巴胺(Cyclopamine)处理鳊胚胎来抑制*Shh*信号通路的实验表明, *Shh*信号通路被抑制后, *Pax3*、*Pax7*、*Myomaker*、生肌调节因子及肌球蛋白重、轻链等基因的表达均显著降低, 推测*Shh*参与调控鳊肌细胞的早期分化和发育过程。研究将有助于从分子水平了解*Shh*信号调控鱼类发育的分子机理, 为鱼类发育生物学以及健康养殖提供参考依据。

**关键词:** *Shh*; 胚胎发育; 骨骼肌; 表达特征; 鳊

中图分类号: Q344<sup>+</sup>.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2024)01-0157-09



鱼类肌肉组织由明显分层的红肌和白肌组成, 又可称为慢肌和快肌, 它们既是鱼类躯干的结构组织和运动器官, 也是人类重要的蛋白源<sup>[1]</sup>。已有研究证实, 多种信号分子参与了慢肌和快肌发生分化的调节过程。这些信号分子主要包括三种类型, 即Hedgehog<sup>[2]</sup>、Wnt<sup>[3]</sup>和TGF- $\beta$ 家族基因<sup>[4]</sup>。有关调节肌纤维决定分化的研究主要集Hedgehog和TGF- $\beta$ 家族基因, 其研究对象也主要采用如斑马鱼等模式生物。*Echidna hedgehog*仅在脊索(Notochord)中表达, Currie等<sup>[5]</sup>研究发现过表达*Echidna hedgehog*, 具有挽救无脊索突变体的肌肉先驱细胞(Muscle pioneer cells)分化的能力。此外, 研究还发现, 在野生型胚胎中联合异位表达*Echidna hedgehog*和*sonic hedgehog*能够诱导额外的肌肉先驱细胞的生成, 这表明这两种信号依次作用于体节发育。Lewis等<sup>[6-8]</sup>

采用Hedgehog家族蛋白及Hedgehog家族蛋白的负性调节因子Patched1蛋白处理斑马鱼早期胚胎, 研究证实了Hedgehog家族蛋白在诱导斑马鱼慢肌形成中起关键的作用。进而探究发现在野生型斑马鱼胚胎过表达*Shh*或者显性失活的PKA(Dominant negative PKA)可导致所有的体节细胞发育为慢肌纤维<sup>[9, 10]</sup>。Du等<sup>[11]</sup>结合Hedgehog和TGF- $\beta$ 家族成员基因以斑马鱼为研究对象开展了慢肌分化的机理研究。该研究揭示, 在野生型斑马鱼胚胎过表达Hedgehog同源基因或抑制PKA可诱导慢肌肌源细胞的定向分化, 而采用TGF- $\beta$ 家族成员基因*Dorsal-1*处理斑马鱼胚胎可抑制肌原细胞的产生, 说明Hedgehog和TGF- $\beta$ 家族成员基因在调控慢肌分化中是拮抗性的, 即Hedgehog可诱导慢肌的形成, 而TGF- $\beta$ 成员, 如BMP4抑制慢肌发育。然而, 目前有

收稿日期: 2023-02-16; 修订日期: 2023-05-12

基金项目: 国家自然科学基金(31820103016、32002370和U21A20263)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31820103016, 32002370 and U21A20263)]

作者简介: 孟杨杨(1997—), 男, 硕士研究生; 研究方向为鱼类品质调控研究。E-mail: 1374898816@qq.com

通信作者: 宾石玉, 教授; 主要从事动物营养研究。E-mail: binsy@gxnu.edu.cn 张建社, 教授; 主要从事水产动物营养及品质调控研究。E-mail: jzhang@ccsu.edu.cn \*共同通信作者

关Hedgehog信号分子在养殖鱼类特别是鳊诱导肌细胞或肌纤维类型定向分化的研究尚未有报道,有待深入研究。

Sonic hedgehog(Shh)信号通路内存在众多家族成员基因,目前所熟知的蛋白主要包括分泌性糖蛋白配体Shh、Patched(Ptch)与Smoothed(Smo)膜受体蛋白,以及核转录因子Gli等。Shh是一种分泌型蛋白,可经过细胞间的互作将Shh传递到受体细胞中与受体结合。Ptch属于12次跨膜蛋白,既是Shh信号通路中的受体,同时也是Shh信号的直接靶基因,并通过负反馈抑制Shh信号的活性<sup>[12]</sup>。在正常情况下,Ptch抑制Smo蛋白活性,从而抑制下游通路,随后下游的Gli蛋白在蛋白酶体(Proteasome)内被截断,并以羧基端被截断的形式进入细胞核内,抑制下游靶基因的转录。Smo属于7次跨膜结构蛋白,同时也是Shh信号分子传递所必须的受体,当Shh信号分子与Ptch结合时,解除Ptch对Smo的抑制作用,促使Gli蛋白进入核内激活下游靶基因转录。Gli作为Shh信号通路中发挥功能作用的核转录因子,在脊椎动物中有3种类型,即Gli1、Gli2和Gli3。其中Gli1只具有转录激活作用,转录激活Gli1后会正反馈调控更进一步增加Gli的活化。而Gli2与Gli3不仅具有转录激活作用,还同时具有转录抑制作用<sup>[13]</sup>。

鳊肌肉为高蛋白的优质肉类,较常见经济鱼类总氨基酸含量更高,肉质鲜美,深受广大消费者的喜爱,具有重要的经济价值,是我国淡水养殖的重要名贵特色优良品种<sup>[14-17]</sup>。本研究对鳊Shh基因进行了生物信息学分析,实时荧光定量PCR检测了Shh基因的表达特性。随后通过环巴胺处理鳊胚胎抑制Shh信号传导,分析了与肌细胞增殖和分化相关转录因子及肌球蛋白重、轻链等基因的表达水平。结果揭示,Shh信号分子被抑制后,所检测的相关基因表达均显著降低,表明Shh参与调控鳊肌细胞的早期分化和融合。该研究有助于我们从分子水平了解Shh信号分子的生物信息学特征,以及鱼类肌细胞分化的潜在机理,将丰富鱼类早期肌肉发生分化的基础理论,为健康养殖提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

用于实验的鳊胚胎及用于基因组织表达检测的鳊幼鱼均来自于实验室长期合作单位湖南省水产科学研究所。

### 1.2 实验方法

鳊不同发育阶段胚胎的收集 胚胎孵育方

法参考刘希良等<sup>[18]</sup>技术,收集未受精卵、卵裂期、囊胚期、原肠早期、神经胚期、视泡期、尾芽期、肌肉效应期、心脏搏动期、血液循环期、胸鳍原基期和出膜期胚胎材料,分别取40—50枚卵或胚胎保存于装有1 mL RNA保护液(Sample Protector for RNA/DNA, 9750 宝日医生物,北京)的离心管中,并用液氮快速冷冻,最后保存于-80℃超低温冰箱待用。

环巴胺溶液浸泡胚胎样品收集 称量10 mg 环巴胺(Cyclopamine, HY-17024, MedChemExpress, 美国)粉末溶于2.43 mL DMSO溶液中,得到10 mmol/L 环巴胺母液。将环巴胺母液与曝气水按 1:500 的比例稀释至环巴胺终浓度20  $\mu$ mol/L (DMSO终浓度为0.2%)。待胚胎发育到囊胚期时,分别取100枚胚胎至环巴胺处理组和 DMSO 对照组(浓度为0.2%,不含环巴胺)进行浸泡处理,统计两组死亡率并记录,待胚胎发育到出膜期时收集胚胎样品于2 mL离心管中,液氮速冻后,至-80℃储存备用。

鳊组织样品的收集 将实验室养殖缸内暂养的鳊随机选取规格大小相一致且健康幼鱼3尾,体重为(250 $\pm$ 10) g。参考吴萍等<sup>[19]</sup>安乐处理鱼类方式,处理后放置冰上解剖。分别取红肌、白肌、肝脏、心脏、脾脏、肾脏、脑和肠道放入2 mL EP管中,在液氮速冻后,迅速放入-80℃超低温冰箱储存备用。

RNA提取及cDNA模板合成 鳊各时期胚胎及幼体组织总RNA提取参照RNAiso Plus (9108, 宝日医生物,北京)试剂盒说明书进行。提取胚胎总RNA后使用1.5%琼脂糖凝胶电泳及微量核酸蛋白测定仪(NanoPhotometer NP80, Implen GmbH, Germany)对RNA的完整性及浓度进行检测,核酸 $A_{260}/A_{280}$ 比值在1.8—2.0确保核酸质量。并用逆转录试剂[MonScript<sup>TM</sup> RTIII Super Mix with dsDNase (Two-Step), Monad, 中国],按照试剂说明书进行RNA逆转录,获得的cDNA保存于-80℃冰箱备用。

引物设计与合成 通过UCSC及NCBI网站查询实验所需鳊基因序列,利用NCBI网页中Primer-blast工具进行引物设计,引物序列由北京擎科生物科技有限公司合成(表1)。

实时荧光定量PCR 以鳊胚胎及幼鳊组织样品的cDNA为模板,进行实时荧光定量PCR检测,每个样品进行4次技术重复检验。实验反应体系:SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 6  $\mu$ L、正反向引物各0.5  $\mu$ L、DNA模板1  $\mu$ L、Nuclease-free water 4.5  $\mu$ L。反应条件为:95℃ 预变性1min; 95℃ 变性5s; 58℃ 退火25s; 40个循环;绘制融解曲线的温度为65—95℃,

表 1 荧光定量引物

Tab. 1 The Primers for RT-qPCR

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列Sequence (5'—3')     | 用途<br>Application |
|---------------------|--------------------------|-------------------|
| <i>Shh-F</i>        | GACGGTAGAGATAGCAGCGG     | RT-qPCR           |
| <i>Shh-R</i>        | TGCTTGACGCAAGAGGTGT      |                   |
| <i>Ptch1-F</i>      | ATGCTAAGGTGGGACTGTGC     | RT-qPCR           |
| <i>Ptch1-R</i>      | CAAACAGTCTCCTGTCCGCT     |                   |
| <i>Gli1-F</i>       | CCGCTTATACTGTCAGCCGT     | RT-qPCR           |
| <i>Gli1-R</i>       | CCTCTGCGATTGGTCTCAGG     |                   |
| <i>Gli2-F</i>       | GCAAACAGGAGCCAGATGAC     | RT-qPCR           |
| <i>Gli2-R</i>       | TTAGGTTCTGTTGGTGGCCT     |                   |
| <i>Gli3-F</i>       | ATGGCTTTGACCAGGGTAGC     | RT-qPCR           |
| <i>Gli3-R</i>       | TGCTCTCCTCAGCAAGTGTG     |                   |
| <i>Myod-F</i>       | CAACGACGCCTTTGAGACCCTG   | RT-qPCR           |
| <i>Myod-R</i>       | GTCCGAATCCCCTGTAGTGT     |                   |
| <i>Myog-F</i>       | CGAGACCAACCCTTACTTCTCCCT | RT-qPCR           |
| <i>Myog-R</i>       | GACTCCCACACAAGCCCATCAT   |                   |
| <i>Myf5-F</i>       | AGGTCAACCACGCTTTCGAG     | RT-qPCR           |
| <i>Myf5-R</i>       | GTTTTCACCTGCTCCCGTA      |                   |
| <i>Mrf4-F</i>       | AGACCAACCCTTATCTTTCAATG  | RT-qPCR           |
| <i>Mrf4-R</i>       | CGGTCTCGGACGGAACATTAT    |                   |
| <i>Pax3-F</i>       | TGAACCCCGCCATAGGAAAC     | RT-qPCR           |
| <i>Pax3-R</i>       | TCAGAGGGGAGATGGCGTAG     |                   |
| <i>Pax7-F</i>       | AGCCACAACATGACTTCTCC     | RT-qPCR           |
| <i>Pax7-R</i>       | GTCCACCGTCTTAATGGAGG     |                   |
| <i>Myomaker-F</i>   | AGTGTTCACGGCACGGCTC      | RT-qPCR           |
| <i>Myomaker-R</i>   | CGTGGTCAACACTCCAAACAT    |                   |
| <i>Myh1-F</i>       | AATCAGCCAACTCAGTGCCA     | RT-qPCR           |
| <i>Myh1-R</i>       | CTTGGCTCGGGCAGTTCG       |                   |
| <i>Myh2-F</i>       | CTCCCTGGTTCATGATGCCG     | RT-qPCR           |
| <i>Myh2-R</i>       | AACGGACAAAATGAGGGTGAG    |                   |
| <i>Myh3-F</i>       | AAGTCCCGTGTACCTTCCAG     | RT-qPCR           |
| <i>Myh3-R</i>       | TTGATGCTTTTGACGGTGATT    |                   |
| <i>Myh7a-F</i>      | TCAAAGTGGGAAATGAGTGGGT   | RT-qPCR           |
| <i>Myh7a-R</i>      | CTCAAATCCAGCGATGTCCAG    |                   |
| <i>Myh9-F</i>       | AAACAGGCAAGGAACAAGGC     | RT-qPCR           |
| <i>Myh9-R</i>       | GCAGCGTTGTATCAAGGGT      |                   |
| <i>Myh10-F</i>      | TCATTATGCTGGGAGGGTGG     | RT-qPCR           |
| <i>Myh10-R</i>      | AAGTTGGGCTGGGTGTTGTG     |                   |
| <i>Myh11-F</i>      | GCCCAAGTTCAGCAAGGTCG     | RT-qPCR           |
| <i>Myh11-R</i>      | GATGGGCAGGTTCTTGTAGGG    |                   |
| <i>Myh12-F</i>      | AGCAGCAGGGTGAGGGTGG      | RT-qPCR           |
| <i>Myh12-R</i>      | TCGTCCTTGCTGATGATGCC     |                   |
| <i>Myh13-F</i>      | TAAACCACGGGAGAACTGCG     | RT-qPCR           |
| <i>Myh13-R</i>      | TTATCATCGTCACCAAGGAAGG   |                   |
| <i>Myh16-F</i>      | GCTCAAGTCTTGGGCAATC      | RT-qPCR           |
| <i>Myh16-R</i>      | CTCGCAGTCCCTCCACAAAA     |                   |
| <i>Myh16-F</i>      | CTGCCTGTACGAGTTTGACC     | RT-qPCR           |
| <i>Myh16-R</i>      | TGCGGTTTCAAGGGGTAAAAG    |                   |
| <i>Myh16-F</i>      | GCATTGTGACTCCCAAAACCC    | RT-qPCR           |
| <i>Myh16-R</i>      | GGCAGCCAACATCAAACCAG     |                   |
| <i>Rpl13-F</i>      | CACAAGAAGGAGAAGGCTCGGGT  | 内参引物              |
| <i>Rpl13-R</i>      | TTTGGCTCTCTTGGCACGGAT    |                   |
| <i>Gapdh-F</i>      | TGCCCAGTATGTGGTTGAGTC    | 内参引物              |
| <i>Gapdh-R</i>      | GGGAGGGATTTGTCGTATTC     |                   |

每0.5℃ 读板1次。组织表达实验用*Rpl13*作为内参, 胚胎时期表达实验用*Gapdh*作为内参。

**数据处理及分析** 将实验所得数据利用Excel软件进行分析, 各基因相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 并采用SPSS 20软件对各组基因表达值进行统计分析。其中时序及组织表达结果使用单因素方差分析, 环巴胺浸泡实验数据使用独立样本*t*检验。最终所得结果均以平均值±标准误表示, 当显著性 $P<0.05$  认为两组数据之间差异显著。

## 2 结果

### 2.1 鳊*Shh*基因生物信息学特征

***Shh*基因序列鉴定分析** 鳊*Shh*基因mRNA序列全长2407 bp, 5'UTR长度为160 bp, 3'UTR长度为1005 bp。起始密码子ATG在161—163 bp处, 终止密码子TGA在1400—1403 bp处。开放阅读框长度为1242 bp, 编码413个氨基酸。

***Shh*蛋白特性和结构预测** 通过在线Ex-pasy-ProtParam软件工具预测鳊*Shh*蛋白, 结果显示其由413个氨基酸组成, 分子量为46.01 kD, 等电点为6.57, 蛋白偏弱酸性。预测不稳定指数(II)计算能35.27, 为稳定性蛋白。*Shh*蛋白中含有47个酸性氨基酸(Asp+Glu), 44个碱性氨基酸(Arg+Lys)。该蛋白质预估半衰期为30h, 脂溶系数为82.83, 亲水性平均系数是-0.292, 属亲水蛋白, 疏水性不强。编码鳊*Shh*蛋白的20种氨基酸中, 亮氨酸(Leu)最多, 占比8.7%, 半胱氨酸(Cys)最少, 占比1.5%。通过TMHMM-2.0对蛋白质跨膜域进行分析, 显示*Shh*蛋白存在一处跨膜域结构, 该蛋白质属于膜结合蛋白。

采用NCBI保守结构数据库(CDD)的CD-searcher在线工具预测, *Shh*蛋白含有2个功能结构域, 即Hh-N和Hh-C结构域。Hh-N结构域中拥有Hh\_signal模块, 模块结构位于39—184位氨基酸处, 编码146个氨基酸残基。Hh-C结构域的Hint模块位于186—399位氨基酸处, 编码214个氨基酸残基。

**鳊*Shh*同源蛋白比对及生物进化树分析** 在NCBI数据库中检索包括鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类等20个物种的*Shh*氨基酸序列, 采用NCBI上Protein BLAST对蛋白同源性进行比对, 结果显示, 鳊*Shh*蛋白与鱼类*Shh*蛋白具有较高的同源性, 其与长吻钻嘴鱼(*Chelmon rostratus*)和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)*Shh*蛋白相似度最高, 为97.58%; 与其他物种相比, 鳊*Shh*蛋白与家猫(*Felis catus*)*Shh*蛋白相似度最低, 仅为61.17%。使用DNA-MAN软件对不同物种间*Shh*蛋白Hh-N结构域的氨

基酸序列比对,结果显示,其在鳊、大口黑鲈及白梭吻鲈等鲈形目鱼类中具有较高的相似性,说明Shh蛋白中组成Hh-N结构域的氨基酸序列在不同物种之间较为保守。使用MEGA11软件对Shh蛋白进行系统进化分析,结果显示(图1),鳊Shh与鱼类Shh聚为一支,其中,鳊和鲈形目白梭吻鲈的遗传距离最近。

## 2.2 鳊Shh基因时空表达特征

**Shh在鳊胚胎不同发育阶段的表达特征** 通过RT-qPCR检测Shh基因在鳊胚胎不同发育阶段的表达量,如图2所示,Shh在整个胚胎发育阶段均有不同程度表达,胚胎发育初期表达水平相对较低,随着胚胎发育进程推进,其在神经胚期表达显著上调( $P<0.05$ )。Shh在胚胎发育中后期表达水平较高,并在出膜期达到峰值。

**Shh在鳊不同组织中的表达特征** 通过RT-qPCR检测分析Shh基因在鳊不同组织内的表达差异(图3),结果表明,在脑和肠道中显著高于在白肌、红肌、心脏、肾脏、肝脏和脾脏组织中的表达( $P<0.05$ )。

## 2.3 环巴胺抑制Shh信号通路对鳊胚胎发育及肌肉发育相关调控因子的影响

**环巴胺浸泡鳊胚胎对发育的影响** 环巴胺作为一类Shh信号分子的特异抑制剂,实验采用浸

泡方式处理鳊胚胎,并采用DMSO浸泡作为对照处理。实验期间死亡率统计结果为,实验组死亡23枚,对照组死亡18枚,并利用SPSS 20进行卡方检验,无显著性差异( $P>0.05$ )。如图4所示,对照组存活的82枚胚胎躯干全部正常,实验组存活的77枚胚胎躯干尾端全部呈弯曲状,致畸率100%,推测可能是由于其尾部肌肉组织发育异常,导致胚胎畸形。

**环巴胺处理对Shh通路下游基因及生肌调节基因表达影响** 通过RT-qPCR检测Shh信号通路下游靶基因*Ptch1*、*Gli1*、*Gli2*和*Gli3*的表达量,评判Shh信号传递受阻情况。随后检测与肌细胞增殖和融合相关基因(*Pax3*、*Pax7*和*Myomaker*)及生肌调节因子(MRFs)家族成员,如*Myod*、*Myog*、*Mrf4*和*Myf5*基因的表达量。如图5所示,经环巴胺浸泡处理的鳊胚胎,所检测基因表达量较对照组均显著下降( $P<0.05$ )。

**环巴胺处理对鳊胚胎肌球蛋白编码基因表达影响** 为探讨环巴胺处理对鳊肌肉生长的影响,通过RT-qPCR检测分析肌球蛋白轻链及重链基因在鳊出膜期表达量。如图6所示,与对照相比,肌球蛋白轻链及轻链激酶基因的同分异构体包括*Myl2*、*Myl3*、*Myl6*、*Mylk*和*Mylk4*基因的表达量均显著降低,肌球蛋白重链的7个同分异构体如*Myh1*、*Myh2*、*Myh3*、*Myh7*、*Myh9*、*Myh10*和

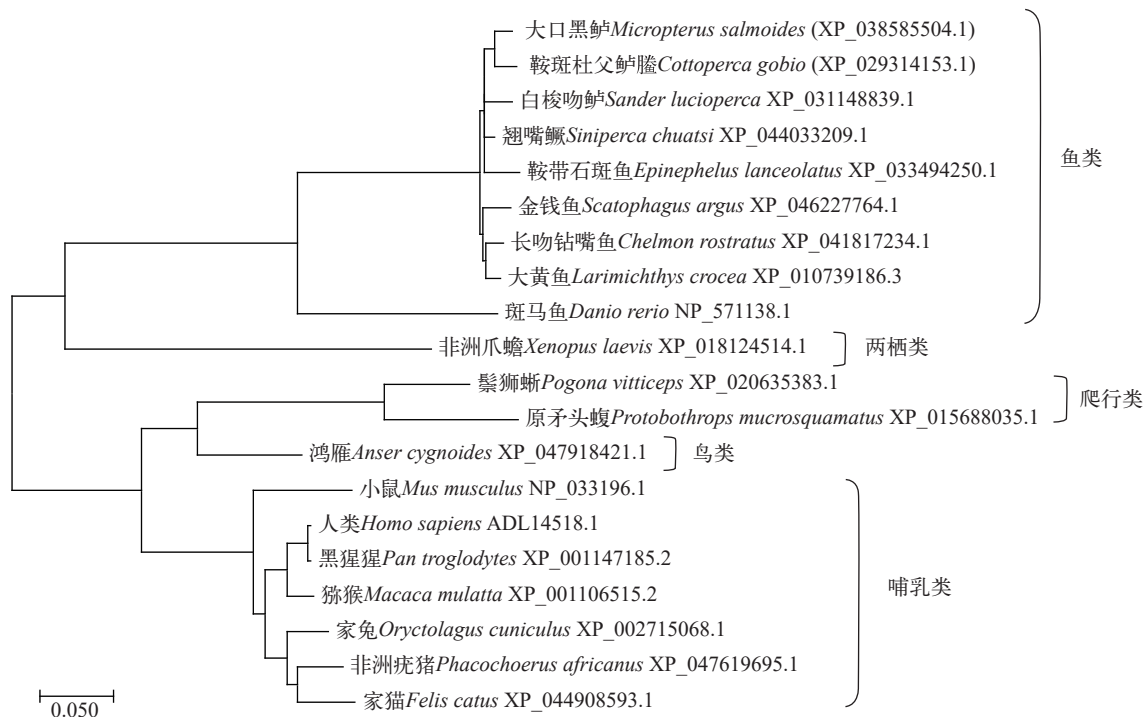


图1 Shh蛋白系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of the Shh protein

生物进化树中分支线长的短代表生物间的遗传距离

The shortest branch lengths in the evolutionary tree of organisms represent the genetic distance between organisms

*Myh11* 基因的表达量同样显著下降 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 鳊*Shh*基因编码蛋白的结构特征分析

本研究对鳊*Shh*蛋白结构和同源进化特征进行生物信息学分析, 结果显示, 鳊*Shh*开放阅读框为1242 bp, 编码413个氨基酸, 分子量为46.01 kD, 等电点为6.57, 蛋白偏弱酸性; 鳊*Shh*蛋白脂溶系数为82.83, 为脂溶性蛋白, 亲水性平均系数是-0.292, 有一处跨膜结构, 推定为亲水性膜结合蛋白。该基因编码的蛋白含有两个功能结构域, 即Hh-N与Hh-C。预测得出的Hh\_signal模块与Hint模块分别属于氨基端结构域和羧基端结构

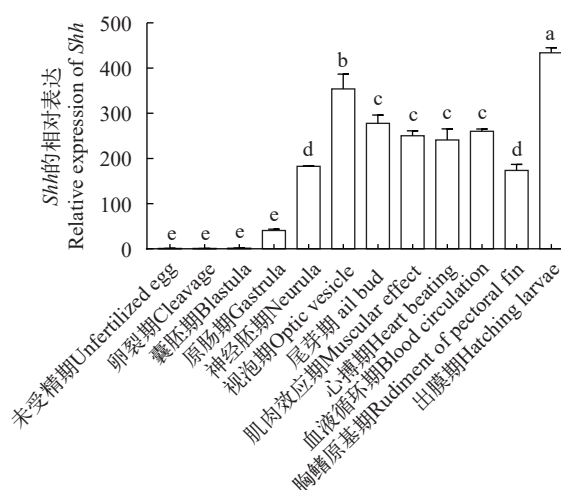


图2 鳊胚胎不同发育阶段*Shh*相对表达丰度

Fig. 2 Relative expression abundance of *Shh* in *Siniperca chuatsi* embryos at different developmental stages

不同字母表示不同发育阶段之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 相同字母表示无显著差异 ( $P \geq 0.05$ ); 下同

Different letters indicate significant differences between developmental stages ( $P < 0.05$ ), same letters indicate no significant differences ( $P \geq 0.05$ ). The same applies below

域。有研究报道, 果蝇与脊椎动物Hh前体蛋白通过C-末端部分催化并自我分割后变为N端与C端, 果蝇Hh-N过表达会导致胚胎表皮特征发生改变, Hh-C过表达则无任何变化<sup>[20-22]</sup>。在脊椎动物中*Shh*-N可诱导运动神经元和基底细胞分化<sup>[23]</sup>。以上说明Hh-N结构域具有Hh蛋白信号活性。Hh-C的功能则是起到胆固醇转移酶类作用, 影响信号分子的分布<sup>[24, 25]</sup>。

同源进化特征分析显示, 鳊*Shh*蛋白与长吻钻嘴鱼和大黄鱼的*Shh*蛋白相似度最高, 与家猫*Shh*蛋白相似度最低, 且物种间*Shh*蛋白Hh-N结构域的氨基酸序列较为保守。鳊*Shh*蛋白系统进化分析显示, 鳊*Shh*蛋白与鱼类*Shh*蛋白聚为一支, 并与鲈形目白梭吻鲈遗传距离最短, 亲缘关系最近, 说明*Shh*在鱼类进化过程中进化较为保守。

#### 3.2 鳊*Shh*基因时空表达特征分析

有研究表明, *Shh*基因在动物胚胎发育过程中, 对神经、消化道及肢芽等组织发育起到重要调控

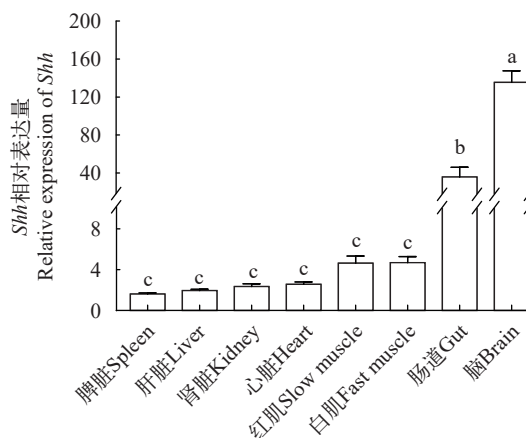


图3 鳊不同组织中*Shh*的相对表达丰度

Fig. 3 Relative expression abundance of *Shh* in different tissues of *Siniperca chuatsi*

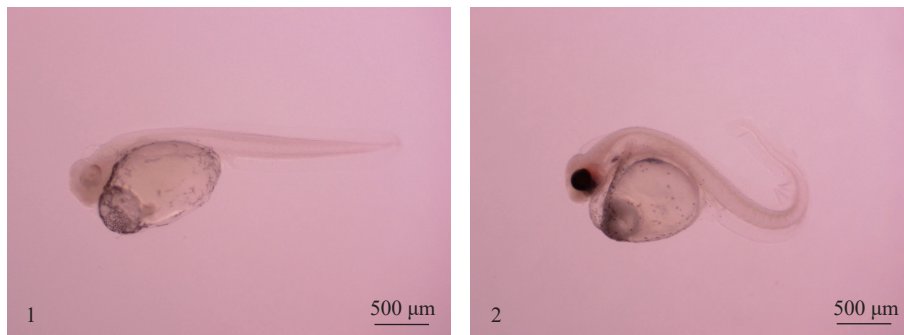


图4 浸泡处理后鳊胚胎呈现的发育表型

Fig. 4 Developmental phenotype of *Siniperca chuatsi* embryos after immersion treatment

1. 对照组浸泡DMSO的胚胎; 2. 实验组浸泡环巴胺的胚胎

1. control embryos soaked in DMSO; 2. experimental group of embryos soaked in cyclopamine

作用<sup>[26]</sup>。尤其在脊椎动物早期胚胎发育过程中, 脊索或神经底板分泌的Shh对背侧肌节部位的肌细胞形成和存活起着至关重要的作用<sup>[27-29]</sup>。本研究采用RT-qPCR对翘嘴鲌12个胚胎发育时期Shh的表达进行分析, 结果表明Shh在胚胎不同发育阶段都有表达且具有显著性差异, 并随胚胎发育进程的推进, 表达量在神经胚期显著增高, 且整个胚胎发育中后阶段表达量保持较高水平, 最终在出膜期表达量达到峰值。因此, 我们推测Shh可能对鳃胚胎神经的发育发挥作用。

有研究报道, Shh基因在不同动物的多组织中表达<sup>[30]</sup>。本次研究对鳃不同组织表达分析揭示, Shh在检测的所有组织中均有表达, 脑和肠道中表达较高, 在白肌和红肌等组织中表达相对较低。有研究表明, Shh作为一种分泌蛋白, 在海马体神经元回路的形成和可塑性方面发挥重要作用, 其中海马神经元树突中的Shh受体激活后参与跨神经元信号通路, 该通路加速了神经轴突生长<sup>[31]</sup>。因此, 我们推测Shh可能在幼体鳃的脑神经发育中也有着重要

的调控作用。有研究发现, Shh在脊椎动物体内是通过作用于肌肉干细胞直接调控肌肉的生长发育, 以及促进新的肌纤维数量增加<sup>[32]</sup>。Koleva等<sup>[33]</sup>对小鼠肌肉干细胞进行体外培养, 发现Shh能够促进肌肉干细胞增殖。因而推测Shh可能在鳃肌细胞生长过程中起到调控作用。

### 3.3 鳃Shh基因对肌肉发育相关调控因子的表达分析

本研究为探究Shh在鳃肌肉发育中的作用, 采用Shh信号通路特异性拮抗剂环巴胺对鳃鱼胚胎进行浸泡处理。环巴胺在Shh信号通路中的作用机制是抑制Smo的活性, 阻断Shh信号的传递<sup>[34]</sup>。本次研究检测Shh通路内基因(*Ptch1*、*Gli1*、*Gli2*和*Gli3*)、生肌调节因子家族基因、调控肌肉发育及相关肌球蛋白重链、轻链及轻链激酶基因的表达。结果显示, *Ptch1*、*Gli1*、*Gli2*和*Gli3*表达量都显著降低, 说明环巴胺处理后, 该通路内的基因都受到不同程度的抑制。

*Pax3*、*Pax7*、*Myf5*、*Myod*、*Myog*和*Mrf4*等

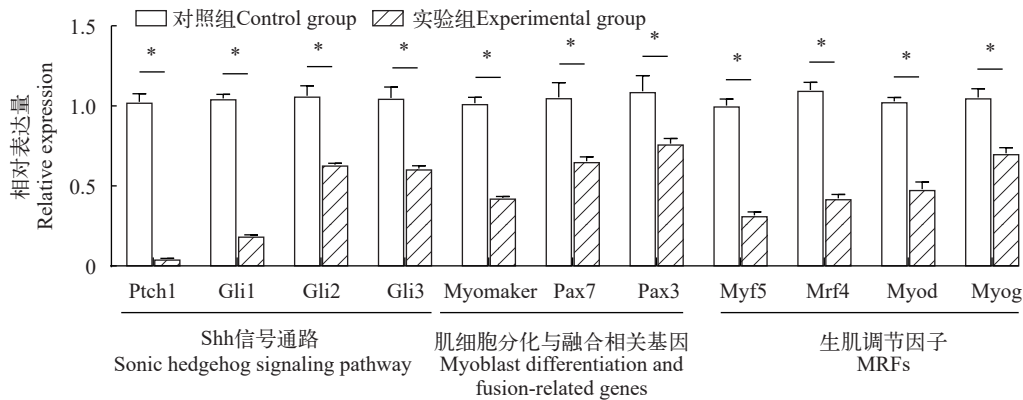


图5 鳃出膜期Shh通路下游靶基因、肌细胞分化与融合相关基因、生肌调节基因MRFs家族成员基因的相对表达丰度

Fig. 5 Relative expression abundance of downstream target genes of the Shh pathway, genes related to myoblast differentiation and fusion, and genes of members of the MRFs family of myogenic regulatory genes in *Siniperca chuatsi* at the emergence stage

\* $P < 0.05$ 具有显著差异性; 下同

\* $P < 0.05$  is significantly different. The same applies below

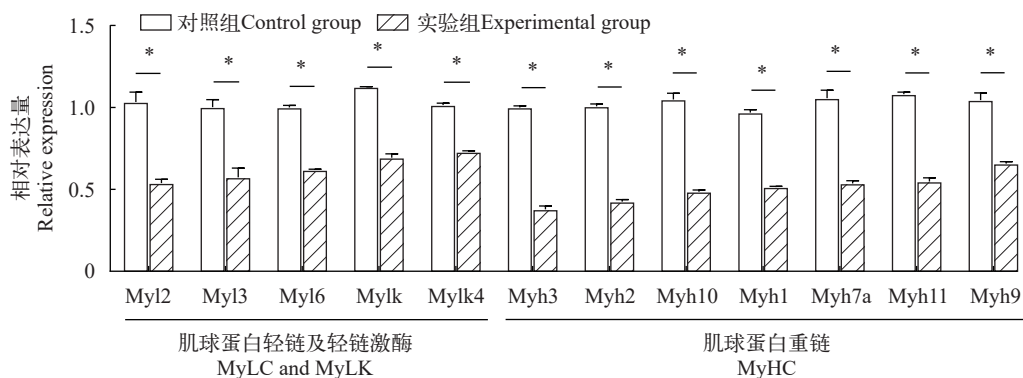


图6 鳃出膜期肌球蛋白及激酶基因表达丰度

Fig. 6 Myosin and kinase gene expression abundance in the emergence phase of *Siniperca chuatsi*

转录因子, 它们协同诱导肌源性干细胞的激活、增殖和定向分化直至形成成熟肌纤维<sup>[35]</sup>。其中*Pax3*和*Pax7*在肌肉干细胞中特异表达, 并在调控肌肉干细胞增殖和分化中起重要作用<sup>[36]</sup>。*Pax3*、*Pax7*、*Myf5*及*Myod*的表达是控制肌肉干细胞激活、增殖与分化的关键要素<sup>[37]</sup>。另外, *Myomaker*是一个近期新发现的促使肌细胞融合的重要基因, 属于tmem 8c家族成员, 是一种跨膜蛋白<sup>[38]</sup>。*Myomaker*体内表达实验证实, 该基因在肌细胞融合过程发挥关键作用<sup>[38]</sup>, 在斑马鱼中, *Myomaker*基因在快肌中表达, 敲除*Myomaker*后导致肌细胞融合缺陷<sup>[39-41]</sup>。同时, 过表达*Myomaker*足以诱导快肌细胞之间的过度融合, 同时还促使通常无法融合的慢肌细胞融合, 说明该基因在鱼类肌细胞融合中有重要作用<sup>[42]</sup>。通过环巴胺处理鳊胚胎抑制*Shh*信号通路后, 对参与调控肌细胞分化的转录因子及肌细胞膜融合基因进行RT-qPCR检测, 发现*Pax3*、*Pax7*、*Myf5*、*Myod*、*Myog*、*Mrf4*和*Myomaker*的表达均显著下降, 推测*Shh*可能通过直接或间接调控生肌调节因子等基因表达, 影响鳊胚胎肌肉细胞的发生与分化。

我们先前在鳊肌纤维中鉴定了多种肌球蛋白重链和轻链亚型, 其中, 肌球蛋白是构成鱼类肌肉的主要结构蛋白, 是一种高度不对称且分子量约500 kD的六聚体蛋白, 由两条分子量约230 kD的重链和四条分子量约16—20 kD的轻链组成<sup>[43, 44]</sup>。另外, 研究表明, 肌球蛋白重链亚型如*Myh1*、*Myh7a*、*Myh9*、*Myh10*和*Myh11*基因在慢肌中表达成倍高于快肌, 而*Myh2*和*Myh3*的表达量在快肌中的表达水平是慢肌的数倍; 肌球蛋白轻链及轻链激酶亚型如*Myl2*、*Myl3*、*Myl6*、*Mylk*和*Mylk4*等基因在慢肌中的表达是快肌的数倍<sup>[19]</sup>。本实验结果表明, 当*Shh*信号传递受阻后, 肌球蛋白重链、轻链及轻链激酶亚型基因表达量均显著降低表达。由此推测, 鳊胚胎发育畸型的原因是环巴胺抑制剂处理导致*Shh*信号分子传递阻断, 继而抑制肌细胞分化相关基因的表达。因此说明, *Shh*对鳊肌肉细胞分化和生长发挥重要调控作用, 但其调控的分子机制仍有待进一步深入研究。

## 参考文献:

[1] Cheng J, Chu W Y, Zhang J S. Progresses and perspectives of the studies on fish muscle-related genes and their expression [J]. *Life Science Research*, 2010, **14**(4): 355-362. [成嘉, 褚武英, 张建社. 鱼类肌肉组织发生和分化相关基因的研究进展 [J]. 生命科学研究, 2010, **14**(4): 355-362.]

[2] Zeng Q, Fu Q, Wang X, *et al.* Protective effects of sonic hedgehog against ischemia/reperfusion injury in mouse skeletal muscle via AKT/mTOR/p70S6K signaling [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, **43**(5): 1813-1828.

[3] Zhou D, Strakovsky R S, Zhang X, *et al.* The skeletal muscle Wnt pathway may modulate insulin resistance and muscle development in a diet-induced obese rat model [J]. *Obesity*, 2012, **20**(8): 1577-1584.

[4] Kumawat K, Menzen M H, Slegtenhorst R M, *et al.* TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1) signaling regulates TGF- $\beta$ -induced WNT-5A expression in airway smooth muscle cells via Sp1 and  $\beta$ -catenin [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(4): e94801.

[5] Currie P D, Ingham P W. Induction of a specific muscle cell type by a hedgehog-like protein in zebrafish [J]. *Nature*, 1996, **382**(6590): 452-455.

[6] Lewis K E, Currie P D, Roy S, *et al.* Control of muscle cell-type specification in the zebrafish embryo by hedgehog signalling [J]. *Developmental Biology*, 1999, **216**(2): 469-480.

[7] Ingham P W, Kim H R. Hedgehog signalling and the specification of muscle cell identity in the Zebrafish embryo [J]. *Experimental Cell Research*, 2005, **306**(2): 336-342.

[8] Wolff C, Roy S, Ingham P W. Multiple muscle cell identities induced by distinct levels and timing of hedgehog activity in the zebrafish embryo [J]. *Current Biology*, 2003, **13**(14): 1169-1181.

[9] Norris W, Neyt C, Ingham P W, *et al.* Slow muscle induction by Hedgehog signalling in vitro [J]. *Journal of Cell Science*, 2000, **113**(15): 2695-2703.

[10] Barresi M J F, Stickney H L, Devoto S H. The zebrafish *slow-muscle-omitted* gene product is required for Hedgehog signal transduction and the development of slow muscle identity [J]. *Development*, 2000, **127**(10): 2189-2199.

[11] Du S J, Devoto S H, Westerfield M, *et al.* Positive and negative regulation of muscle cell identity by members of the hedgehog and TGF- $\beta$  gene families [J]. *Journal of Cell Biology*, 1997, **139**(1): 145-156.

[12] Ingham P W, McMahon A P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles [J]. *Genes & Development*, 2001, **15**(23): 3059-3087.

[13] Hui C C, Angers S. Gli proteins in development and disease [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2011, **27**(5): 513-537.

[14] Zhang J G, Shen Y J, Zhang C F. Advances in research on muscle nutritional value of *Siniperca chuatsi* [J]. *Food Research and Development*, 2019, **40**(22): 209-214. [张家国, 沈益娟, 张长峰. 翘嘴鳊肌肉营养价值研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2019, **40**(22): 209-214.]

[15] Li W, Liu J S, Ye S W, *et al.* Research progress on technique and effect evaluation of mandarin fish stock en-

- hancement in large water bodies [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, **28**(6): 808-818. [李为, 刘家寿, 叶少文, 等. 大水面鳊增殖放流技术及效果评估研究进展 [J]. 中国水产科学, 2021, **28**(6): 808-818.]
- [16] Wu M L, Cui K, Li H Y, *et al.* Study on the ecological farming technique of shrimp-rice-mandarin fish co-culture [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, **46**(34): 62-64. [吴明林, 崔凯, 李海洋, 等. 虾稻鳊共作生态种养技术研究 [J]. 安徽农业科学, 2018, **46**(34): 62-64.]
- [17] Liang Y Q, Cui X Q, Liu Y L. Evaluation of nutritive quality and analysis of the nutritive compositions in the muscle of mandarin fish, *Siniperca chuatsi* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**(4): 386-388. [梁银铨, 崔希群, 刘友亮. 鳊肌肉生化成份分析和营养品质评价 [J]. 水生生物学报, 1998, **22**(4): 386-388.]
- [18] Liu X L, Bin S Y, Wang K Z, *et al.* Artificial propagation and embryonic development observation of mandarin fish [J]. *Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2013, **31**(2): 100-106. [刘希良, 宾石玉, 王开卓, 等. 翘嘴鳊的人工繁殖与胚胎发育观察 [J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2013, **31**(2): 100-106.]
- [19] Wu P, Chen L, Cheng J, *et al.* The miRNA expression profile directly reflects the energy metabolic differences between slow and fast muscle with nutritional regulation of the Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2021, **259**: 111003.
- [20] Lee J J, Ekker S C, von Kessler D P, *et al.* Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis [J]. *Science*, 1994, **266**(5190): 1528-1537.
- [21] Bumcrot D A, Takada R, McMahon A P. Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, **15**(4): 2294-2303.
- [22] Porter J A, von Kessler D P, Ekker S C, *et al.* The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling [J]. *Nature*, 1995, **374**(6520): 363-366.
- [23] Roelink H, Porter J A, Chiang C, *et al.* Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis [J]. *Cell*, 1995, **81**(3): 445-455.
- [24] Porter J A, Ekker S C, Park W J, *et al.* Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain [J]. *Cell*, 1996, **86**(1): 21-34.
- [25] Porter J A, Young K E, Beachy P A. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development [J]. *Science*, 1996, **274**(5285): 255-259.
- [26] Zhou Y N, Hu B. Function of Shh gene in the development of embryos [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2008, **24**(6): 1240-1243. [周昱男, 胡波. Shh基因在胚胎发育过程中的调控作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, **24**(6): 1240-1243.]
- [27] Münsterberg A E, Kitajewski J, Bumcrot D A, *et al.* Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite [J]. *Genes & Development*, 1995, **9**(23): 2911-2922.
- [28] Pownall M E, Gustafsson M K, Emerson C P Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2002(18): 747-783.
- [29] Teillet M A, Watanabe Y, Jeffs P, *et al.* Sonic hedgehog is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages [J]. *Development*, 1998, **125**(11): 2019-2030.
- [30] Martí E, Takada R, Bumcrot D A, *et al.* Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo [J]. *Development*, 1995, **121**(8): 2537-2547.
- [31] Yao P J, Petralia R S, Mattson M P. Sonic hedgehog signaling and hippocampal neuroplasticity [J]. *Trends in Neurosciences*, 2016, **39**(12): 840-850.
- [32] Piccioni A, Gaetani E, Neri V, *et al.* Sonic hedgehog therapy in a mouse model of age-associated impairment of skeletal muscle regeneration [J]. *The Journals of Gerontology: Series A*, 2014, **69A**(3): 245-252.
- [33] Koleva M, Kappler R, Vogler M, *et al.* Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, **62**(16): 1863-1870.
- [34] Taipale J, Chen J K, Cooper M K, *et al.* Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine [J]. *Nature*, 2000, **406**(6799): 1005-1009.
- [35] Zhao J X, Yue W F. Control of skeletal muscle myogenesis by epigenetic regulations [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, **16**(3): 42-47.
- [36] Oustanina S, Hause G, Braun T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification [J]. *The EMBO Journal*, 2004, **23**(16): 3430-3439.
- [37] Shi J, Chu W Y, Zhang J S. Muscle growth, differentiation and gene expression regulation in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(6): 1145-1152. [石军, 褚武英, 张建社. 鱼类肌肉生长分化与基因表达调控 [J]. 水生生物学报, 2013, **37**(6): 1145-1152.]
- [38] Millay D P, O'Rourke J R, Sutherland L B, *et al.* Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation [J]. *Nature*, 2013, **499**(7458): 301-305.
- [39] Landemaine A, Rescan P Y, Gabillard J C. Myomaker mediates fusion of fast myocytes in zebrafish embryos [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, **451**(4): 480-484.
- [40] Shi J, Bi P, Pei J, *et al.* Requirement of the fusogenic mi-

- cropeptide myomixer for muscle formation in zebrafish [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, **114**(45): 11950-11955.
- [41] Shi J, Cai M, Si Y, *et al.* Knockout of myomaker results in defective myoblast fusion, reduced muscle growth and increased adipocyte infiltration in zebrafish skeletal muscle [J]. *Human Molecular Genetics*, 2018, **27**(20): 3542-3554.
- [42] Zhang W B, Roy S. Myomaker is required for the fusion of fast-twitch myocytes in the zebrafish embryo [J]. *Developmental Biology*, 2017, **423**(1): 24-33.
- [43] Zhang G Q, Chu W Y, Hu S N, *et al.* Identification and analysis of muscle-related protein isoforms expressed in the white muscle of the mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2011, **13**(2): 151-162.
- [44] Harrington W F, Rodgers M E. Myosin [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1984, **53**: 35-73.

## MOLECULAR CHARACTERIZATION AND SPATIO-TEMPORAL EXPRESSION PATTERN OF THE *SHH* GENE AND ITS REGULATION IN MUSCLE GROWTH IN *SINIPERCA CHUATSI*

MENG Yang-Yang<sup>1,2</sup>, ZHU Xin<sup>2</sup>, CHENG Jia<sup>2</sup>, CHEN Lin<sup>2</sup>, CHU Wu-Ying<sup>2</sup>, BIN Shi-Yu<sup>1</sup> and ZHANG Jian-She<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection, School of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541006, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory of Nutrition and Quality Control of Aquatic Animals, College of Biological and Chemical Engineering, Changsha University, Changsha 410022, China)

**Abstract:** Sonic hedgehog (Shh) is one of the important signaling molecules in the Hedgehog gene family that regulates cell proliferation and differentiation during the early embryo development. In this study, the DNA sequence of the *Shh* gene was obtained from *Siniperca chuatsi* genome, and the protein encoded by the gene and the homologous evolutionary features were analysed. The *Siniperca chuatsi Shh* gene has an open reading frame (ORF) of 1242 bp, encoding 413 amino acids, with molecular weight of 46.01 kD, isoelectric point (pI) of 6.57, lipolysis coefficient of 82.83, hydrophilic mean coefficient of -0.292, and one transmembrane structure, making it a hydrophilic membrane-bound protein. The Shh protein has two structural domains, Hh-N and Hh-C. The *Siniperca chuatsi Shh* protein shows a high degree of homology with that of the perciforms. The spatio-temporal expression pattern of the *Shh* gene in *Siniperca chuatsi* was analysed by using Real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the expression of *Shh* was significantly up-regulated at the neurula stage and remained at a high level during the middle and later stages of embryonic development. *Shh* was differentially expressed in different tissues of *Siniperca chuatsi*, with higher expression in brain and intestine, and lower expression in fast muscle, slow muscle and other tissues. The expression of muscle development related genes was analysed in *Siniperca chuatsi* embryos which treated with Cyclopamine. The results showed that the expression of *Pax3*, *Pax7*, *Myomaker*, *MRFs*, *MyLC*, *MyHC* and *MLCK*, were significantly reduced after inhibiting the Shh signalling pathway, suggesting that *Shh* is involved in regulating the early differentiation and development of *Siniperca chuatsi* muscle cells. The study will help us to understand the molecular mechanism of Shh signalling in regulating fish muscle development at the molecular level and provide a reference for fish developmental biology and healthy breeding.

**Key words:** *Shh*; Embryonic development; Skeletal muscle; Expression characteristic; *Siniperca chuatsi*