

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230418001

http://www.yykxjz.cn/

万金铭, 王映, 陈良标. 鳞头犬牙南极鱼 *LeptinB* 基因在抵御低温应激中的作用. 渔业科学进展, 2023, 44(6): 97-106

WAN J M, WANG Y, CHEN L B. Role of the *Dissostichus mawsoni* *LeptinB* gene in cellular cold resistance. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(6): 97-106

# 鳞头犬牙南极鱼 *LeptinB* 基因 在抵御低温应激中的作用

万金铭<sup>1</sup> 王映<sup>1</sup> 陈良标<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 国家海洋生物科学国际联合研究中心 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** 为了探究瘦素基因(*LeptinB*, *LepB*)在斑马鱼肝脏细胞系(ZFL)低温应激中的作用,本研究根据鳞头犬牙南极鱼(*Dissostichus mawsoni*) *LepB* 基因(*DM-LepB*)编码的氨基酸序列,克隆到构建的 pTOL2-actin-EGFP 质粒中(启动子为斑马鱼的  $\beta$ -actin)。选取 *EcoR* I 和 *Bam*H I 为限制酶,设计构建了 pTOL2-*LepB*+*HIS*-EGFP 表达载体,并转染至 ZFL 细胞中。选择致死温度 10 °C 进行实验,采用流式细胞术检测了低温胁迫下细胞的存活率,使用增强型 CCK-8 试剂盒检测了低温条件下细胞的生长增殖情况,使用荧光探针 DHE 检测了细胞活性氧(ROS)含量。结果显示, *LepB* 基因的过表达能有效减少细胞 ROS 的产生,减轻细胞凋亡以应对低温胁迫。分析还显示, *DM-LepB* 的过表达也有利于维持低温刺激下的胞内 ATP 水平与线粒体状态,有效减轻低温刺激对细胞的凋亡和坏死作用,对细胞冷应激起到保护作用。采用油红 O 染色和甘油三酯(TG)实验检测发现, *DM-LepB* 基因能减缓低温刺激时细胞脂质的消耗,较多的脂质保留可减弱低温刺激对细胞的伤害,使得细胞能更好地抵抗低温损害。研究结果为揭示南极鱼类的低温适应分子机制提供了基础资料。

**关键词** 鳞头犬牙南极鱼; *LeptinB*; 低温应激; 细胞凋亡; 脂质代谢

中图分类号 Q786; S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)06-0097-10

鱼类是变温动物,体温变化取决于外部水环境温度的变化,温度是其行为、生理和分子过程的重要外在因素(Nikoskelainen *et al*, 2004; 邹华锋等, 2016; 王映等, 2022)。水温的急速下降会引发鱼类强烈的应激反应,可能会导致生长抑制或者死亡(Huang *et al*, 2017; Foulkes *et al*, 2007)。在自然界中,从 40 °C 热带水域到-1.9 °C 的南极洲都有各种鱼类的广泛分布,其中,南极海域常年水温为-1.9 °C,为了应对低温刺激,极地鱼类机体调节能量稳态非常关键(Tien *et al*, 2018)。

瘦素(Leptin)是一种具有多重生物学功能的蛋白质类激素,在调节摄食、能量平衡和生殖过程中发挥重要作用(罗铮等, 2018; Huising *et al*, 2006; Zhang *et al*, 2011)。瘦素基因(*Lep*)首次克隆于肥胖突变型小鼠(*Mus musculus*),最初命名为肥胖基因,该基因的突变导致小鼠过度肥胖(Zhang *et al*, 1994)。进一步研究发现,在哺乳动物体内, *Lep* 基因通过对机体的摄食和能量消耗进行调控,从而降低动物的采食量,进而实现降低体重和体脂率的作用(Ahima *et al*, 2000; Elmquist *et al*, 2005)。 *Lep* 基因还参与调节机体的免

\* 国家重点研发计划项目(2018YFD0900600)、上海市科委“一带一路”国际联合实验室项目(19590750500)和上海市教委研创新计划项目(2017-01-07-00-10-E00060)共同资助。万金铭, E-mail: jinnywan@126.com

① 通信作者: 陈良标, 教授, E-mail: lbchen@shou.edu.cn

收稿日期: 2023-04-18, 收修改稿日期: 2023-05-18

疫应答,并对动物胚胎发育和生长繁殖具有重要作用(Khosropour *et al.*, 2017; Pérez-Pérez *et al.*, 2018)。在鱼类中, Kurokawa 等(2005)采用比较基因组学方法首次从红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)克隆得到了 *lep* 基因序列。关于 *Leptin* 对温度调控方面的作用在哺乳动物中研究较多,主要包括对能量代谢的调控以及对温度适应性进化影响等(Yang *et al.*, 2008; McGaffin *et al.*, 2009; Kanda *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2014; Toro *et al.*, 2014)。目前,关于 *Lep* 在鱼类中作用的报道主要集中在摄食、脂肪能量代谢和繁殖调控等方面,对温度的调控作用研究尚少有报道。

鳞头犬牙南极鱼(*Dissostichus mawsoni*)是南冰洋海域食物网重要的组成部分,不仅是顶级捕食者,还是鲸类和海豹的主要食物来源,在南冰洋生态系统中占据重要位置。在近3千万年里,鳞头犬牙南极鱼一直生活在南极水域-1.9℃寒冷又封闭的低温环境中,是极端环境下温度适应机制研究的极好材料(Hanchet *et al.*, 2015)。与相同水深的其他鱼类相比,鳞头犬牙南极鱼在皮下和肌肉中有广泛的脂质沉积(Chen *et al.*, 2019)。本实验室前期在该鱼中发现, *LepB* 的部分缺失造成其在结构上仅有3个 $\alpha$ 螺旋,也发现 *LepA* 与温度变化密切相关(Wang *et al.*, 2021),据此推测, *LepB* 可能在鳞头犬牙南极鱼低温环境适应中发挥重要作用。本研究克隆鳞头犬牙南极鱼的 *LepB* 基因,构建质粒 *LepB* (DMLB)转染 ZFL 细胞,探究其在极端低温环境适应中的作用,以期揭示鳞头犬牙南极鱼 *LeptinB* 基因在鱼类应对低温胁迫时如何调节机体能量稳态的分子机制提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

鳞头犬牙南极鱼从南极中山站的海冰中钻孔垂钓捕获,将其保存在液氮中运回实验室直至使用。

细胞系为 ZFL (ATCC, 美国),质粒为 pTOL2- $\beta$ -actin-EGFP。转染 pTOL2-*LepB*+HIS-EGFP 质粒的 ZFL 细胞命名为 DMLB 实验组细胞,转染 TOL2 空载质粒的 ZFL 细胞命名为对照组 TOL2 细胞。

### 1.2 南极鱼 *LepB* 基因的克隆及真核表达载体的构建

使用 Trizol (Invitrogen, 美国)提取鳞头犬牙南极鱼卵巢总 RNA,用 NanoDrop 分光光度计进行浓度检测和质检,用 TransScript<sup>®</sup> First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒(TaKaRa)反转录合成单链 cDNA。根据实验室已获取的鳞头犬牙鱼的基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物(表1),进行 PCR 扩增,以获得该基因的开放阅读框(ORF)。由于缺乏鳞头犬牙南极鱼特异性瘦素的抗体,本研究设计构建了 pTOL2-*LepB*+HIS-EGFP 表达载体(图1),根据鳞头犬牙南极鱼 *LepB* 基因编码的氨基酸序列,采用斑马鱼  $\beta$ -actin 基因的启动子,选取 *EcoR* I 和 *Bam*HI 的酶切位点作为克隆位点,与实验室保存的真核表达载体 pTOL2- $\beta$ -actin-2A-EGFP 进行无缝克隆连接,引物见表1。为了便于检测质粒的表达情况,在 C 端引入 HIS 标签。

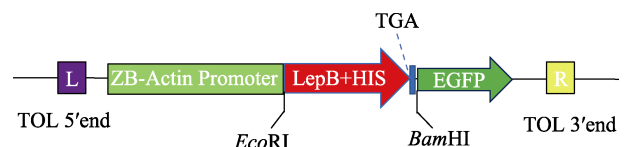


图1 pTOL2-*LepB*+HIS-EGFP 真核表达载体构建图谱  
Fig.1 Expression vector map of pTOL2-*LepB*+HIS-EGFP

将 *LepB* 基因的克隆产物用 Qiagen 胶回收试剂盒进行回收纯化,用 In-Fusion HD cloning kit (TaKaRa)连接,将连接产物转化至大肠杆菌(*E. coli*) DH-5 $\alpha$  感受态细胞中,适当稀释后涂布在含 100  $\mu$ g/mL 卡那霉素的平板上,PCR 验证插入片段,验证合格后将产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,阳性克隆菌扩大培养,用质粒提取试剂盒提取质粒(Promega, 美国),提取的质粒保存于-20℃冰箱中,用于转染实验。

### 1.3 ZFL 细胞培养与质粒转染、蛋白表达

将 ZFL 培养在含 89% DMEM/F12 (含 1%谷氨酰胺, HyClone)、10% FBS 和 1%青霉素-链霉素培养基中,温度为 28℃,CO<sub>2</sub> 浓度为 5% (即最适生长条件)。待细胞的汇合度达到 70%~80%时,用 polyplus jet

表1 *LepB* 基因的克隆和无缝克隆引物

Tab.1 The primers for *LepB* cloning and the In-Fusion cloning

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')
<i>LepB</i> -F(clone)	GGAGAGAGGAGGGCATTAGG
<i>LepB</i> -R(clone)	GTGTGGATTCTCAGCAGACC
<i>LepB</i> -F	AGTTCAGCCGAATTCATGAATCCAGAGACTATTTTC
<i>LepB</i> -R	GCCACCTCCGGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT

Optimus® DNA 转染试剂(百奥创新, 北京)进行转染。扩增培养后将 G418 硫酸盐(生工生物, 上海)溶解稀释液加入到转染的 ZFL 细胞中, 筛选出转染成功的细胞。7 d 时 G418 浓度为 1 000 mg/mL, 此后为 500 mg/mL, 这是大多数未转染细胞死亡的浓度。丢弃 G418, 并用绿色荧光突出显示成功转染的细胞。

筛选出的 LepB 细胞和 TOL2 对照细胞用混合蛋白质裂解液(含 10% PMSF)进行蛋白质提取, 冰上裂解 30 min, 4 °C 低温 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液分装于离心管中, -80 °C 保存。使用 Bradford 测量蛋白质浓度, 通过 SDS-PAGE 分离蛋白质(每个样品 30 µg), 并将其电转移至聚偏二氟乙烯硝酸纤维素膜(Millipore, 德国)。脱脂牛奶封闭后, 用 His 一抗(1 : 1000, Abcam, 英国)4 °C 过夜, 山羊抗鼠二抗(1 : 500, 杭州)室温孵育 2 h, 内源性对照为 β-肌动蛋白。用增强化学发光检测试剂(Beyotime, 中国)显示蛋白质。

#### 1.4 细胞低温处理形态观察和细胞活力检测

将转染空载质粒和 LepB 重组质粒的细胞进行 10 °C 低温胁迫处理后, 采用倒置荧光显微镜观察细胞形态并拍照。使用增强型 CCK-8 试剂盒(碧云天, 江苏)检测细胞增殖能力以及细胞毒性, 细胞增殖速度产生颜色变化, 颜色的深浅与细胞增殖成正比, 与细胞毒性成反比。使用酶联免疫检测仪在 450 nm 处测定光吸收值, 可间接反映活细胞数量。使用对数生长期的细胞传代并计数, 每毫升 20 000 个细胞传至 96 孔板中, 每孔 200 µL, 每个样品 5 个重复, 使实验组和对照细胞密度相同, 分别在 0、24、48 h 检测细胞增殖活性, 每孔加 10 µL 增强型 CCK-8 检测液, 培养箱孵育 4 h, 使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光值。样品吸光值减去空白吸光值, 重复取平均值, 使用 GraphPad Prism 8 软件绘制生长曲线。

#### 1.5 流式细胞术检测活性氧

活性氧(ROS)参与细胞的增殖、分化、衰老和凋亡等过程。活性氧检测试剂盒利用二氢乙锭, 可自由透过活细胞膜进入细胞内, 并被细胞内的 ROS 氧化, 与染色体 DNA 结合发红色荧光的氧化乙锭。细胞传代并计数后接种至 6 孔板, 相同密度的实验组和对照组贴壁细胞 10 °C 低温刺激 3 d, 收集细胞, 200 µL  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cells/mL 的细胞悬液加入 2 µL 的红色荧光染料原液(5 mmol/L), 轻轻混匀, 室温避光孵育 60 min 后, 500 g 离心 5~10 min, 去除染色液, 用 DPBS 缓冲液(Sigma)清洗 2 次, 最后用 DPBS 重悬细胞,

BD C6 流式细胞仪(BD, 美国)上机 FL2 通道检测荧光信号, FlowJo 软件分析, 使用 GraphPad Prism 8 软件绘制 ROS 相对表达图。实验组和对照组均设置 3 个重复。

#### 1.6 细胞凋亡检测

使用 Hoechst 33342/PI 双染试剂盒(Solarbio, 中国)检测凋亡细胞与坏死细胞, 细胞传代并计数至 96 孔板, 使实验组和对照组细胞密度相同, 适温培养贴壁后, 分别于 28 °C 和 10 °C 培养 3 d 后, 每孔加入 5 µL Hoechst 染色液和 5 µL PI 染色液。混匀, 冰浴或 4 °C 孵育 20~30 min。染色后 PBS 洗涤 1 次, 在荧光显微镜下观察拍照。

#### 1.7 细胞 ATP 检测

通常, ATP 水平的下降表示线粒体功能受损, 也可代表细胞的凋亡水平, 使用试剂盒(Sigma, 美国)对细胞进行 ATP 检测。将实验组和对照组贴壁细胞放于 10 °C 培养箱, 低温刺激 3 d, 取出后吸除培养液, 6 孔板每孔加入 200 µL 裂解液, 吹打裂解后转移至 EP 管, 4 °C 12 000 g 离心 5 min, 取上清液, 96 孔板每孔加 100 µL ATP 检测工作液(检测试剂与稀释液 1 : 4), 室温放置 5 min 后每孔加入 20 µL 待测样品和标准品, 迅速混匀, 用酶标仪(Bio-Rad, 美国)检测化学发光。使用 Excel 软件制作标准曲线, 计算样品 ATP 浓度。

#### 1.8 油红 O 脂滴染色

配制油红储存液(0.15 g 油红 O 粉末及 50 mL 100%异丙醇于棕色避光瓶混匀溶解)4 °C 保存, 油红工作液需实验前现用现配, 将油红储存液与灭菌去离子水按照 3 : 2 的比例混合过滤后使用。细胞提前转至 35 mm 培养皿, 28 °C 培养箱培养, 细胞贴壁后取一组放于 10 °C 培养箱低温处理, 3 d 后取出后, DPBS 洗 2 遍, 4%多聚甲醛 15 min 固定细胞, DPBS 洗 2 遍; 每孔加入过滤后的油红工作液, 室温静置染色 30 min; 弃染液, DPBS 洗 2 遍, 加入 DPBS 覆盖细胞, 在正置显微镜下观察拍照。

#### 1.9 甘油三酯的检测

采用检测试剂盒(南京建成)和 GPO-PAP 法检测甘油三酯。细胞置于 10 cm 培养皿, 10 °C 处理 3 d, 取细胞沉淀, DPBS 洗 2 次, 加入 200~300 µL 的 DPBS 冰浴匀浆 1 min, 采用 Bradford 法进行蛋白浓度测定, 酶标仪测 595 nm 吸光值, 96 孔板每孔加入样品 2.5 µL, 每个样品 3 个重复, 每孔加检测液 250 µL, 37 °C 反应 10 min, 酶标仪检测 510 nm 吸光值。

### 1.10 统计分析

实验至少进行3次独立重复,实验观察所得数据先使用相应软件处理,再使用SPSS 18软件进行方差分析以及Duncan's多重比较,GraphPad Prism软件分析作图。 $P < 0.05$ 为组间差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 ZFL 细胞转染荧光观察与 Western-blot 检测

ZFL 细胞转染 DMLB 质粒和 TOL2 空载质粒后,经约 21 d G418 筛选培养后,可见大面积荧光细胞簇(图 2),表示荧光质粒转染成功,培养至转染细胞达 60%可进行实验。通过 Western blot 对阳性对照 LepA、LepB 和 TOL2 细胞的总蛋白进行检测,采用 HIS 标签检测蛋白大小与预测的 LepA 16.04 kDa、LepB 14.39 kDa 大小一致,空载 TOL2 细胞未被检测到 HIS 标签(图 3),表明鳞头犬牙南极鱼 *LeptinB* 基因在 ZFL 细胞中成功过表达。

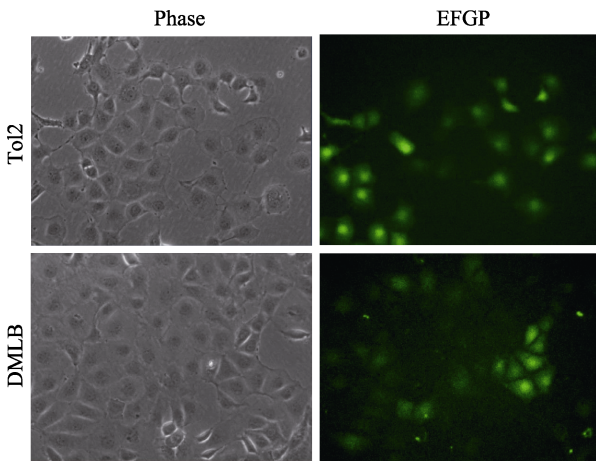


图 2 ZFL 细胞转染后的绿色荧光

Fig.2 ZFL cells with green fluorescence after infection with supernatant containing lentivirus particles

Phase 为明场视野,EGFP 为绿色荧光视野。图 4 同。  
Phase is bright field vision, and EGFP is green fluorescence.  
The same in Fig.4.

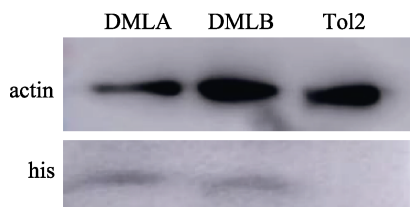


图 3 Western-blot 检测 LepA (阳性对照) (6.04 kDa)、LepB (14.39 kDa)和 TOL2 蛋白

Fig.3 Western blot analysis of LepA (positive control) (6.04 kDa), LepB (14.39 kDa) and TOL2 protein

### 2.2 DM-LEPB 在 ZFL 细胞低温应激下的表型观察

将 28 °C 培养箱中生长状态良好的实验组 DMLB 细胞和对照组 TOL2 细胞转移至 10 °C 培养箱中低温刺激,每日观察生长或死亡状况,至第 14 天,可见对照组细胞基本死亡,荧光显微镜下除死细胞有假阳性荧光外,对照组无荧光细胞存活;但实验组中有稀疏细胞存活,荧光显微镜下可见细胞多有荧光(图 4)。由此猜测,表达鳞头犬牙南极鱼 *LepB* 基因的细胞有耐低温能力。

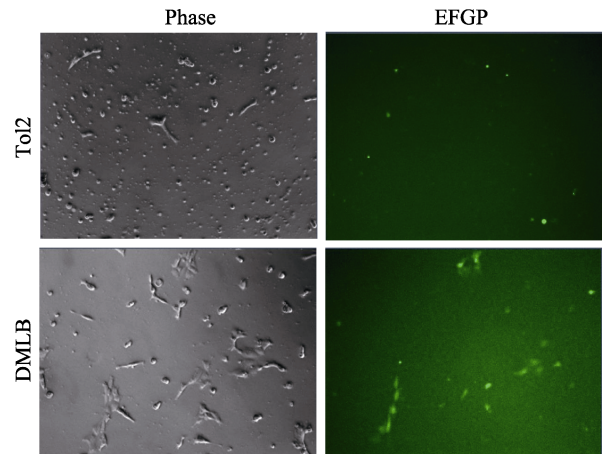


图 4 TOL2 细胞与 DMLB 细胞低温刺激 14 d 死亡情况  
Fig.4 Low temperature stimulated the death of TOL2 cells and DMLB cells for 14 d

### 2.3 Hoechst/PI 细胞凋亡检测

对照组 TOL2 细胞和实验组 DMLB 细胞低温刺激 3 d 后,通过荧光显微镜在 Hoechst 亮蓝色荧光通道下 2 组细胞可见蓝色细胞核染色标记,在 PI 红色荧光通路下, TOL2 细胞红色荧光染色数显著多于实验组 DMLB 细胞,红色荧光细胞数 36 : 10 (图 5), TOL2 细胞在低温刺激下发生较多的细胞凋亡和细胞坏死,这表示南极鱼 *LepB* 基因过表达可以减轻低温刺激对细胞的凋亡和坏死作用。

### 2.4 CCK-8 细胞活力检测

实验组 DMLB 细胞与对照组 TOL2 细胞在 28 °C 培养箱中均生长状态良好,能快速分裂,培养板细胞密度可达到饱和。将实验组和对照组细胞放至 10 °C 培养箱中,经过低温刺激后,对照组细胞生长基本停滞,而实验组却有一定生长,二者差异显著( $P < 0.05$ ) (图 6)。由此可知,低温刺激导致对照组细胞活力减弱甚至停滞生长,而鳞头犬牙南极鱼 *LepB* 基因过表达可增强细胞低温下的增殖活力。

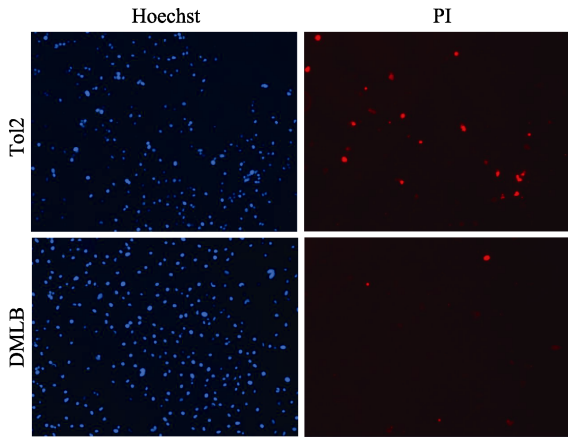


图 5 Hoechst/PI 染色检测细胞凋亡

Fig.5 Apoptosis was detected by Hoechst/PI staining

Hoechst 标记细胞核, PI 标记凋亡细胞和坏死细胞。  
Hoechst labeled the nucleus, and PI labeled apoptotic and necrotic cells.

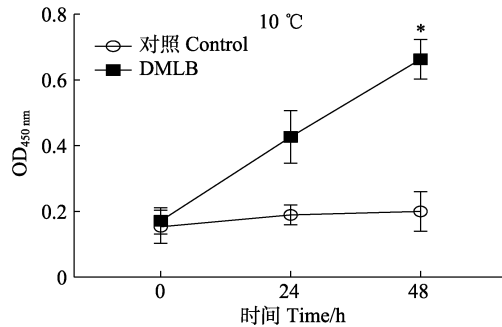
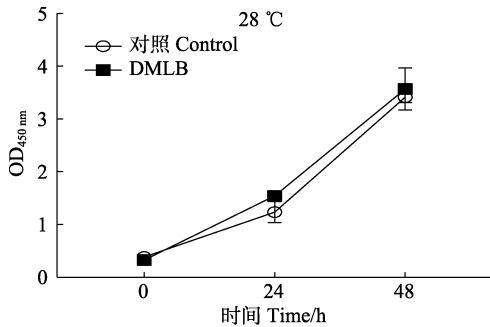


图 6 TOL2 细胞与 DMLB 细胞 28 °C 与 10 °C 培养细胞增殖情况

Fig.6 Proliferation of TOL2 cells and DMLB cells cultured at 28 °C and 10 °C

\*表示差异在 0.01<P<0.05 水平, 下同。\* indicates the difference on the level of 0.01<P<0.05, the same below.

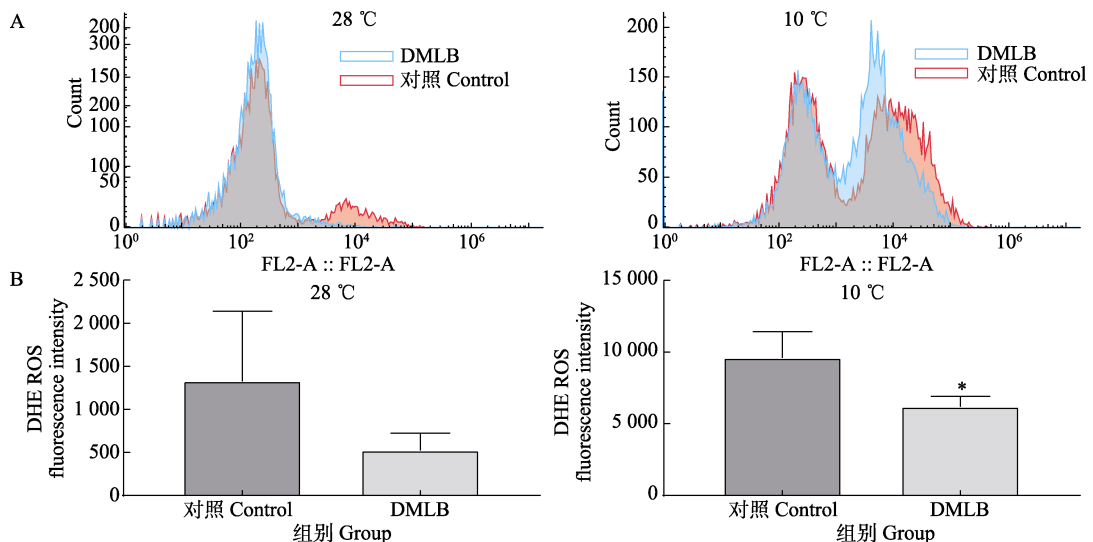


图 7 细胞凋亡分析

Fig.7 Cell apoptosis analysis

A: 流式细胞仪 ROS FlowJo 软件分析; B: ROS 数据的荧光值用 GraphPad Prism 8 软件进行分析和绘图

A: Flow cytometer ROS FlowJo software analysis; B: Fluorescence values of ROS data were analyzed and plotted using GraphPad Prism 8 software

## 2.5 流式细胞术检测 ROS 含量

细胞本身为绿色荧光, 使用试剂盒中的 DHE 红色荧光探针检测 ROS 的产生情况, 采用流式细胞仪分析实验组和对照组 ROS 荧光值。结果显示, 28 °C 时, ROS 含量较少, 2 组荧光强度无显著差异; 而 10 °C 时, ROS 含量明显增多, 对照组平均荧光强度显著高于 DMLB 实验组(图 7)。由此得出, 低温刺激导致细胞内 ROS 含量显著增加, 而鳞头犬牙南极鱼 *LepB* 基因过表达能够减轻细胞 ROS 的产生, 减少细胞凋亡。

## 2.6 细胞 ATP 检测

结果显示, 经低温处理后, 与对照组相比, 实验组细胞的 ATP 水平显著增高( $P<0.05$ )(图 8)。由此可知, DM-*LepB* 过表达对维持低温刺激下细胞内 ATP 水平有显著作用, 有利于维持细胞线粒体稳态。

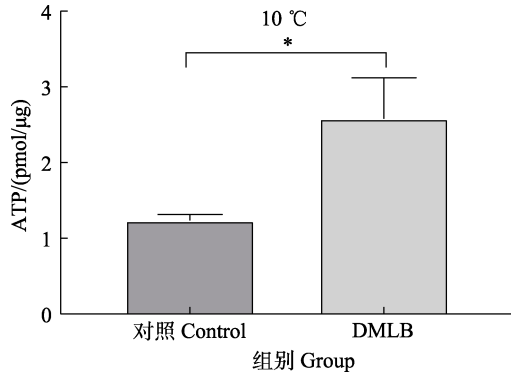


图8 低温处理对细胞 ATP 含量的影响  
Fig.8 Effect of low temperature treatment on ATP content in cells

### 2.7 油红 O 脂滴染色

活性油红将脂滴染为深色,使用正置显微镜明场拍照,脂滴染色拍照图片使用 ImageJ 软件分析染色面积,由染色面积确定脂滴数量。在正常温度培养时,DMLB 组细胞比对照组细胞脂滴略少,而低温刺激后,对照组细胞有部分死亡情况,清洗染色后发现,脂滴显著减少,而 DMLB 组细胞脂滴数量较多(图 9)。表明鳞头犬牙南极鱼 *LepB* 基因能减缓低温刺激时细胞脂质的消耗,减弱细胞的伤害,较多的脂质保留使细胞能更好地抵抗低温损害。

### 2.8 甘油三酯的检测

甘油三酯是细胞中脂滴构成的主要成分,是体内储存量最大、产能最多的能源物质。低温环境下,甘油三酯作为能源物质对细胞的生长、生存有重要意

义。同油红 O 染色结果一致(图 10),在正常温度培养时,对照组细胞比 DMLB 组细胞甘油三酯稍多,而低温刺激后,对照组细胞甘油三酯含量显著下降,DMLB 组细胞甘油三酯含量变化较对照组稳定。表明鳞头犬牙南极鱼 *LepB* 基因对低温刺激下的脂质代谢有减弱作用。

## 3 讨论

低温胁迫影响着生物的生长发育、能量代谢和繁殖发育等多种过程(汪倩等, 2022)。近年来,关于低温胁迫影响生物体的研究日益增长,其中较多研究集中在分子层面(Wang *et al*, 2022; 程鹏丽等, 2020)。Leptin 作为一种脂肪组织与下丘脑之间的信号传导蛋白(曾沃坦等, 2008),已证实与细胞生长、繁殖、凋亡和代谢密切相关。在哺乳动物中,Leptin 的生理功能是通过调节能量代谢来维持能量内稳态(Bakshi *et al*, 2022),但鱼类作为变温动物与哺乳动物有很大的不同。采用比较法可以更快速和清晰地阐明鱼类 leptin 的功能机制。Leptin 作为调控新陈代谢的关键蛋白产物,暂时缺少其参与冷应激过程调控机制的研究。因此,本研究通过体外实验探究 LeptinB 在鱼类细胞受到低温胁迫后所起的功能。利用鳞头犬牙南极鱼 *lepB* (DMLB)质粒转染 ZFL 细胞,并对其在常温及 10 °C 低温条件下进行细胞培养;使用增强型 CCK-8 试剂盒检测了细胞增殖能力和细胞毒性大小,通过流式细胞技术检测 DMLB 质粒转染 ZFL 细胞 ROS 细胞凋亡,探索 *DMLB* 基因在调节冷应激过程中发挥的作用及其分子调控机制。

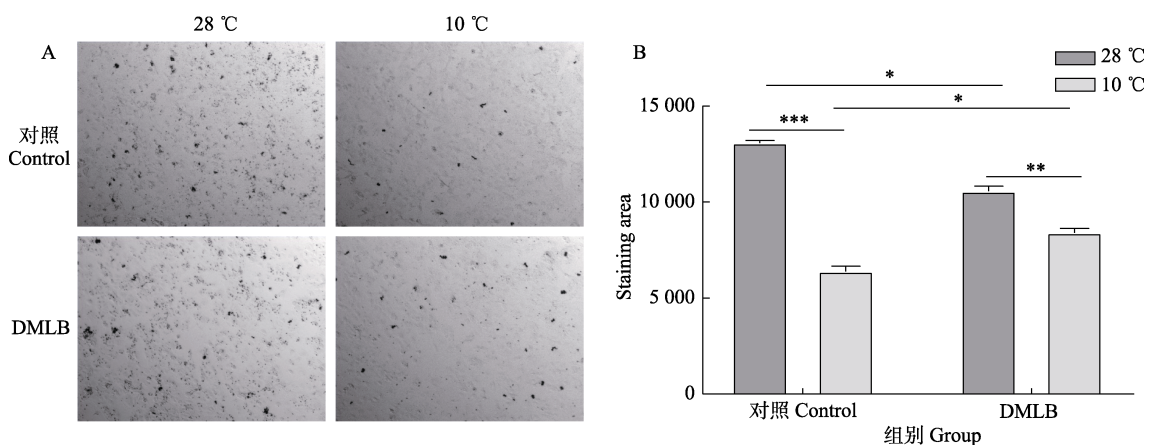


图9 低温处理后细胞脂滴油红 O 染色  
Fig.9 Low temperature treatment of cell lipid drop oil red O staining

A: 染色显微镜正置明场拍照图片; B: ImageJ 软件分析染色面积。  
\*\*表示差异在  $P<0.01$  水平, \*\*\*表示差异在  $P<0.001$  水平,下同。

A: The staining microscope is being exposed to take pictures; B: Staining area was analyzed by ImageJ software.  
\*\* indicates the difference on the level of  $P<0.01$ , and \*\*\* indicates the difference on the level of  $P<0.001$ , the same below.

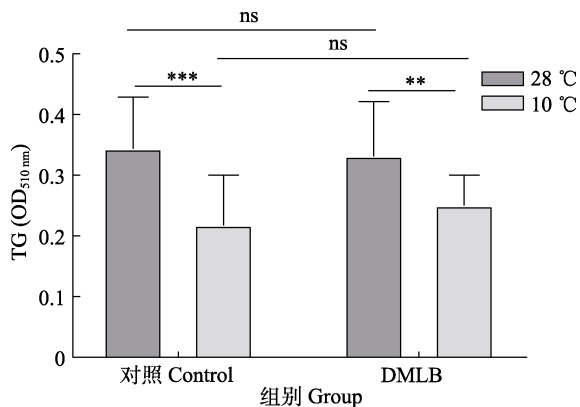


图 10 低温处理对细胞甘油三酯含量的影响  
Fig.10 Effect of low temperature treatment on cell triglyceride content

机体内的 ATP 主要通过有氧代谢来提供, 在这个过程中还会产生 ROS, 即在有氧代谢过程中产生的氧离子、过氧化物和含氧自由基等一系列氧的单电子还原产物(冯锦芝等, 2016)。在正常细胞中, ROS 在产生的同时会有很大一部分消耗, 当 ROS 的积累速度远远超出其在机体内的消耗速度, 就会对机体造成永久损伤(胡成枫等, 2019)。ROS 易与细胞膜上的一些不饱和脂肪酸或胆固醇反应, 引发链式反应, 这种直接作用于细胞的氧化损伤能导致细胞凋亡(褚启龙等, 2003)。因此, 通过流式细胞技术检测细胞内 ROS 含量, 一定程度上可以代表细胞凋亡的程度。28 °C 时, 细胞凋亡数较少, 而 10 °C 时对照组细胞凋亡数显著多于 DMLB 实验组, 说明低温胁迫后 *DM-LepB* 基因过表达能够显著降低细胞 ROS 的产生, 从而减少细胞凋亡, 进而调节能量的消耗, 使动物体内 ROS 的含量维持在一个相对稳定的水平。同时发现, 低温刺激细胞凋亡后, 对照组出现了更多的凋亡和坏死, 这也反映 *leptin* 基因在应对低温应激下的凋亡中发挥了重要作用。

线粒体是 ATP 产生的主要场所, ATP 是细胞直接供能的物质, 对细胞的生长代谢、维持细胞稳态有重要作用。通常在细胞处于凋亡、坏死等负面状态下, 体内 ATP 水平会降低(Malhi *et al.*, 2006), 这也能指示线粒体功能受损的状态, 低温会刺激低温反应相关通路因子, 从而激活瘦素的转录, 促进线粒体的产生以便提供更多的能量来维持必需的生理活动。本研究中, 经低温处理后, DMLB 实验组细胞 ATP 水平出现差异, 对照组细胞 ATP 水平无显著变化, 因此, *DM-LepB* 过表达对维持低温刺激下的胞内 ATP 水平有显著作用, 有利于维持细胞线粒体状态。

综上, 本研究通过在 ZFL 细胞中过表达鳞头犬

牙南极鱼 *LeptinB* 基因, 发现 *DMLB* 基因对低温应激有维持细胞生长增殖、减少 ROS 产生、减轻细胞凋亡的作用, 有利于维持胞内 ATP 水平, 维持细胞线粒体状态, 有效减少细胞的凋亡损伤。另外, 鳞头犬牙南极鱼 *LeptinB* 基因能减缓低温刺激时细胞脂质的消耗, 减弱细胞的伤害, 较多的脂质保留使细胞更好地抵抗低温损害, 对细胞冷应激起到保护作用。

## 参 考 文 献

- AHIMA R S, SAPER C B, FLIER J S, *et al.* Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2000, 21(3): 263–307
- BAKSHI A, SINGH R, RAI U. Trajectory of leptin and leptin receptor in vertebrates: Structure, function and their regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 257: 110652
- CHEN L, LU Y, LI W, *et al.* The genomic basis for colonizing the freezing Southern Ocean revealed by Antarctic toothfish and *Patagonian robalo* genomes. *GigaScience*, 2019, 8(4): giz016
- CHENG P L, HU R Q, LI G F, *et al.* Study on stress granules of zebrafish embryo fibroblasts cell (ZF4) under cold stress. *Journal of Biology*, 2020, 37(4): 40–44 [程鹏丽, 胡瑞芹, 李根芳, 等. 低温胁迫下斑马鱼胚胎成纤维细胞(ZF4)应激颗粒的探究. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 40–44]
- CHU Q L, YANG K D, WANG A G, *et al.* Research progress on oxidative stress and apoptosis. *Journal of Hygiene Research*, 2003, 32(3): 276–279 [褚启龙, 杨克敌, 王爱国. 氧化应激与细胞凋亡关系的研究进展. *卫生研究*, 2003, 32(3): 276–279]
- ELMQUIST J K, COPPARI R, BALTHASAR N, *et al.* Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *Journal of Comparative Neurology*, 2005, 493(1): 63–71
- FENG J Z, YAO W Y, LIU J J, *et al.* Advances in the study of iron metabolic systems affecting the bactericidal action of antibiotics. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2016, 41(8): 561–567 [冯锦芝, 姚文晔, 刘俊坚, 等. 铁代谢体系影响抗生素杀菌作用的研究进展. *中国抗生素杂志*, 2016, 41(8): 561–567]
- FOULKES T, WOOD J. Mechanisms of cold pain. *Channels*, 2007, 1(3): 154–160
- HANCHET S, DUNN A, PARKER S, *et al.* The Antarctic toothfish (*Dissostichus mawsoni*): Biology, ecology, and life history in the Ross Sea region. *Hydrobiologia*, 2015, 761(1): 397–414
- HU C F, WANG X Y, CHEN L B, *et al.* Effect of PGC-1 $\alpha$  knockdown on zebrafish cells under cold stress. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(10): 4422–4429 [胡成枫, 王晓焯, 陈良标. PGC-1 $\alpha$  敲降对斑马鱼细胞冷应激过程的

- 影响. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(10): 4422–4429]
- HUANG W, REN C, LI H, *et al.* Transcriptomic analyses on muscle tissues of *Litopenaeus vannamei* provide the first profile insight into the response to low temperature stress. PLoS One, 2017, 12(6): e0178604
- HUISING M O, KRUISWIJK C P, FLIK G. Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. Journal of Endocrinology, 2006, 189(1): 1–25
- KANDA N, SENO H, KONDA Y, *et al.* STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. Oncogene, 2004, 23(28): 4921–4929
- KHOSROPOUR S, HAMIDI M, FATTAHI A, *et al.* Leptin and leptin-receptor polymorphisms in fertile and infertile men. Systems Biology in Reproductive Medicine, 2017, 63(1): 7–14
- KUROKAWA T, UJI S, SUZUKI T. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. Peptides, 2005, 26(5): 745–750
- LUO Z, WENG J M, FENG J Q, *et al.* Research advance on Leptin gene. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018, 45(9): 2524–2530 [罗铮, 翁吉梅, 封竣琪, 等. 瘦素基因的研究进展. 中国畜牧兽医, 2018, 45(9): 2524–2530]
- MALHI H, GORES G J, LEMASTERS J J. Apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths? Hepatology, 2006, 43(S1): S31–S44
- MCGAFFIN K R, ZOU B, MCTIERNAN C F, *et al.* Leptin attenuates cardiac apoptosis after chronic ischaemic injury. Cardiovascular Research, 2009, 83(2): 313–324
- NIKOSKELAINEN S, BYLUND G, LILIUS E M. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. Developmental and Comparative Immunology, 2004, 28(6): 581–592
- PÉREZ - PÉREZ A, TORO A, VILARIÑO - GARCÍA T, *et al.* Leptin action in normal and pathological pregnancies. Journal of cellular and molecular medicine, 2018, 22(2): 716–727
- TIEN N. How polar fish survive subzero seas. Chemical and Engineering News of the American Chemical Society, 2018, 96(7): 7–8
- TORO A R, MAYMÓ J L, IBARBALZ F M *et al.* Leptin is an anti-apoptotic effector in placental cells involving p53 downregulation. PloS One, 2014, 9(6): e99187
- WANG H, WANG Y, NIU M, *et al.* Cold acclimation for enhancing the cold tolerance of zebrafish cells. Frontiers in Physiology, 2022, 12: 2532
- WANG Q, ZHAI W Y, HAN S, *et al.* Effects of low temperature stress on gut microbial community structure of different strains of obscure puffer *Takifugu fasciatus*. Journal of Dalian Ocean University, 2022, 37(1): 80–87 [汪倩, 翟万营, 韩爽, 等. 低温胁迫对不同品系暗纹东方鲀肠道微生物群落结构的影响. 大连海洋大学学报, 2022, 37(1): 80–87]
- WANG Y, HU L H, WANG H M, *et al.* Role of *Trematomus bernacchii* DUSP1 gene in cell cold resistance. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(8): 1105–1112 [王映, 胡玲红, 王化敏, 等. 伯氏肩孔南极鱼 *dusp1* 基因在冷应激中的功能研究. 水生生物学报, 2022, 46(8): 1105–1112]
- WANG Y, WANG H, HU L, *et al.* Leptin gene protects against cold stress in Antarctic toothfish. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 740806
- YANG J, WANG Z L, ZHAO X Q, *et al.* Natural selection and adaptive evolution of leptin in the ochotona family driven by the cold environmental stress. PloS One, 2008, 3(1): e1472
- YU H, LEE H, HERRMANN A, *et al.* Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. Nature Reviews Cancer, 2014, 14(11): 736–746
- ZENG W T, SHAN Y Q, WANG X X, *et al.* Low temperature autoinducing expression, purification and identification for biological activity of recombinant human leptin fusion protein. Military Medical Sciences, 2008, 32(5): 443–446 [曾沃坦, 单永强, 王晓霞, 等. 重组人瘦素融合蛋白在大肠杆菌中的低温自诱导表达、纯化和活性鉴定. 军事医学科学院院刊, 2008, 32(5): 443–446]
- ZHANG Y, CHUA S Jr. Leptin function and regulation. Comprehensive Physiology, 2011, 8(1): 351–369
- ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, 1994, 372(6505): 425–432
- ZOU H F, FENG Y H, LAN Z H, *et al.* Effect of hypothermia treatment on stress-related genes in the CNSS system of *Danio rerio*. Jiangsu Agricultural Sciences, 2016, 44(8): 43–46 [邹华锋, 冯宇红, 兰兆辉, 等. 低温处理对斑马鱼 CNSS 系统应激相关基因的影响. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 43–46]

(编辑 冯小花)



## Role of the *Dissostichus mawsoni* *LeptinB* Gene in Cellular Cold Resistance

WAN Jinming<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, CHEN Liangbiao<sup>1,2</sup>①

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology; 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** Variation in fish temperature is determined by changes in the external aquatic environment, and temperature serves as a crucial regulatory factor for the behavior, physiology, and molecular processes of fish. A rapid decline in water temperature can elicit a strong stress response in fish, potentially inhibiting growth and even leading to mortality. Low temperature stress significantly impacts various life processes of organisms, including growth and development, energy metabolism, and reproductive development. In recent years, there has been increasing research on the effects of low-temperature stress on organisms, with a greater focus at the molecular level. Low temperatures induce a decrease in cellular activity and even growth arrest, resulting in apoptosis. Apoptosis is a form of programmed cell death ubiquitous in the biological world, and it plays a vital role in maintaining the normal physiological function of an organism. Once apoptosis occurs, it is irreversible and cannot be stopped. Temperature regulation is crucial for fish, and current knowledge of the role of leptin in fish primarily focuses on the regulation of feeding, lipid energy metabolism, and reproduction, with limited reports on its role in temperature regulation.

Leptin, a protein hormone produced by adipocytes, has long been recognized as a product of the *obese* gene, which regulates organismal metabolism, neuroendocrine function, and other physiological processes. In animals, it exerts diverse physiological functions related to cell growth, proliferation, apoptosis, and metabolism. The homology of the *leptin* gene in fish is relatively low compared to that in mammals, and multiple leptin proteins encoded by multiple *leptin* genes can be produced due to genomic duplication events. Regarding the role of leptin in temperature regulation, more research has been conducted on mammals, mainly related to the regulation of energy metabolism and the influence on temperature adaptation evolution. There has been limited research on the regulatory mechanism of leptin in fish during cold stress.

*Dissostichus mawsoni* belongs to the group of Antarctic vertebrates and has lived in the cold and isolated environment of the Southern Ocean at a temperature of  $-1.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  for  $\sim 30$  million years. It has adapted to the extremely low temperatures of the surrounding Antarctic waters and is an excellent material and living fossil for studying temperature adaptation mechanisms in extreme environments. Compared with other fish species at the same depth, it has a large amount of lipid deposition in its subcutaneous and muscle tissues, mainly triglycerides (TGs). Predictions based on 3D structural models suggest that the partial absence of the *lepB* structure in *D. mawsoni* leads to only three  $\alpha$ -helices, and *lepA* has four  $\alpha$ -helices and a short and twisted E-helix as well as several irregular turns, forming a hollow barrel-like structure, which differs from the protein structure of all other known leptins. Moreover, previous studies have found a close correlation between *lepA* and temperature evolution, leading to speculation that Antarctic fish *lepB* may play an essential role in

① Corresponding author: CHEN Liangbiao, E-mail: lbchen@shou.edu.cn

low-temperature adaptation.

In this study, a eukaryotic expression vector of the Antarctic toothfish *lepB* gene was constructed and transfected into ZFL cells to establish a model of overexpression of the *D. mawsoni lepB* (*DMLB*) gene in the ZFL cells. After conducting a cell culture temperature experiment, 10 °C was selected as the significant difference temperature. Following 2 weeks of cold stimulation, the *DMLB* experimental group cells remained viable, whereas the control group cells died. The results indicated that the overexpression of the *DMLB* gene provided strong resistance to low-temperature conditions. By detecting changes in cell proliferation, apoptosis, reactive oxygen species (ROS) level, and ATP content under low-temperature stress, it was discovered that *DMLB* maintained cell growth and proliferation, reduced ROS production, and inhibited cell apoptosis. *DMLB* effectively maintained ATP levels in cells under low-temperature stress, which helps maintain the mitochondrial status and reduce the effects of apoptosis and necrosis caused by low-temperature stress, thereby protecting cells from cold stress. Additionally, the results of Oil red O staining and TG detection suggested that the *DMLB* gene may slow down the depletion of cell lipids under low-temperature stress, perhaps by lowering lipid metabolism to preserve lipids to cope with low-temperature damage. Consequently, the *DMLB* gene may be functional in the cold resistance of *D. mawsoni* by protecting cells from damage at low temperatures, but its specific molecular regulatory mechanism needs to be further explored. In this study, 10 °C was used as the key temperature, providing a basis for understanding the regulation of energy homeostasis by the *lepB* gene in *D. mawsoni* under low-temperature stress. This study explored the role of the *lepB* gene in the adaptation of *D. mawsoni* to extremely low-temperature environments and provided fundamental data for further study of the evolution of similar species in the Antarctic region. Furthermore, this study enriched the basic data related to low-temperature tolerance and provided reference materials for further investigation of the low-temperature tolerance mechanism of leptin in Notothenioids, as well as laid a foundation for further study of the mechanism of leptin in temperature regulation.

**Key words** *Dissostichus mawsoni*; *LeptinB*; Low-temperature stress; Apoptosis; Lipid metabolism.