

文章编号: 1674-5566(2025)01-0135-11

DOI: 10.12024/jsou.20240604573

打斗失败经历通过血清素通路对中华绒螯蟹焦虑样行为的影响

张颖^{1,2}, 雷金沅^{1,2}, 成永旭^{1,2}, 杨筱珍^{1,2}

(1. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 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: 在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)养殖过程中, 普遍存在着打斗现象, 为探究打斗失败经历带来的不良影响, 观察了经历打斗失败后中华绒螯蟹的焦虑样行为和摄食行为, 并检测了血清素(5-HT)水平和血清素7型受体(5-HT_{7R})基因相对表达水平的变化。随后观察外源性血清素、氟西汀、血清素7型受体激动剂和拮抗剂处理对中华绒螯蟹焦虑样行为的影响。研究结果显示, 经历过打斗失败的中华绒螯蟹会表现出焦虑样行为, 并伴随着血浆血清素浓度的升高和胸神经节血清素7型受体基因相对表达水平的下调, 且打斗失败后中华绒螯蟹摄食量减少。通过外源性血清素处理促进了中华绒螯蟹的焦虑样行为, 而氟西汀处理则减轻了中华绒螯蟹的焦虑样行为。此外, 血清素7型受体激动剂(AS19)处理促进了中华绒螯蟹的焦虑样行为, 而拮抗剂(SB-269970)处理则减轻了中华绒螯蟹的焦虑样行为。以上结果说明, 打斗失败经历会诱导中华绒螯蟹产生焦虑样行为和食欲减退, 并且通过血清素途径影响焦虑样行为。本研究揭示了打斗失败经历带来的潜在负面影响, 为促进中华绒螯蟹的健康养殖提供理论依据。

关键词: 中华绒螯蟹; 焦虑样行为; 血清素; 血清素7型受体

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

当动物在处于危险环境时会表现出应激反应, 并产生恐惧。如果压力延长, 动物对周围环境的持续恐惧也会延长, 即使在没有压力源的新环境中, 动物也保持恐惧, 这种高度警惕的状态被称为焦虑^[1]。克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 在暴露于压力后表现出与环境无关的焦虑样行为, 首次将焦虑的概念扩展到甲壳类动物^[2]。此外, 具疣新树妖蟹(*Neohelice granulata*)也表现出由厌恶记忆诱导的焦虑样行为^[3]。社会互动是动物压力的主要来源, 包括打斗行为和社会孤立^[4]。打斗行为是一种普遍存在于从昆虫到灵长类动物的社会行为^[5]。攻击性互动可能是深层社会压力的来源, 并导致受害者的广泛性焦虑^[6]。此外, 大量研究将情绪状态与进食行为联系起来^[7], 强烈的紧张会抑制进食^[8], 例如“悲观”的棕鸟(*Sturnus vulgaris*)会缺乏探索奖励食物的动力^[9]。

摄食行为是动物获取营养的主要途径^[10], 影响着中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的生长发育^[11], 因此中华绒螯蟹的焦虑样行为有待深入研究。

血清素, 即5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT), 既是一种神经激素, 也是一种神经递质。单胺能系统通常参与协调应激反应, 血清素与动物的恐惧和焦虑反应有关^[2, 12], 血清素系统广泛地参与了几种社会应激反应, 包括攻击和焦虑样行为^[13]。在哺乳动物中, 血清素系统被激活是对社会压力的反应, 对血清素及其代谢物5-羟基吲哚乙酸(5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA)组织浓度的检测显示, 在从属者大鼠(*Rattus norvegicus*)和小鼠(*Mus musculus*)的各个脑区, 5-HIAA浓度升高和/或5-HIAA/5-HT增加, 表明血清素能使系统活性增加^[14-17]。不仅如此, 被打败的成年金仓鼠(*Mesocricetus*)外侧隔和下丘脑前部

收稿日期: 2024-06-08

修回日期: 2024-07-16

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFD2401902); 国家自然科学基金(41876190); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-48); 上海市科委水产养殖工程研究平台项目(19DZ2284300); 黄河三角洲行业领军人才项目(DYRC20190210)

作者简介: 张颖(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为甲壳动物行为生理。E-mail: 1163934992@qq.com

通信作者: 杨筱珍, E-mail: zny119@163.com

版权所有 © 《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

的血清素内化增加^[17],表明失败导致这些区域释放血清素的能力增加。反复经历攻击或失败会导致血清素系统活性的变化,经历了长期失败的雄性小鼠表现出血清素代谢产物即5-HIAA的水平增加^[18-19]。此外,血清素的突触前和突触后受体和转运体都被社会压力所改变^[14,20]。在甲壳动物中,同样存在血清素参与调控社交压力诱发的焦虑样行为。有研究表明,打斗结束后来自胜利者的骚扰行为会引起失败克氏原螯虾的焦虑样行为,并伴随着脑血清素浓度的增大而增加。在哺乳动物中血清素受体至少包括7个亚族(血清素1型受体到血清素7型受体)和14个亚型^[21],其中,多数血清素受体为G蛋白偶联受体,血清素3型受体为配体离子通道^[22-23]。血清素受体的多样性与复杂的神经系统功能相关联。在甲壳动物中,已知的血清素受体还不多,有研究^[21]表明,克氏原螯虾的大脑存在血清素1A型受体和血清素1B型受体的表达。在罗氏沼虾的中枢神经系统中克隆出血清素1型受体和血清素2型受体的全长序列^[24]。在中华绒螯蟹中,也克隆出血清素2B型受体和血清素7型受体基因全长序列,血清素7型受体在中华绒螯蟹胸神经表达水平较高^[25-26]。血清素多种受体都参与焦虑样反应,可根据亚型使用激动剂和拮抗剂调节焦虑样行为。其中血清素7型受体拮抗剂SB-269970表现出抗抑郁和抗焦虑活性^[27]。

打斗行为是中华绒螯蟹养殖过程中常见的现象,会导致中华绒螯蟹断肢甚至死亡,目前未有研究报道关于中华绒螯蟹打斗行为引发的负面情绪影响。本研究探讨了打斗失败经历是否会诱发中华绒螯蟹的焦虑样行为,并评估其对中华绒螯蟹摄食行为产生的影响,揭示了打斗失败经历对中华绒螯蟹生长发育带来的潜在负面影响。不仅如此,由于血清素系统遗传同源性普遍保守,本研究通过测定中华绒螯蟹经历打斗失败后血浆血清素浓度及其胸神经节血清素7型受体基因相对表达水平的变化,旨在探究血清素通路在中华绒螯蟹焦虑样行为的调控中发挥的作用。随后通过观察外源性血清素、氟西汀、血清素7型受体激动剂(AS19)和拮抗剂(SB-269970)处理后中华绒螯蟹的焦虑样行为,进一步明晰打斗失败经历通过血清素通路影响中华绒螯蟹焦虑样行为的潜在分子机制,以期中华绒螯蟹健康养

殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

研究所用健康中华绒螯蟹雄蟹购自上海海洋大学崇明岛基地,体质量为 (25.0 ± 5.0) g。所有中华绒螯蟹在长 \times 宽 \times 高为 $150.0 \text{ cm} \times 60.0 \text{ cm} \times 25.0 \text{ cm}$ 的池中暂养7 d,水深约12.0 cm。然后,每只蟹分别转移至不透明的白色亚克力桶(直径 $30.0 \text{ cm} \times$ 高 34.0 cm)中,在单一饲养条件下养殖7 d,以消除中华绒螯蟹以往的社会经验。养殖期间保持温度为 $19 \sim 21 \text{ }^\circ\text{C}$,pH: $7.3 \sim 7.8$,溶解氧浓度为 $7.5 \sim 8.0 \text{ mg/L}$ 。每天16:00—18:00投喂1次颗粒饲料,投喂量约为体质量的3%。每天18:00定时饲喂饲料,第二天上午8:00利用虹吸法吸取多余饲料,并更换水体。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 打斗失败经历

实验分为对照组和失败经历处理组(失败组),失败组由12对体质量差异小于5%的蟹组成,对照组由12只体质量相近的蟹组成。实验过程中,失败组的每对蟹被放置在用不透明隔板隔开的白色亚克力桶(直径 $40.0 \text{ cm} \times$ 高度 40.0 cm)两侧(图1a),水深约为20.0 cm,使两只蟹不相互接触,10 min后将隔板取出,使用高清摄像机(H.265, TP-LINK)观察组内蟹在1 h内的打斗情况,以区分出每对蟹中的失败者,用于后续实验。对照组不进行打斗处理,每个桶随机放置1只蟹,10 min后取出隔板,1 h后,将蟹取出用于后续实验。

参考FOSSAT等^[2]在克氏原螯虾行为研究所用的十字迷宫,构建如图1b装置,十字迷宫(总尺寸 $80.0 \text{ cm} \times 80.0 \text{ cm}$)包括两个暗臂(光照强度为10 lx)和两个光臂(光照强度为50 lx),每个臂长 35.0 cm ,宽 20.0 cm ,过渡区四周有不透明隔板。实验过程中,将每只蟹放置在过渡区1 min,然后移出过渡区所有不透明的塑料隔板,使用高清摄像机(H.265, TP-LINK)记录每只蟹在20 min内的行为。实验结束后,对录制的视频进行分析,记录以下指标:(1)进入暗臂的时间;(2)进入暗臂的次数;(3)第一次进入暗臂的潜伏期。

1.3 打斗失败经历对摄食行为的影响

参照 CHEN 等^[10]的研究,构建如图 1c 的装置,观察中华绒螯蟹摄食行为。实验分为对照组和失败组,每组重复 12 只蟹。所有蟹被分别转移到 1 个不透明的桶(40.0 cm 直径 × 40.0 cm 高)中,并放置在隔板的一侧。同时,精确称量 5.0 g 商品颗粒饲料,放置在隔板的另一侧,10 min 后

取出隔板,用高清摄像机(H.265, TP-LINK)记录 1 h 内蟹的摄食情况,实验过程中光照强度为 10 lx。最后收集饲料残渣,计算取食量(g)=饲料初质量-饲料残渣质量。对录制的视频进行分析,观看录像并记录以下指标:(1)摄食反应时间;(2)摄食次数;(3)摄食时间。

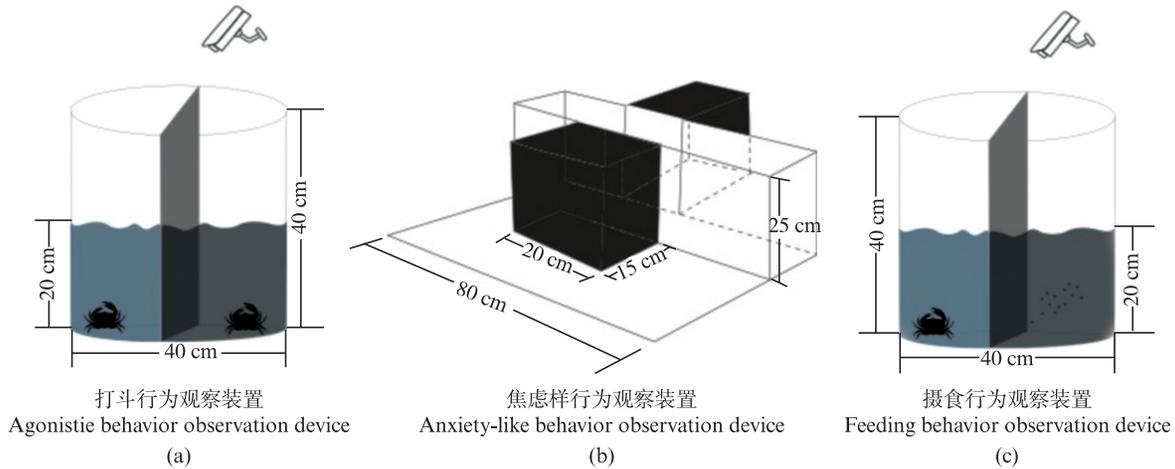


图 1 行为观察装置
Fig. 1 Behavior observation device

1.4 血清素浓度和血清素 7 型受体基因相对表达水平的分析

实验分为对照组和失败组,每组重复 6 只蟹。焦虑样行为观察结束后,使用一次性 1 mL 无菌注射器从所有实验用蟹的第三步足基部抽取血淋巴后,将血淋巴立即与抗凝剂 1:1 混合,12 000 r/min,4 °C,离心 10 min,吸取上清液(即血浆)转移至新的 1.5 mL 无酶管,使用 ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司)测定血浆中血清素的浓度。取出所有实验用蟹的胸神经节用于测定血清素 7 型受体基因表达水平。所有样品均于 -80 °C 冰箱保存至使用。

使用 TRIzol 法对胸神经节样本进行 RNA 的提取,使用 HiScript[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)对 RNA 进行反转录生成 cDNA,根据已报道的相关基因序列设计引物(表 1)用于荧光定量 PCR 检测。SYBR[®] PCR Kit(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)用于荧光定量 PCR 反应,反应条件:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 34 s,40 个循环;95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s。基于 2^{-ΔΔC_t}方法,分析基因的相对表达水平。

表 1 分析血清素 7 型受体基因相对表达水平的 RT-qPCR 引物

Tab. 1 Primers selected to evaluate 5-HT₇R relative expression levels with RT-qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5' - 3')
18S-F	TCCAGTTCGCAGCTTCTTCTT
18S-R	AACATCTAAGGGCATCACAGA
5-HT ₇ -F	ATCATTATGAGCGCTTCGT
5-HT ₇ -R	AGGCACAGAGTCTCTCGAA

1.5 外源性血清素处理

实验分为对照组和外源性血清素处理组(血清素组),每组重复 12 只蟹。注射开始前将血清素盐酸盐(Sigma, 美国)充分溶解于中华绒螯蟹生理盐水中,浓度为 5.0 μg/μL,现配现用,注射量为 1.0 μL/g;对照组直接注射不含任何药物的中华绒螯蟹生理盐水,注射量为 1.0 μL/g。注射后按照 1.2 节的方法,将蟹转移至十字迷宫中观察焦虑样行为。观察结束后采集所有实验用蟹的胸神经节测定胸神经节中血清素 7 型受体基因的相对表达水平,方法参照 1.4 节,所有样品均于 -80 °C 冰箱保存至使用。

1.6 氟西汀处理

实验分为对照组和氟西汀组,每组重复 12 只蟹。将氟西汀盐酸盐(Sigma, 美国)充分溶解于中华绒螯蟹生理盐水中,浓度为 $5.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 现配现用,注射量为 $1.0 \mu\text{L}/\text{g}$; 对照组直接注射不含任何药物的中华绒螯蟹生理盐水,注射量为 $1.0 \mu\text{L}/\text{g}$ 。注射后将中华绒螯蟹放回单独饲养用的白色亚克力桶中,24 h 后,按照 1.2 节的方法,将蟹转移至十字迷宫中观察焦虑样行为。观察结束后采集蟹的血淋巴和胸神经节测定血清素浓度以及血清素 7 型受体基因相对表达水平,参照 1.4 节方法,所有样品均于 -80°C 冰箱保存至使用。

1.7 血清素 7 型受体基因激动剂 AS19、拮抗剂 SB-269970 处理

实验分为对照组、AS19 组和 SB-269970 组,每组重复 6 只蟹。将 SB-269970(Sigma, 美国)、AS19(Sigma, 美国)先加入 DMSO 溶解,再使用中华绒螯蟹生理盐水稀释至浓度为 $10^{-7} \text{mol}/\mu\text{L}$, 对照组在生理盐水中加入等量的 DMSO,注射量为 $10 \mu\text{L}$ 每只。处理 24 h 后取胸神经节,测定胸神经节血清素 7 型受体基因的相对表达水平,以确定 AS19 和 SB-269970 的有效性,参照 1.4 节方法,所有组织均于 -80°C 冰箱保存至使用。

确认 AS19 和 SB-269970 有效后,按照同样的方法对中华绒螯蟹进行药物处理后观察受对

焦虑样行为的影响。每组重复 12 只蟹,处理 24 h 后,按照 1.2 节方法,将蟹转移至十字迷宫中观察焦虑样行为。

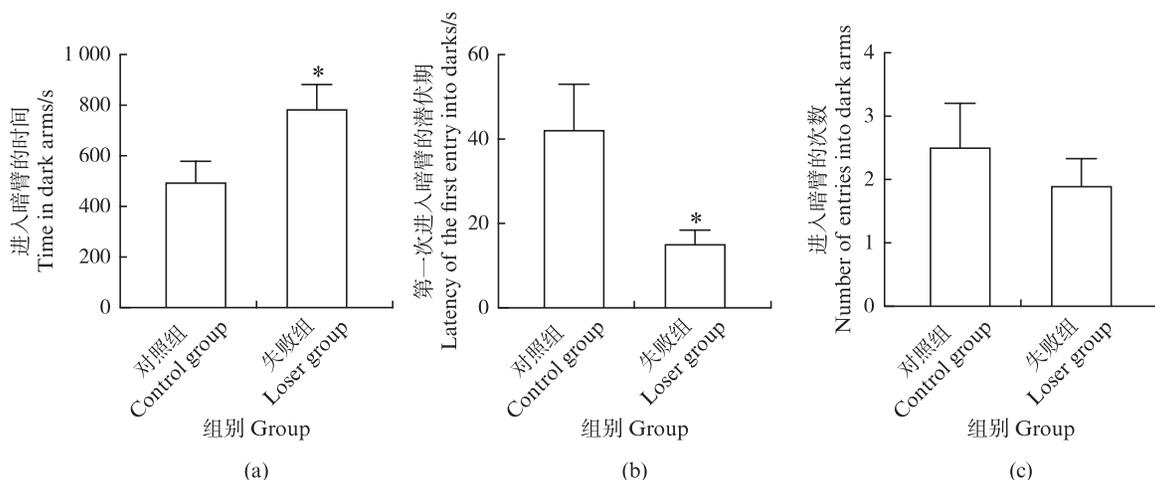
1.8 数据分析

行为数据用平均值 \pm 标准误表示,血清素浓度和血清素 7 型受体基因相对表达水平用平均值 \pm 标准差表示。分析前,所有数据均采用 F 检验进行方差齐性检验。两组间比较采用独立样本 T 检验。根据 F 值,如果满足正态分布和均方差条件,则采用假设等方差下的 P 值。如果条件不满足,则采用不假设等方差下的 P 值。采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 打斗失败经历诱发中华绒螯蟹的焦虑样行为

与未经历过打斗失败的对照组相比,失败组蟹进入暗臂的时间显著增加 ($F=1.346, P < 0.05$, 图 2a), 且第一次进入暗臂的潜伏期显著缩短 ($F=10.67, P < 0.05$, 图 2b), 而进入暗臂的次数无显著差异 ($F=2.633, P > 0.05$, 图 2c)。以上结果显示,失败组蟹表现出对黑暗环境偏好的增加,即失败组蟹表现出焦虑样行为,表明打斗失败经历会诱发中华绒螯蟹的焦虑样行为。



* 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

* indicates a significant difference ($P < 0.05$).

图 2 打斗失败经历对中华绒螯蟹焦虑样行为的影响

Fig. 2 Effects of loser experience on anxiety-like behavior of *E. sinensis*

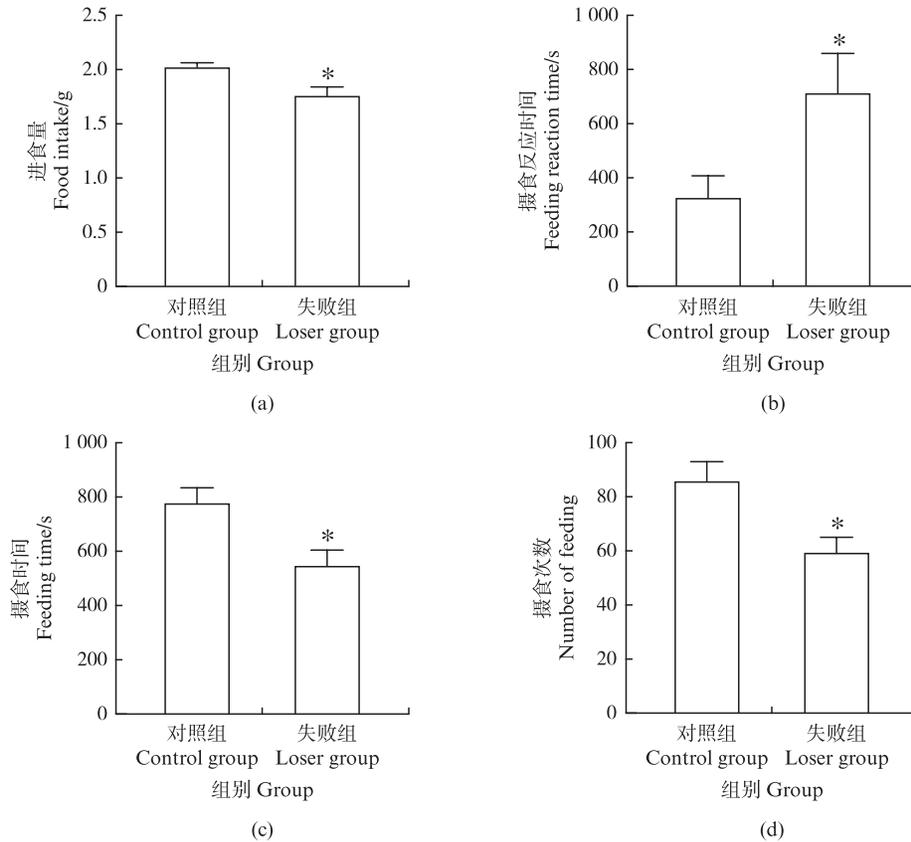
2.2 打斗失败经历使中华绒螯蟹食欲减退

与未经历过打斗失败的对照组相比,失败组

蟹的进食量显著减少 ($F=3.488, P < 0.05$, 图 3a), 摄食反应时间显著增加 ($F=3.193, P < 0.05$, 图

3b)。此外,摄食时间($F=1.109, P<0.05$,图 3c)和摄食次数($F=1.607, P<0.05$,图 3d)显著减少。以

上结果说明打斗失败经历使得中华绒螯蟹摄食行为减少,食欲减退。



* 表示差异显著($P<0.05$)。

* indicates a significant difference ($P<0.05$).

图 3 打斗失败经历对中华绒螯蟹摄食行为的影响

Fig. 3 Effects of loser experience on feeding behavior of *E. sinensis*

2.3 打斗失败经历对血清素浓度和血清素 7 型受体基因相对表达水平的影响

与未经历过打斗失败的对照组相比,失败组蟹血浆血清素浓度显著升高($F=8.063, P<0.05$,图 4a),胸神经节血清素 7 型受体基因相对表达水平显著下调($F=1.034, P<0.05$,图 4b),表明血清素通路参与调控中华绒螯蟹的焦虑样行为。

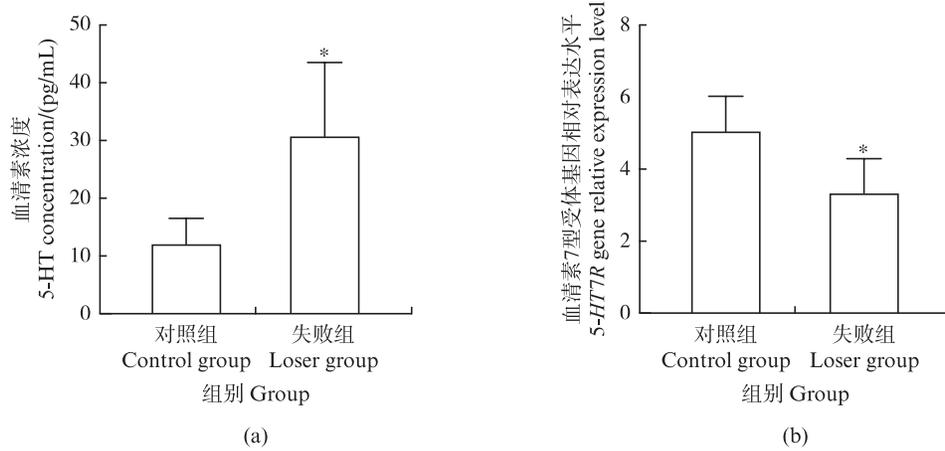
2.4 外源性血清素处理对中华绒螯蟹焦虑样行为、血清素 7 型受体基因相对表达水平的影响

与对照组相比,血清素组蟹进入暗臂时间显著增加($F=1.785, P<0.05$,图 5a),而进入暗臂的次数($F=2.056, P>0.05$,图 5b)以及第一次进入暗臂的潜伏期($F=2.026, P>0.05$,图 5c)均无显著差异。以上结果说明外源性血清素处理增强了中华绒螯蟹对黑暗环境的偏好,即诱导了中华绒螯蟹的焦虑样行为。此外,外源性血清素处理使中

华绒螯蟹胸神经节血清素 7 型受体基因相对表达水平极显著上调($F=2.974, P<0.01$,图 5d)。

2.5 氟西汀处理对中华绒螯蟹焦虑样行为、血清素浓度、血清素 7 型受体基因相对表达水平的影响

与对照组相比,氟西汀组蟹进入暗臂时间显著减少($F=1.056, P<0.05$,图 6a),而进入暗臂的次数($F=1.885, P>0.05$,图 6b)以及第一次进入暗臂的潜伏期($F=1.125, P>0.05$,图 6c)均无显著差异。以上结果说明氟西汀处理减少了中华绒螯蟹对黑暗环境的偏好,即减轻了中华绒螯蟹的焦虑样行为。此外,氟西汀处理使得中华绒螯蟹血浆血清素浓度显著升高($F=4.414, P<0.05$,图 6d),而胸神经节血清素 7 型受体基因相对表达水平显著下调($F=2.687, P<0.05$,图 6e)。

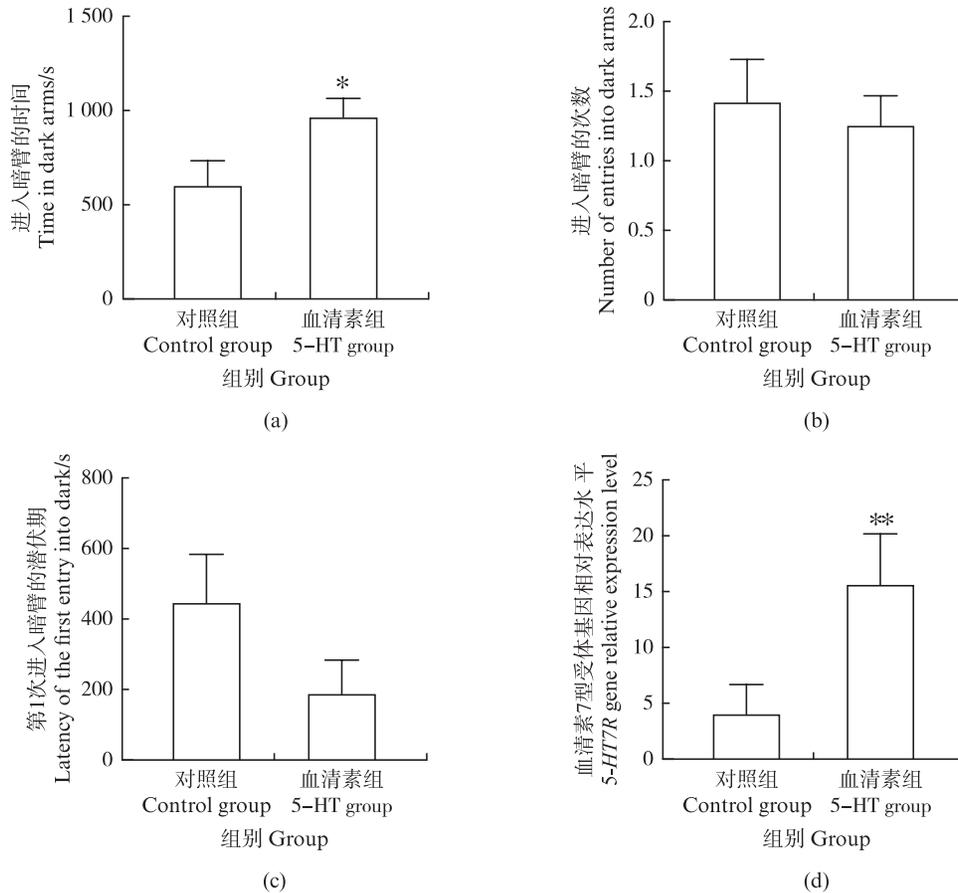


* 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

* indicates a significant difference ($P < 0.05$).

图4 打斗失败经历对中华绒螯蟹血浆血清素浓度、血清素7型受体基因相对表达水平的影响

Fig. 4 Effects of loser experience on plasma 5-HT concentration and 5-HT7R gene relative expression level of *E. sinensis*

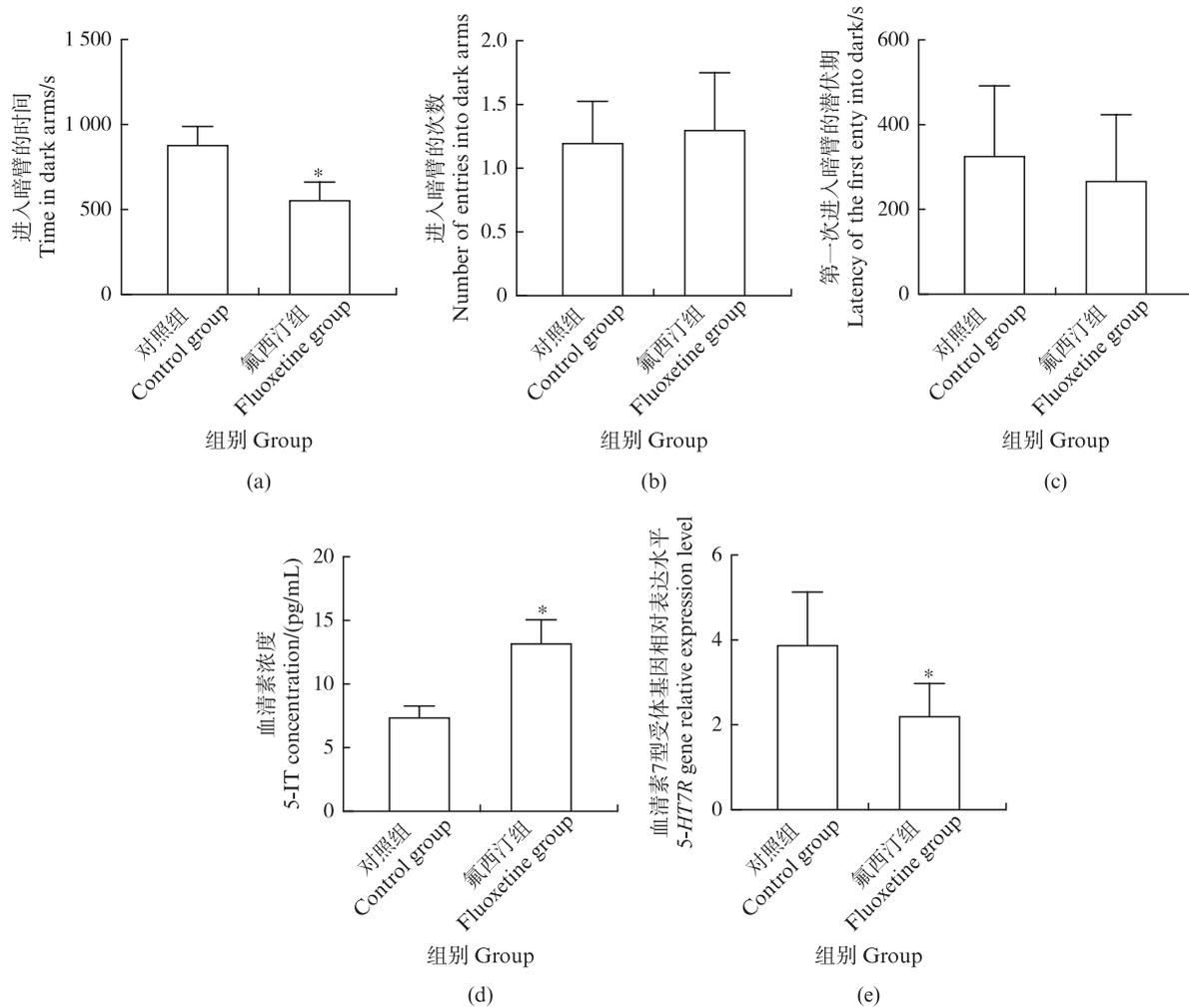


* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

* indicates a significant difference ($P < 0.05$), ** indicates high significant difference ($P < 0.01$).

图5 外源性血清素处理对中华绒螯蟹焦虑样行为、血清素7型受体基因相对表达水平的影响

Fig. 5 Effects of 5-HT treatment on anxiety-like behavior and 5-HT7R gene relative expression level of *E. sinensis*



* 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

* indicates a significant difference ($P < 0.05$).

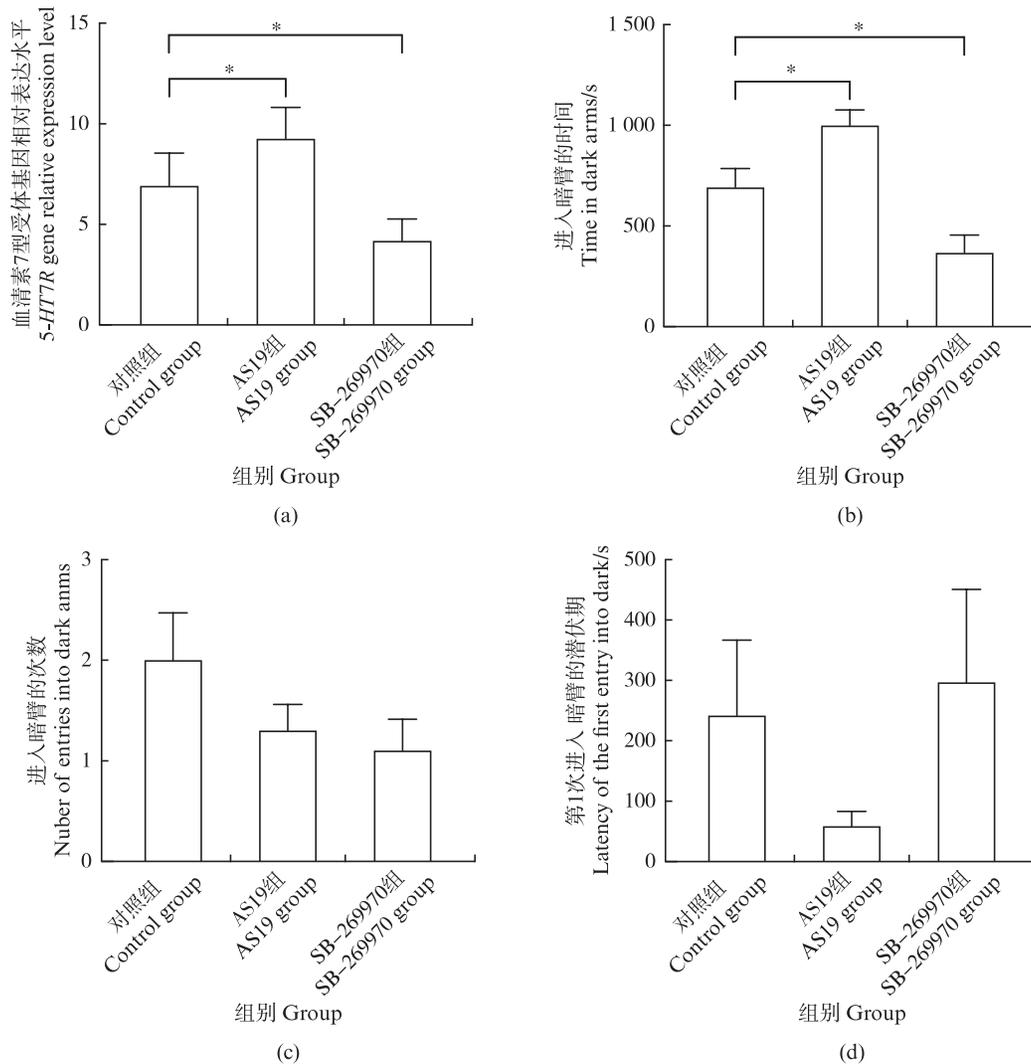
图6 氟西汀处理对中华绒螯蟹焦虑样行为、血浆血清素浓度、胸神经节血清素7型受体基因相对表达水平的影响

Fig. 6 Effects of fluoxetine treatment on anxiety-like behavior, plasma 5-HT concentration and 5-HT7R gene relative level of *E. sinensis*

2.6 血清素7型受体对中华绒螯蟹焦虑样行为的调控作用

与对照组相比,AS19处理使中华绒螯蟹胸神经节血清素7型受体基因相对表达水平显著上调($F=1.075, P < 0.05$,图7a),而SB-269970处理使血清素7型受体基因相对表达水平显著下调($F=2.718, P < 0.05$,图7a)。通过对中华绒螯蟹焦虑样行为观察发现,与未经药物处理的对照组相比,AS19组蟹进入暗臂的时间显著增加($F=1.502, P < 0.05$,图7b),进入暗臂的次数($F=3.279, P >$

0.05,图7c)以及第一次进入暗臂的潜伏期($F=25.84, P > 0.05$,图7d)均无显著差异。SB-269970组蟹则进入暗臂的时间显著降低($F=1.135, P < 0.05$,图7b),进入暗臂的次数($F=2.247, P > 0.05$,图7c)以及第一次进入暗臂的潜伏期($F=1.523, P > 0.05$,图7d)均无显著差异。以上结果说明,血清素7型受体激动剂AS19的处理促进了中华绒螯蟹的焦虑样行为,而拮抗剂SB-269970处理则减轻了中华绒螯蟹的焦虑样行为,表明血清素7型受体参与中华绒螯蟹焦虑样行为的调控。



* 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

* indicates a significant difference ($P < 0.05$).

图7 AS19、SB-269970 处理对中华绒螯蟹血清素7型受体基因相对表达水平、焦虑样行为的影响
Fig. 7 Effects of treatment of AS19 and SB-269970 on 5-HT7R gene relative expression level and anxiety-like behavior of *E. sinensis*

3 讨论

在复杂的社会环境中,动物会根据环境信息调整自己的社会行为。与同种动物的社会互动本身可以作为信息来源,动物根据这些信息调整自身的行为^[28]。竞争环境之外的情绪一直是许多焦虑研究的重点,失败经历已被证明会增加小鼠的焦虑样行为^[29]。本研究证实了打斗失败经验会诱发中华绒螯蟹的焦虑样行为,将焦虑这一概念拓展到中华绒螯蟹中,评估了焦虑样行为在动物界中的普遍性。在焦虑情绪状态下,动物会变得更加“悲观”,因为它们对潜在威胁发生的成本和概率的感知被夸大了^[9]。在一场失败的战斗

后,中华绒螯蟹增加了对黑暗环境的偏好,减少了摄食行为,这可能是因为它们变得更加“悲观”,不愿意冒险探索新环境。作为生态系统中的关键物种,中华绒螯蟹行为变化可能对其所栖息的生态系统产生直接或间接的影响。本研究探索了打斗失败经历对中华绒螯蟹焦虑样行为和摄食行为的影响,后续可对中华绒螯蟹行为变化产生的影响进一步研究。

本研究结果表明经历过打斗失败的中华绒螯蟹血浆血清素浓度显著升高,有研究结果显示来自胜利者的骚扰会引起失败者克氏原螯虾的焦虑样行为并伴随着脑血清素浓度的显著升高^[6],且外源性血清素处理可以使得克氏原螯虾

的焦虑样行为增强^[2],这与本研究结果一致。中华绒螯蟹血浆血清素浓度升高与焦虑样行为的强度相关,焦虑样行为本身就是压力导致的结果,因此这种血清素浓度的升高可能会随着压力的强度和持续时间的增加而增加。后续可进一步研究血清素浓度升高与中华绒螯蟹遭受压力强度的具体关系,从而为血清素参与调控焦虑情绪提供更多的思路。然而,本研究发现通过氟西汀处理使得中华绒螯蟹血浆血清素浓度升高却减轻了中华绒螯蟹的焦虑样行为,这与外源性血清素处理后中华绒螯蟹焦虑样行为增强的实验结果形成了鲜明的对比。氟西汀可选择性阻断 5-HT 再摄取转运体 (Serotonin transporter, SERT), 是一类选择性血清素再摄取抑制剂 (Selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs) 类药物, SSRIs 被认为通过阻断 SERT 从而增加突触内血清素信号的水平来发挥抗抑郁的治疗效果^[30]。一些研究者指出 SSRIs 对血清素系统的作用不同。首先,敲除小鼠的 SERT 会导致大脑中血清素水平的显著减少^[31],这与氟西汀阻断 SERT 从而增加突触间隙中血清素含量的结果不同。其次,对培养的细胞和小鼠脑片的研究表明,氟西汀对许多血清素受体亚型具有高亲和力,并根据所测试的特定受体作为激动剂或拮抗剂,在经过氟西汀处理后的大鼠位于下丘脑的五羟色胺 7 型受体基因相对表达水平下调^[32],在本研究中,氟西汀处理后中华绒螯蟹胸神经节血清素 7 型受体基因相对表达水平下调,与血清素 7 型受体拮抗剂处理后导致中华绒螯蟹焦虑样行为减轻的结果一致。因此,由于目前氟西汀的作用机制尚不清晰,也许还存在通过血清素 7 型受体或其他受体途径导致焦虑样行为的减少,而不只局限于血清素含量的变化。此外,产生这种不同的结果也可能是因为通过直接注射外源性血清素与氟西汀阻断 SERT 导致的内源性血清素增加有所不同,例如,氟西汀处理后产生的大量内源性血清素可能导致自身受体活性增加,从而进一步间接减少血清素的释放,使氟西汀可能产生与外源性血清素处理相反的行为效应。也有研究指出氟西汀并不是简单地增加突触前血清素信号,相反它可能会消除特定神经元中的血清素^[31]。因此,内源性释放的血清素作用可能被氟西汀抑制,导致本研究中的中华绒螯蟹焦虑样行

为减少。尽管情绪的改变不能简单的归结于单一神经递质的失衡,但血清素参与中华绒螯蟹焦虑样行为的调控是显而易见的。

血清素 7 型受体是一种重要的神经递质受体,与焦虑症的发生和发展有关。在本研究中,失败组蟹的血清素 7 型受体基因相对表达水平相较于对照组显著降低,而失败组蟹处于焦虑状态,即焦虑时中华绒螯蟹血清素 7 型受体基因的相对表达水平降低。但通过血清素 7 型受体基因拮抗剂 SB-269970 处理后却减轻了中华绒螯蟹焦虑样行为,似乎出现了相矛盾的结果。目前关于血清素 7 型受体的相关研究较少,主要聚焦于哺乳动物血清素 7 型受体的研究,血清素 7 型受体在焦虑样行为中的作用尚没有明确的结论,对啮齿动物的不同研究也显示出相反的结果,例如阻断血清素 7 型受体的表达可减少旷场实验中小鼠的焦虑样行为^[33],然而血清素 7 型受体激动剂处理也同样可以减少小鼠的焦虑样行为^[34]。事实上,这种血清素受体调节焦虑的多样性并不让人惊讶,焦虑在哺乳动物中涉及多个大脑区域,在众多混合的神经生物学网络中,一些血清素受体可能在不同的区域以相反的方式改变焦虑状态。与哺乳动物不同,中华绒螯蟹神经结构较为简单清晰,主要的神经结构为胸神经节和脑神经节,在本研究中,仅测定了中华绒螯蟹胸神经节血清素 7 型受体基因相对表达水平的变化,而脑神经节中血清素 7 型受体基因相对表达水平的变化则未知。因此,后续可通过测定中华绒螯蟹脑神经节血清素 7 型受体基因的相对表达水平,进一步明确其在焦虑样行为中发挥的作用。此外,本研究首次将血清素 7 型受体激动剂 AS19 和拮抗剂 SB-260070 用于中华绒螯蟹,药物处理出现不同的结果也可能是物种差异、实验动物的性别差异、实验环境不同等原因。尽管目前血清素 7 型受体对于中华绒螯蟹焦虑样行为的调节机制尚不清晰,但它为后续关于血清素 7 型受体的研究提供了更多的参考。

作者声明本文无利益冲突

参考文献:

- [1] STEIMER T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues [J]. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2011, 13(4): 495-506.
- [2] FOSSAT P, BACQUÉ -CAZENAVE J, DE

- DEURWAERDÈRE P, et al. Anxiety-like behavior in crayfish is controlled by serotonin [J]. *Science*, 2014, 344(6189): 1293-1297.
- [3] MAZA F J, URBANO F J, DELORENZI A. Aversive memory conditioning induces fluoxetine-dependent anxiety-like states in the crab *Neohelice granulata* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2023, 226(8): jeb245590.
- [4] BLANCHARD R J, MCKITTRICK C R, BLANCHARD D C. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems [J]. *Physiology & Behavior*, 2001, 73(3): 261-271.
- [5] KUDRYAVTSEVA N N. Agonistic behavior: a model, experimental studies, and perspectives [J]. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2000, 30(3): 293-305.
- [6] BACQUÉ-CAZENAIVE J, CATTART D, DELBECQUE J P, et al. Social harassment induces anxiety-like behaviour in crayfish [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 39935.
- [7] SMITH K E, MASON T B, CROSBY R D, et al. State and trait positive and negative affectivity in relation to restraint intention and binge eating among adults with obesity [J]. *Appetite*, 2018, 120: 327-334.
- [8] MACHT M. How emotions affect eating: A five-way model [J]. *Appetite*, 2008, 50(1): 1-11.
- [9] BRILOT B O, ASHER L, BATESON M. Stereotyping starlings are more 'pessimistic' [J]. *Animal Cognition*, 2010, 13(5): 721-731.
- [10] CHEN Q, PANG Y Y, ZHANG J Y, et al. The role of different sensory organs in the feeding behavior of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Aquaculture*, 2023, 566: 739231.
- [11] 刘文明, 朱筛成, 赵金山, 等. 不同发育阶段中华绒螯蟹摄食行为及其对饵料的选择性 [J]. *上海海洋大学学报*, 2024, 33(2): 327-340.
- LIU W M, ZHU S C, ZHAO J S, et al. Feeding behavior and feeding selectivity on the different feeds of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) at different development stages [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2024, 33(2): 327-340.
- [12] ZANGROSSI JR H, GRAEFF F G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze [J]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2014, 46: 397-406.
- [13] MCKITTRICK C R, BLANCHARD D C, HARDY M P, et al. Social stress effects on hormones, brain, and behavior [M]//PFAFF D W, ARNOLD A P, ETGEN A M, et al. *Hormones, Brain and Behavior*. Elsevier Academic Press, 2009: 333-365.
- [14] BERTON O, AGUERRE S, SARRIEAU A, et al. Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats [J]. *Neuroscience*, 1997, 82(1): 147-159.
- [15] BLANCHARD D C, CHOLVANICH P, BLANCHARD R J, et al. Serotonin, but not dopamine, metabolites are increased in selected brain regions of subordinate male rats in a colony environment [J]. *Brain Research*, 1991, 568(1/2): 61-66.
- [16] MARCHLEWSKA-KOJA A, POCHRON E, GALEWICZ-SOJECKA A, et al. Suppression of estrus in female mice by the presence of conspecifics or by foot shock [J]. *Physiology & Behavior*, 1994, 55(2): 317-321.
- [17] DELVILLE Y, MELLONI JR R H, FERRIS C F. Behavioral and neurobiological consequences of social subjugation during puberty in golden hamsters [J]. *Journal of Neuroscience*, 1998, 18(7): 2667-2672.
- [18] PEDETTA S, KACZER L, MALDONADO H. Individual aggressiveness in the crab *Chasmagnathus*: Influence in fight outcome and modulation by serotonin and octopamine [J]. *Physiology & Behavior*, 2010, 101(4): 438-445.
- [19] AQUILONI L, GIULIANINI P G, MOSCO A, et al. Crustacean Hyperglycemic Hormone (cHH) as a modulator of aggression in crustacean decapods [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50047.
- [20] MCKITTRICK C R, MAGARIÑOS A M, BLANCHARD D C, et al. Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites [J]. *Synapse*, 2000, 36(2): 85-94.
- [21] ZHANG Y, BENTO J L, BELTZ B S. 5-HT receptors mediate lineage-dependent effects of serotonin on adult neurogenesis in *Procambarus clarkii* [J]. *Neural Development*, 2011, 6(1): 2.
- [22] SOSA M A, SPITZER N, EDWARDS D H, et al. A crustacean serotonin receptor: Cloning and distribution in the thoracic ganglia of crayfish and freshwater prawn [J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2004, 473(4): 526-537.
- [23] ONGVARRASOPONE C, ROSHORM Y, SOMYONG S, et al. Molecular cloning and functional expression of the *Penaeus monodon* 5-HT receptor [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2006, 1759(7): 328-339.
- [24] VÁZQUEZ-ACEVEDO N, REYES-COLÓN D, RUÍZ-RODRÍGUEZ E A, et al. Cloning and immunoreactivity of the 5-HT_{1Mac} and 5-HT_{2Mac} receptors in the central nervous system of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2009, 513(4): 399-416.
- [25] 庞杨洋. 5-羟色胺(5-HT)和多巴胺(DA)对中华绒螯蟹打斗行为作用的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- PANG Y Y. The effects of serotonin and dopamine on the

- agonistic behavior in *Eriocheir sinensis* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [26] 黄根勇. 中华绒螯蟹 5-HT7 和 DA2 受体基因克隆及几种生理过程中的表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- HUANG G Y. Cloning and expression analysis of 5-HT7 and DA2 in several physiological processes of *Eriocheir sinensis* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [27] DU C X, GUO Y, ZHANG Q J, et al. Involvement of prefrontal 5-HT7 receptors in the regulation of anxiety-like behaviors in hemiparkinsonian rats[J]. *Neurological Research*, 2018, 40(10): 847-855.
- [28] MATHEWS L. Outcomes of agonistic interactions alter sheltering behavior in crayfish [J]. *Behavioural Processes*, 2021, 184: 104337.
- [29] MACEDO G C, MORITA G M, DOMINGUES L P, et al. Consequences of continuous social defeat stress on anxiety- and depressive-like behaviors and ethanol reward in mice [J]. *Hormones and Behavior*, 2018, 97: 154-161.
- [30] HOFFMAN B J, MEZEY E, BROWNSTEIN M J. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants [J]. *Science*, 1991, 254 (5031): 579-580.
- [31] KULLYEV A, DEMPSEY C M, MILLER S, et al. A genetic survey of fluoxetine action on synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 2010, 186(3): 929-941.
- [32] CHEN F, REZVANI A H, LAWRENCE A J. Autoradiographic quantification of neurochemical markers of serotonin, dopamine and opioid systems in rat brain mesolimbic regions following chronic St. John's wort treatment [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2003, 367(2): 126-133.
- [33] HEDLUND P B, SUTCLIFFE J G. The 5-HT7 receptor influences stereotypic behavior in a model of obsessive-compulsive disorder[J]. *Neuroscience Letters*, 2007, 414 (3): 247-251.
- [34] ADRIANI W, TRAVAGLINI D, LACIVITA E, et al. Modulatory effects of two novel agonists for serotonin receptor 7 on emotion, motivation and circadian rhythm profiles in mice[J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(2): 833-842.

The effects of the loser experience induces anxiety-like behavior through the serotonin pathway on Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

ZHANG Ying^{1,2}, LEI Jinyun^{1,2}, CHENG Yongxu^{1,2}, YANG Xiaozhen^{1,2}

(1. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Agonistic behavior is a common phenomenon in the culture of *Eriocheir sinensis*. To explore the adverse effects of loser experience, anxiety-like behavior and feeding behavior of *E. sinensis* after loser experience were observed, and the levels of serotonin (5-HT) and 5-HT7R gene relative expression were detected. Then, the effects of exogenous 5-HT, fluoxetine, and 5-HT7R agonists and antagonists on the anxiety-like behavior of *E. sinensis* were observed. The results indicated that the *E. sinensis* that experienced the fight failure showed anxiety-like behavior, which was accompanied by the increase of plasma 5-HT concentration and the decrease of 5-HT7R gene relative expression level in the thoracic ganglion, and the food intake decreased after the loser experience. Exogenous 5-HT treatment promoted anxiety-like behavior, while fluoxetine treatment alleviated anxiety-like behavior. In addition, treatment with 5-HT7R agonist (AS19) promoted anxiety-like behavior, while treatment with 5-HT7R antagonist (SB-269970) alleviated anxiety-like behavior. These results indicate that the loser experience can lead to anxiety-like behavior and affect anxiety-like behavior through the serotonin pathway. This study revealed the potential negative effects of loser experience and provided theoretical basis for promoting healthy culture of *E. sinensis*.

Key words: *Eriocheir sinensis*; anxiety-like behavior; 5-HT; 5-HT7R