

# 美洲黑貂 5-HT<sub>1A</sub> 受体基因多态性 与自咬行为的相关性

林 宁<sup>①</sup> 白秀娟<sup>②\*</sup>

(<sup>①</sup>东北农业大学生命科学学院 哈尔滨 150030; <sup>②</sup>东北农业大学动物科技学院 哈尔滨 150030)

**摘要:** 以美洲黑貂 (*Mustela vison*) 5-羟色胺 1A(5-HT<sub>1A</sub>) 受体基因作为影响其自咬行为的可能候选基因, 分析该基因对美洲黑貂自咬行为的影响。本实验采用单链构象多态性(PCR-SSCP) 方法进行了多态性检测, 并对该基因的不同基因型与自咬行为的关系进行分析。结果表明, 在美洲黑貂群体中 5-HT<sub>1A</sub> 受体基因 136 位点发生碱基突变(T-G) 的 SNPs 对美洲黑貂自咬行为性状无影响( $\chi^2 = 1.3936, P > 0.2$ ), 在 287 位点发生(G-G) 突变对美洲黑貂的自咬行为有一定的影响( $\chi^2 = 3.7694, P < 0.2$ )。

**关键词:** 美洲黑貂; 5-HT<sub>1A</sub> 受体基因; 自咬行为; PCR-SSCP

中图分类号: Q752 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008)06-51-06

## The Polymorphism of 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Gene and its Relationship with Self biting Behavior in American Mink

LIN Ning<sup>①</sup> BAI Xiur Juan<sup>②\*</sup>

(<sup>①</sup> College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

<sup>②</sup> College of Animal Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** We report the effects of candidate gene 5-HT<sub>1A</sub> Receptor (5-HT<sub>1A</sub>R) gene on self biting of American Mink (*Mustela vison*) in this paper. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor gene were identified and genotyped by polymerase chain reaction followed by single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis. Correlation analysis between 5-HT<sub>1A</sub>R polymorphisms and self biting behavior was carried out using Chi square test. Results show that the genotypes of 5-HT<sub>1A</sub>R gene at nucleotide 136(T-G) have no effect on self biting ( $\chi^2 = 1.3936, P > 0.2$ ), and that the genotypes of 5-HT<sub>1A</sub>R gene at nucleotide 287(G-G) have an effect on self biting ( $\chi^2 = 3.7694, P < 0.2$ ).

**Key words:** American Mink (*Mustela vison*); 5-HT<sub>1A</sub> Receptor gene; Self biting behavior; PCR-SSCP

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是神经系统的重要神经递质,具有多种生理功能,如运动调节、伤害性感受与调控、情绪控制、摄食及睡眠等<sup>\*\*</sup>。5-HT复杂的生物学作用是通过特异性的5-HT受体实现的。5-HT受体分型复杂,迄今为止已发现7个类型14种亚型。其中,5-HT<sub>1A</sub>受体是哺乳类动物脑中表达最多的亚型之一。5-HT<sub>1A</sub>受体体内无内含子基因编码。5-HT<sub>1A</sub>

受体是5-HT系统神经传递的重要调节因素。

\* 通讯作者, E-mail: bxj630306@163.com;

第一作者介绍 林宁,女,硕士研究生;研究方向:动物学; E-mail: linning111@yahoo.cn.

\*\* 朱敏. 5-羟色胺受体亚型在大鼠感觉神经节中的分布及其在完全弗氏佐剂致炎后的表达变化. 西安:第四军医大学硕士学位论文, 2001.

收稿日期: 2008-03-19, 修回日期: 2008-09-21

主要分布于额叶皮层、海马、外侧隔中缝背核、脊髓前角等部位<sup>[1]</sup>。自主受体定位于脑中中缝复合体的 5-HT 能神经元的胞体和树突上,它们被 5-HT 或 5-HT<sub>1A</sub> 激动剂激活后可以减少 5-HT 能神经元的放电频率,继而减少神经末梢投射区域 5-HT 的合成、转运及释放<sup>[2]</sup>。已证实,5-HT 系统参与情绪、心境、应激等方面的调节,抑郁疾病及自杀行为的发病机制之一是脑内 5-HT 神经传递减少<sup>[2]</sup>。

美洲黑貂属于哺乳纲食肉目鼬科鼬属中的一种小型珍贵的毛皮动物。在野生状态下,分为美洲黑貂 (*Mustela vison*) 和欧洲水貂 (*M. lutreola*) 两种。现在世界各国人工饲养的水貂均为美洲黑貂的后裔。水貂自咬症是笼养水貂的常见病,一般指的是反复自咬身体某一部位为主要症状的一种水貂疾病,其特征是阵发性神经高度兴奋、狂暴性自咬身体某一部位,造成自咬创<sup>[3]</sup>。因此降低了毛皮质量,给养殖者带来很大的经济损失。本研究以 5-HT<sub>1A</sub> 受体基因作为美洲黑貂自咬行为可能的候选基因,采用 PCR-SSCP 方法对其进行多态性检测,分析其与自咬行为的关系,以期水貂自咬行为的防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 实验所用样品为大兴安岭图强水貂养殖基地提供的美洲黑貂,取其脚趾肌肉组织,共计 223 只,其中健康美洲黑貂 109 只和有自咬行为的美洲黑貂 114 只。

**1.2 试剂** PCR 试剂、*rTaq* 酶、胶回收(小量)试剂盒均购自北京天根生物有限公司。

**1.3 DNA 提取和检测** 将美洲黑貂脚趾肌肉组织用酒精清洗,并用蒸馏水反复冲洗后取约 0.2 g,按酚/氯仿法提取基因组 DNA,并溶于 TE 中, -20℃ 保存。用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法双重检测 DNA 的纯度和浓度,然后稀释成 50 ng/μl,备用。

**1.4 PCR 引物设计** 根据家犬 (*Canis familiaris*) 的 5-HT<sub>1A</sub> 受体基因外显子序列 (Accession Number: AY204570) 设计一对引物。分别以 2 只

有自咬行为的美洲黑貂和 2 只健康美洲黑貂的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,将扩增出的 1 059 bp 的目的片段进行回收,送上海英骏生物技术公司测序。然后将 4 个个体的测序结果用 DNAMAN 软件进行同源性比较,共发现三处突变位点,分别在突变位点两端设计引物,引物序列如下。

5HT<sub>1A</sub>R-1f: 5' ATCTTGGCGCTTGGCCCTC 3',

5HT<sub>1A</sub>R-1r: 5' ATCCGGGGAGCAGAGAAT 3';

5HT<sub>1A</sub>R-2f: 5' TCCCCACTGCCTTGTCT 3',

5HT<sub>1A</sub>R-2r: 5' GACCACGGCTACACTATCTACTC 3';

5HT<sub>1A</sub>R-3f: 5' GGAAGCCAATAAGCCAAGTG 3',

5HT<sub>1A</sub>R-3r: 5' TGGCCAACATCTCATCGG 3'。

**1.5 PCR 扩增** PCR 扩增体系 25 μl, 包含 10 × buffer (含镁离子) 2.5 μl, dNTP (10 mmol/L) 2.0 μl, 上下游引物 (10 pmol/L) 各 1 μl, *rTaq* 聚合酶 1 U, DNA 模板 100 ng, 灭菌水补足。同时设立一个不加模板的阴性对照。扩增反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行。引物 5HT<sub>1A</sub>R-1 扩增程序是: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s, 61.1℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 35 s, 循环 35 次; 再 72℃ 延伸 8 min。引物 5HT<sub>1A</sub>R-2 和引物 5HT<sub>1A</sub>R-3 PCR 反应条件除退火温度分别为 61.7℃、59.2℃ 外,其余反应条件与引物 5HT<sub>1A</sub>R-1 相同。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,凝胶成像系统分析检测扩增结果。

**1.6 PCR 产物的 SSCP 分析** 2 μl 的 PCR 产物与 6 μl 的变性 buffer (98% 去离子甲酰胺, 10% 甘油, 10 mmol/L EDTA, 0.025% 二甲苯青, 0.025% 溴酚蓝) 混匀, 98℃ 变性 10 min, 迅速冰浴 10 min, 在 16% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯酰胺: N,N'-亚甲双丙烯酰胺 = 29: 1) 电泳 18 ~ 20 h。硝酸银染色后在凝胶成像系统中拍照, 保鲜膜封好, 4℃ 保存。

**1.7 统计模型与分析** 根据测序结果, 利用 DNAMAN 软件进行序列拼接, 同时根据 SSCP 分析结果利用 SAS (6.12 版) 软件进行数据处理, Chi square 检验用于基因型与自咬行为的显著性分析。

## 2 结果与分析

**2.1 PCR 扩增结果** 以美洲黑貂的基因组 DNA 为模板与所设计的引物 5HT<sub>1A</sub>R-1、5HT<sub>1A</sub>R-2 和 5HT<sub>1A</sub>R-3 进行 PCR 扩增, PCR 产物用 1% 琼脂糖胶检测, 结果发现特异性扩增良好, 片段长度与预期的片段大小一致 (235 bp、247 bp、288 bp), 因此可以用来进行 SSCP 分析, 结果见图 1~ 3。

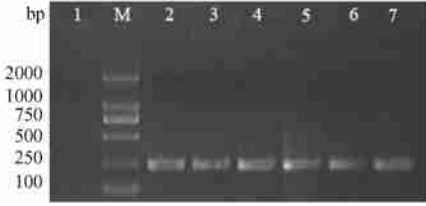


图 1 引物 5HT<sub>1A</sub>R 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR results of primer 5HT<sub>1A</sub>R 1

1: 阴性对照; M: DL 2000 DNA 分子量标准;  
2~ 7: PCR 扩增产物。

1: Control; M: DL 2000 DNA marker; 2- 7: PCR product.

### 2.2 SSCP 检测结果与分析

**2.2.1 引物 5HT<sub>1A</sub>R-1 多态性分析结果** 将所测 4 个个体的序列用 DNAMAN 进行同源性比较, 发现在 136 位点处发生了 (T → G) 颠换 (图 4), 此突变位点引起氨基酸的变化 (Val → Gly),

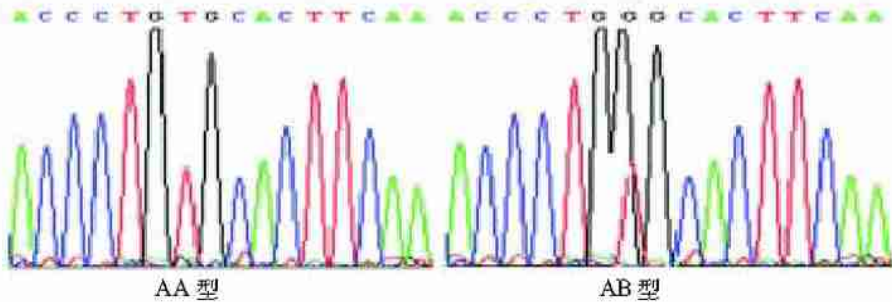


图 4 AA 和 AB 基因型在 136 位点处的测序结果

Fig. 4 The sequence results of AA and AB genotypes at nucleotide 136

**2.2.2 引物 5HT<sub>1A</sub>R-2 多态性分析结果** 将所测 4 个个体的序列用 DNAMAN 进行同源性比



图 2 引物 5HT<sub>1A</sub>R 2 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR results of primer 5HT<sub>1A</sub>R 2

1: 阴性对照; M: DL 2000 DNA 分子量标准;  
2~ 7: PCR 扩增产物。

1: Control; M: DL 2000 DNA marker; 2- 7: PCR product.

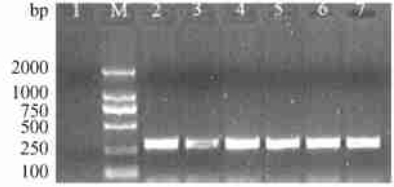


图 3 引物 5HT<sub>1A</sub>R 3 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR results of primer 5HT<sub>1A</sub>R 3

1: 阴性对照; M: DL 2000 DNA 分子量标准;  
2~ 7: PCR 扩增产物。

1: Control; M: DL 2000 DNA marker; 2- 7: PCR product.

属于错义突变。引物 5HT<sub>1A</sub>R-1 正是针对此突变位点设计的。PCR 产物经浓度为 16% 的聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳, 银染后在不同个体中只检测到 2 种基因型: AA、AB 型 (图 5)。

较, 发现在 287 位点发生了 (C → G) 颠换 (图 6), 此突变位点并没有引起氨基酸的变化 (Arg), 属

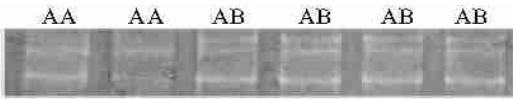


图 5 不同个体的 SSCP 结果(5HT<sub>1A</sub>R 1)

Fig. 5 SSCP analysis on PCR amplification with 5HT<sub>1A</sub>R 1 in different individuals

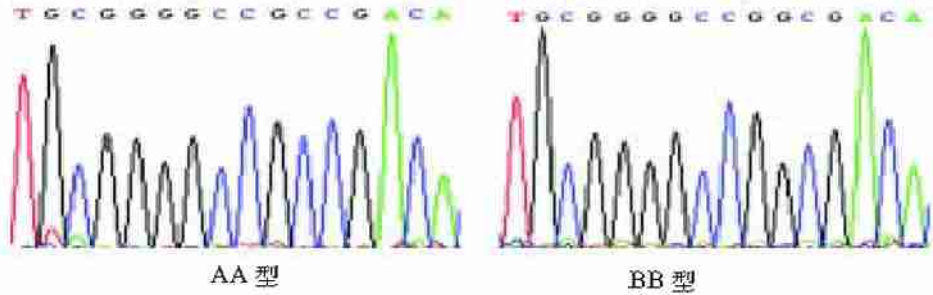


图 6 AA 和 BB 基因型在 287 位点处的测序结果

Fig. 6 The sequence results of AA and BB genotypes at nucleotide 287

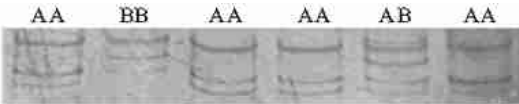


图 7 不同个体的 SSCP 结果(5HT<sub>1A</sub>R 2)

Fig. 7 SSCP analysis on PCR amplification with 5HT<sub>1A</sub>R 2 in different individuals

### 2.2.3 引物 5HT<sub>1A</sub>R-3 多态性分析结果 将所

于沉默突变。引物 5HT<sub>1A</sub>R-2 正是针对此突变位点设计的。PCR 产物经 16% 浓度的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,银染后在不同个体中检测到 3 种基因型: AA、AB 和 BB 型(图 7)。

测 4 个个体的序列用 DNAMAN 进行同源性比较,发现在 792 位点处发生了(A → T)颠换(图 8),此突变位点引起氨基酸的变化(Gln → His),属于错义突变。引物 5HT<sub>1A</sub>R-3 正是针对此突变位点设计的。PCR 产物经 16% 浓度的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,结果在不同个体中未检测到多态(图 9)。

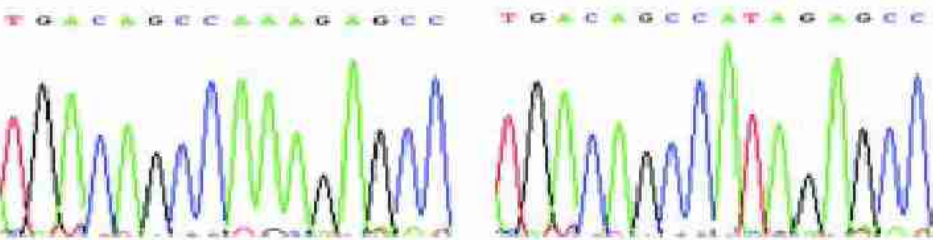


图 8 在 792 位点处的测序结果

Fig. 8 The sequence results of nucleotide 792



图 9 不同个体的 SSCP 结果(5HT<sub>1A</sub>R 3)

Fig. 9 SSCP analysis on PCR amplification with 5HT<sub>1A</sub>R 3 in different individuals

2.3 美洲黑貂 5-HT<sub>1A</sub>受体基因多态位点的基因型分布频率和等位基因分布频率 分别计算 5-HT<sub>1A</sub>受体基因 136 位点和 287 位点处 A 与 B 等位基因在美洲黑貂群体中的基因型频率和等位基因频率,统计结果见表 1 和表 2。结果表明,在该群体中 136 位点处 A 等位基因的频率

均高于 B 等位基因, AB 型的基因型频率均高于 AA 型的基因型频率。在该群体中 287 位点处

A 等位基因的频率均高于 B 等位基因, AA 型的基因型频率均高于 BB 型的基因型频率。

表 1 5-HT<sub>1A</sub>受体基因 136 位点处的基因型和等位基因分布频率

Table 1 Genotype and allele frequencies of 5HT<sub>1A</sub> receptor gene at nucleotide 136

组别 Groups	样本数 Animal number	基因型 Genotype			等位基因 Allele	
		AA	AB	BB	A	B
自咬组 Self biting group	114	0.087 7 (10)	0.912 3 (104)		0.543 9	0.456 1
健康组 Control group	109	0.137 6 (15)	0.862 4 (94)		0.568 8	0.431 2

括号内是检测个体数。Number of individuals.

表 2 5-HT<sub>1A</sub>受体基因 287 位点处的基因型和等位基因分布频率

Table 2 Genotype and allele frequencies of 5HT<sub>1A</sub> receptor gene at nucleotide 287

组别 Groups	样本数 Animal Number	基因型 Genotype			等位基因 Allele	
		AA	AB	BB	A	B
自咬组 Self biting group	114	0.543 9 (62)	0.201 7 (23)	0.254 4 (29)	0.644 8	0.355 3
健康组 Control group	109	0.669 7 (73)	0.156 0 (17)	0.174 3 (19)	0.747 7	0.252 3

括号内是检测个体数。Number of individuals.

**2.4 美洲黑貂 5-HT<sub>1A</sub>受体基因多态性与美洲黑貂自咬行为的相关分析** 以大兴安岭地区图强水貂养殖基地的美洲黑貂为实验群体, 分别对美洲黑貂 5-HT<sub>1A</sub>受体基因突变导致的基因型多态性在美洲黑貂群体中与自咬行为性状作相关性分析, 结果发现 5-HT<sub>1A</sub>受体基因 136 位点发生的碱基突变(T→G)导致的 2 种基因型对美洲黑貂自咬行为性状无影响( $\chi^2 = 1.393 6, P > 0.2$ ), 两组间等位基因分布频率比较, 差异不显著( $\chi^2 = 0.140 5, P > 0.2$ )。在 287 位点发生的突变(G→G)导致的 3 种基因型对美洲黑貂的自咬行为有一定的影响( $\chi^2 = 3.769 4, P < 0.2$ ), 两组间等位基因分布频率有差异( $\chi^2 = 2.787 5, P = 0.095$ )。自咬组与健康组 5-HT<sub>1A</sub>受体基因多态性比较见表 1、2。

### 3 讨论

5-HT 代谢异常可能与精神分裂症、偏头痛、抑郁、自杀行为、小儿孤独症、帕金森病、癫痫及阿尔茨海默病(AD)等神经系统疾病密切相关<sup>[4]</sup>。本研究以美洲黑貂为实验群体, 选用 5-HT<sub>1A</sub>受体基因作为美洲黑貂自咬行为可能的

候选基因, 采用 PCR-SSCP 方法分析了该基因部分片段单核苷酸位点的突变, 扩增片段的测序结果发现三处突变位点。C287G 位点的 SNPs 对美洲黑貂的自咬行为有一定的影响。5-HT<sub>1A</sub>受体是 5-HT 系统神经传递的重要调节因子。几种抗抑郁药物能够使 5-HT<sub>1A</sub>自主受体脱敏, 从而加强 5-HT 神经传递, 正电子发射断层扫描术(PET)显示, 在情感和恐惧紊乱病人的前脑区域和中缝核, 与配体结合的 5-HT<sub>1A</sub>受体数量有一定程度的下降<sup>[5,6]</sup>。尸检中发现, 抑郁自杀患者脑内中缝核 5-HT<sub>1A</sub>自主受体密度增加, 而皮质、海马等前脑区域内的突触后位点则无此现象, 由此导致抑郁患者脑内 5-HT 能神经元活性显著降低<sup>[7]</sup>。有研究表明, 5-HT<sub>1A</sub>受体基因多态性与抑郁症等精神疾病密切相关<sup>[8]</sup>。Huang 等<sup>[9]</sup>对 5-HT<sub>1A</sub>受体 C(-1019)G 基因多态性与前脑 5-HT<sub>1A</sub>受体配体结合的病理生理学进行了研究, 发现在大规模的精神病人样本中, C(-1019)G 基因多态性与精神分裂症及物质应用障碍显著相关。本实验结果表明, C287G 位点的(C→G)突变对美洲黑貂的自咬行为有一定的影响, 值得进一步深入研究。

在 T136G 突变位点处只检测到 2 种基因型 (AA、AB)。得出这样结果的原因可能有以下几点: ①本研究只检测了美洲黑貂群体, 检测的结果有一定的局限性, 因而再进一步扩大样本量检测是否存在 BB 型, 或在其他水貂品种中是否存在 BB 型个体, 还有待于在以后的研究中进一步验证。②由于所采集的美洲黑貂样本都是人工选育的商品貂种, 在以往的选育中, 在对自咬性状或是其他经济性状进行选择时, 可能将另一种纯合型个体淘汰掉了。③可能是纯显性致死基因, 通常基因除了影响一个生物体的可见性状外, 还可能影响它的成活力。带有纯显性致死基因的动物, 通过有缺陷的生理生化功能而处于不利的境地, 有些基因的效应甚至严重到使生物体不能存活的程度。

在 A 792T 突变位点未检测到基因型多态性。分析出现这种结果的原因可能是与实验群体有关。由于本研究只检测了美洲黑貂群体, 且实验群体中被测美洲黑貂个体数目较少, 使在这部分序列中可能存在的 SNPs 未被检出。

对美洲黑貂 5-HT<sub>1A</sub> 受体基因突变导致的基因型多态性与美洲黑貂自咬行为做相关性分析, 结果表明, C287G 突变位点对美洲黑貂的自咬行为有一定的影响 ( $P < 0.2$ )。在生物学实验统计中, 通常将 0.05 定义为显著水平。但有时在对实验要求不太严格或难以获得较大样本等情况时, 可以适当将这一标准放宽, 这样做的目的是尽可能避免把那些实际上对目标性状有显著影响而一次实验未能达到  $P < 0.05$  显著的基因错误地排除掉<sup>[10]</sup>。由于美洲黑貂属于珍贵的毛皮动物, 要想获得大量的样本存在一定的困难。因此在本实验中我们把  $P < 0.2$  定

义为有影响。

据报道, 影响水貂自咬行为的因素很多, 目前尚无定论。本研究以 5-HT<sub>1A</sub> 受体基因作为美洲黑貂自咬行为可能的候选基因, 分析其与自咬行为的关系, 也只是初步的探索。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 李冠军, 王慧芳, 李华芳. 5-HT<sub>1A</sub> 受体的作用及其临床意义. *四川精神卫生*, 2006, **19**(3): 188~ 191.
- [ 2 ] 李宁, 张建军, 陈虹. 5-HT<sub>1A</sub> 受体 C(-1019)G 基因多态性与抑郁症相关性研究进展. *国外医学药学分册*, 2006, **33**(3): 187~ 189.
- [ 3 ] 高宏伟, 维岩, 振凯. 水貂自咬症研究概况. *毛皮动物饲养*, 1995, (3): 41~ 44.
- [ 4 ] 于凌慧, 王泽剑, 殷明. 5-羟色胺及其受体与阿尔茨海默病的关系. *药学服务与研究*, 2007, **7**(1): 37~ 40.
- [ 5 ] Drevets W C, Frank E, Price J C. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Boil Psychiatry*, 1999, **46**(10): 1375~ 1387.
- [ 6 ] Sargent P A, Bench C J. Brain serotonin 1A receptor binding measured by positron emission tomography with [<sup>11</sup>C] WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry*, 2000, **57**(2): 174~ 180.
- [ 7 ] Stockmeier C A, Shapiro L A, Dilley G E. Increase in serotonin 1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression: postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci*, 1998, **18**(18): 7394~ 7401.
- [ 8 ] Anias B, Arias M J, Gastó C, *et al.* Analysis of structural polymorphisms and C-1018G promoter variant of the 5HT<sub>1A</sub> receptor gene as putative risk factors in major depression. *Mol Psychiatry*, 2002, **7**(9): 930~ 932.
- [ 9 ] Huang Y Y, Battistuzzi C, Oquendo M A. Human 5HT<sub>1A</sub> receptor C(-1019)G polymorphism and psychopathology. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2004, **7**(4): 441~ 451.
- [ 10 ] 杜智恒, 白秀娟. 梅花鹿生长激素基因单核苷酸多态与产茸量性状的相关性. *遗传*, 2007, **29**(3): 337~ 342.