

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16358

duspl 敲降对低温诱导斑马鱼 ZF4 细胞凋亡的作用

牛虹博, 胡鹏, 程鹏丽, 储旭, 胡春兰, 陈良标

上海海洋大学 水产与生命学院, 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306

摘要: 为了研究双特异性磷酸酶 (dual-specificity phosphatase 1, *duspl*) 基因与鱼类低温诱导的细胞凋亡之间的关系, 本研究经 *EcoRI* 和 *AgeI* 酶切构建 *plko.1-duspl-shRNA1*, *plko.1-duspl-shRNA2*, *plko.1-negative control(nc)*, *plko.1-EGFP* 的重组质粒, 并分别与慢病毒包装质粒 *pCMV-DR8.9.1*、*pCMV-VSVG* 共同转染至 293T 细胞中, 经 293T 细胞包装的病毒, 感染斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎成纤维样细胞 (zebrafish embryos fibroblast like cell line, ZF4), RT-PCR 检测表明 *duspl* 成功被敲降。经嘌呤霉素筛选获得稳定表达细胞系, 将细胞于 28℃ 培养 (正常对照组) 或经 10℃ 低温处理 10 d, 使用 annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) 双色标记流式细胞术检测 ZF4 细胞凋亡情况。结果显示: 低温胁迫下 *duspl* 敲降的细胞凋亡 (*duspl-shRNA1* 敲降, *duspl-kd1*; *duspl-shRNA2* 敲降, *duspl-kd2*) 比例较 nc 组显著上调, 其中早期凋亡和晚期凋亡细胞比例 *duspl-kd1* 显著高于 nc 组, 并且 *duspl-kd1* 活细胞数显著低于 nc 组 ($P < 0.05$), 进一步证明 *duspl* 参与鱼类冷应激过程, 并在低温情况下保护细胞。该研究为后期对斑马鱼细胞低温胁迫实验奠定了基础, 其中 *duspl* 基因沉默型斑马鱼细胞在 10℃ 低温处理 10 d 凋亡数显著大于对照组, 证明 *duspl* 在细胞凋亡信号通路中起到重要调控作用, 为低温下研究斑马鱼基因的分子机制提供新的思路。

关键词: 双特异性磷酸酶; 慢病毒; shRNA; ZF4 细胞; 凋亡; 低温胁迫

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-0995-08

温度与鱼类循环系统和呼吸系统关系最为密切, 是影响鱼类生存的重要环境因子之一。环境温度发生变化会对鱼类生理学和心血管功能产生影响^[1], 下降到生存范围极限, 会影响呼吸系统和生理行为, 甚至可导致死亡^[2-3]。因此研究它们温度适应的基因调控机制, 对了解生物体适应寒冷的进化等有重要意义。

斑马鱼 (*Danio rerio*) 作为鱼类研究的模式生物, 具有个体小、易于饲养、生长速度快、繁殖能力强、周期短等生物学优点, 并且斑马鱼的基因组全序列已公布。斑马鱼胚胎成纤维样细胞系 (zebrafish embryos fibroblast like cell line, ZF4) 来源于发育 1 d 的斑马鱼胚胎^[4]。目前, 对 ZF4 细胞低温处理会影响丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族中 p38 和 JNK

蛋白的活性, 并且在 10℃ 低温处理 3 d 达到最高水平^[5]。但是相关基因诱导鱼类低温下 MAPK 家族蛋白活性增加还不清楚。

双特异性磷酸酶 (dual-specificity phosphatase 1, *duspl*) 是 MAPK 家族蛋白的负调控基因, 参与大量的生物学过程, 包括细胞信号传递、软骨细胞生长、细胞新陈代谢等。目前, 已有研究发现 *duspl* 可以通过调控 EKR 来抑制肝癌细胞生长^[6], 并且已经被证实它的表达模式由癌相关基因 *p53* 调控^[7]。在 GC-7901、MCF-7、HeLa、A549、PC-2、HepG2 癌细胞中 *duspl* 抑制 p-ERK (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase) 的表达^[8-9], 细胞存活信号 ERK 活性下调会促使 p38 调节凋亡^[10]。*duspl* 在鱼类中的相关研究还较少, 关于 *duspl* 参与鱼类低温反应的分子机制尚不明确。

收稿日期: 2016-12-04; 修订日期: 2017-01-10。

基金项目: 国家基金委重点项目 (31130049); 国家自然科学基金面上项目 (31572611); 上海高校水产高峰学科建设项目。

作者简介: 牛虹博 (1989-), 女, 硕士, 专业方向为水产养殖。E-mail: 1039428340@qq.com

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

细胞凋亡(apoptosis)是 1972 年由 Kerr 教授根据形态学特征首先提出的,是一种由基因控制的细胞自主性死亡方式,也是一种主动的、程序性的、细胞固有的生物学过程^[11]。急性髓白血病细胞系(acute myeloid leukemia, AML)在被化学药物处理后有丝分裂蛋白激酶信号通路(ERK, AKT, DUSP1/4)表达量显著降低, DUSP 1/4 被抑制, 激活 p38 信号通路, 从而激发细胞凋亡^[12-13]。本实验主要探究低温条件下, 敲降 *dusp1* 基因对斑马鱼细胞凋亡通路的影响, 为研究鱼类低温下响应机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和细胞培养方法

ZF4 细胞(american type culture collection)采用含有 10%的胎牛血清(Gibco), 1%的双抗[含有青霉素(10000 IU)和链霉素(10000 μg/mL)] (Hyclone), 89% DMEM/F12(含 1%谷氨酰胺, Hyclone), 28℃, 5% CO₂, 95%湿度进行培养。每 2 天换液 1 次, 当细胞长至 90%用 0.25% Trypsin(Gibco)消化, 1:2 传代后继续培养, 实验所用的细胞均为 4~6 代。

293T 细胞是人肾上皮细胞系, 采用含有 10%胎牛血清及 1%的双抗, 89% DMEM 高糖培养基, 37℃, 5% CO₂, 95%湿度进行培养。

1.2 主要试剂和仪器

Gel Extraction Kit、质粒小提试剂盒均购自 OMEGA Bio-Tek 公司; SYBR Green、*Taq* 酶、DL2000 DNA Marker、DL5000 DNA Marker、反转录试剂盒等均购自 TaKaRa 公司; T4 ligase、限制性内切酶 *Age*1、*Eco*RI 购自 NEB 公司; 胎牛血清购自 Gibco 公司; 转染试剂 FUGENE 购自 promega 公司; Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 购自 Vazyme 公司; 嘌呤霉素(puromycin dihydrochloride

from *Streptomyces alboniger*)购自 Sigma 公司; 其他常规试剂由省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室提供。

主要仪器: 高温细胞培养箱(Galaxy170S)、低温细胞培养箱(Galaxy170R)均购自 Eppendorf 公司; Accuri C6 流式细胞仪购于 BD 公司。

1.3 特异性 shRNA 序列的设计

通过 siRNA 选择工具网站 <http://www.broadinstitute.org/rnai/public/seq/search> 对 *dusp1* 编码区进行分析, 选择在基因内部无复杂二级结构和重复序列的区域, 进行靶位点设计, 在编码区第 311 和 904 碱基处分别选择两个不同的靶点, 长度是 21 bp, 并设计了 2 个单链短发夹状寡核苷酸干扰序列 shRNA 分别命名为 sh-RNA1、sh-RNA2, 并且设计一个不起任何作用的茎状发夹结构为阴性对照, 命名为 nc。寡核苷酸序列合成主要由生物工程(上海)股份有限公司完成。shRNA 包括两个短反向重复序列, 中间由一茎环(loop)序列分隔的, 组成发夹结构, 由 pol III 启动子调控。在 CDS 区后连接 5~6 个胸腺嘧啶 T 作为 RNA 聚合酶 III 的转录终止子。shRNA 序列两个互补的寡核苷酸 oligo 两端含有 *Age*1 和 *Eco*RI 限制性酶切位点。sh-RNA 的详细信息见表 1。

1.4 慢病毒干扰载体的构建

将获得的 3 对引物 oligo 用去离子水稀释浓度为 10 μmol/L, 每对引物各取 25 μL 于 EP 管中, 利用 PCR 仪进行退火, 退火程序: 37℃孵育 30 min, 95℃继续孵育, 5 min 后每分钟降 5℃, 直到 25℃合成双链 DNA。将 plko.1(含有嘌呤霉素抗性)慢病毒表达载体, 选取 *Age*1 和 *Eco*RI 两个位点进行双酶切, 胶回收线性化载体, 与合成的双链 DNA 混匀, 16℃连接 6 h。将连接产物进行转化, 挑选单克隆, 用小提试剂盒提取质粒, 送公司测序。

表 1 shRNA 寡核苷酸序列
Tab. 1 The single-strand oligo sequences for shRNA

单核苷酸名称 oligo name	单链寡核苷酸序列(5'-3') the single-strand oligo sequence (5'-3')
sh-RNA1-F	CCGGGCTCCAGTAATGTGCGCTTCACTCGAGTGAAGCGCACATTACTGGAGCTTTTTG
sh-RNA1-R	AATTCAAAAAGCTCCAGTAATGTGCGCTTCACTCGAGTGAAGCGCACATTACTGGAC
sh-RNA2-F	CCGGGAGGCCATCGAATTTATTGATCTCGAGATCAATAAATTCGATGGCCTCTTTTTG
sh-RNA2-R	AATTCAAAAAGAGGCCATCGAATTTATTGATCTCGAGATCAATAAATTCGATGGCCTC
nc-F	CCGGCCTCTTACCTCAGTTACAATTCTCGAGAATTGTAAGTGAAGAGGTTTTTG
nc-R	AATTCAAAAACCTCTTACCTCAGTTACAATTCTCGAGAATTGTAAGTGAAGAGG

1.5 转染、病毒感染及细胞低温处理

将实验组含目的基因的重组质粒和阴性对照组(nc)、空白对照组(plko.1-EGFP), 分别和慢病毒包装质粒 pCMV-DR8.9.1、pCMV-VSVG 共同转染到铺板密度达到 70%的 293T 细胞(100 mm 培养皿)中, 经过 37℃培养箱中培养 12 h, 更换完全培养基, 继续培养 24 h 后, 收集培养基于离心管中, 1250 r/min 离心 5 min, 将 293T 细胞离心到管底部, 吸取上清感染密度达到 80%的 ZF4 细胞, 加入 10 μg/mL 聚凝胺(polybrene), 增强感染效率。病毒感染 ZF4 细胞 48 h 后更换新鲜培养基, 为了筛选出可以进行稳定遗传的细胞, 加入嘌呤霉素 0.37 μg/mL 进行筛选, 4 d 后, 将细胞消化下来分到 35 mm 培养皿中, 10℃低温培养箱中处理 10 d。

1.6 RT-PCR 敲降率

为了检测感染后的细胞 *dusp1* 基因的敲降率, 采用 TRIzol 提取法, 提取嘌呤霉素筛选第 2 天的细胞 RNA, 根据所设计的 shRNA, 在靶点上下游设计相对应的引物见表 2。以 actin 为内参, 以反转录产物 cDNA 为模板, 使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)试剂盒, 罗氏 Real-Time PCR 定量仪, 测定敲降 *dusp1* 细胞和对照细胞 *dusp1* 基因的相对表达量, 每个样品做 3 个重复, 基因表达量用相对定量方法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)计算。

表 2 RT-PCR 引物信息
Tab. 2 Sequences information of primers used for real-time quantitative PCR

引物 primer		引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
KD- <i>dusp1</i> -1	F	ATATGTTGGAGGGAGACGAC
KD- <i>dusp1</i> -1	R	ACAGAAGCCTGTTCTCTGGTGT
KD- <i>dusp1</i> -2	F	ACTGTCCCAACCACTTTGAAG
KD- <i>dusp1</i> -2	R	GTTGGTGCGCATCAGATAAG
Actin	F	GATCTGGCATCACACCTTCTAC
Actin	R	TCTTCTCCCTGTTGGCTTTG

1.7 细胞凋亡检测

收集低温处理 ZF4 细胞上层培养基于 EP 管中, 离心, PBS 洗 2 次, 用 Trypsin 消化贴壁的细胞 1 min 后, 加入培养基终止消化, 离心收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 离心, 每次均在 300

rcf, 4℃离心 5 min。加入 1×Binding Buffer 使得细胞重悬, 最后加入 Annexin V-FITC 和 PI Staining Solution, 轻轻混匀, 避光、室温反应 10 min 染色。用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.8 数据统计分析

所有实验结果均来自至少 3 次独立实验, 图中所示结果均为均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)。T-test 法用于检测低温处理的显著性, 两两之间的显著差异($P < 0.05$)利用 two-tailed 法多重比较。

2 结果与分析

2.1 plko.1-*dusp1* 重组质粒检测

为了研究 *dusp1* 是否能够参与鱼类低温冷应激过程, 本研究构建 plko.1-*dusp1* 慢病毒表达载体, 在细胞内对 *dusp1* 进行敲降。利用 VECTOR 软件对测序结果进行 blast 分析, 结果表明, 针对 *dusp1* mRNA 设计的两段 shRNA 序列(sh-RNA1, sh-RNA2)及无意义序列(negative control, nc)成功插入到 plko.1 表达载体上(图 1 a~c)。*dusp1*-shRNA 由 U6 启动, 带嘌呤霉素抗性, 经 HIV-1 包装成病毒进行敲降(图 1 d)。

2.2 *dusp1* 的敲降及检测

为了检测 *dusp1*-shRNA 病毒经 293T 细胞包装的效率, 将 plko.1-EGFP 与病毒包装质粒 pCMV-DR8.9.1、pCMV-VSVG 共转染到 293T 细胞中, 荧光监测结果表明, 病毒包装质粒在 293T 细胞中表达效率达到 80%以上(图 2)。并用含有 plko.1-EGFP 的病毒感染斑马鱼细胞, 嘌呤霉素筛选得到稳定表达细胞系, 监测 ZF4 感染效率达到 60%以上(图 2)。

为了检测 *dusp1*-shRNA 病毒感染的 ZF4 细胞中 *dusp1* 的敲降效率, 对 *dusp1* 敲降的细胞进行 RT-PCR 检测。结果表明, *dusp1* 敲降的 *dusp1*-kd1、*dusp1*-kd2 细胞中, *dusp1* mRNA 水平显著下调, *dusp1*-kd1 下调 45%, *dusp1*-kd2 下调 39%(图 3)。以上结果表明 ZF4 细胞中的 *dusp1* 被成功敲降。

2.3 细胞凋亡情况检测

为了检测低温胁迫下 *dusp1* 是否参与细胞凋亡过程, 将 *dusp1* 敲降的细胞 *dusp1*-kd1、*dusp1*-kd2 与对照组 nc-kd 细胞进行低温处理。从流式

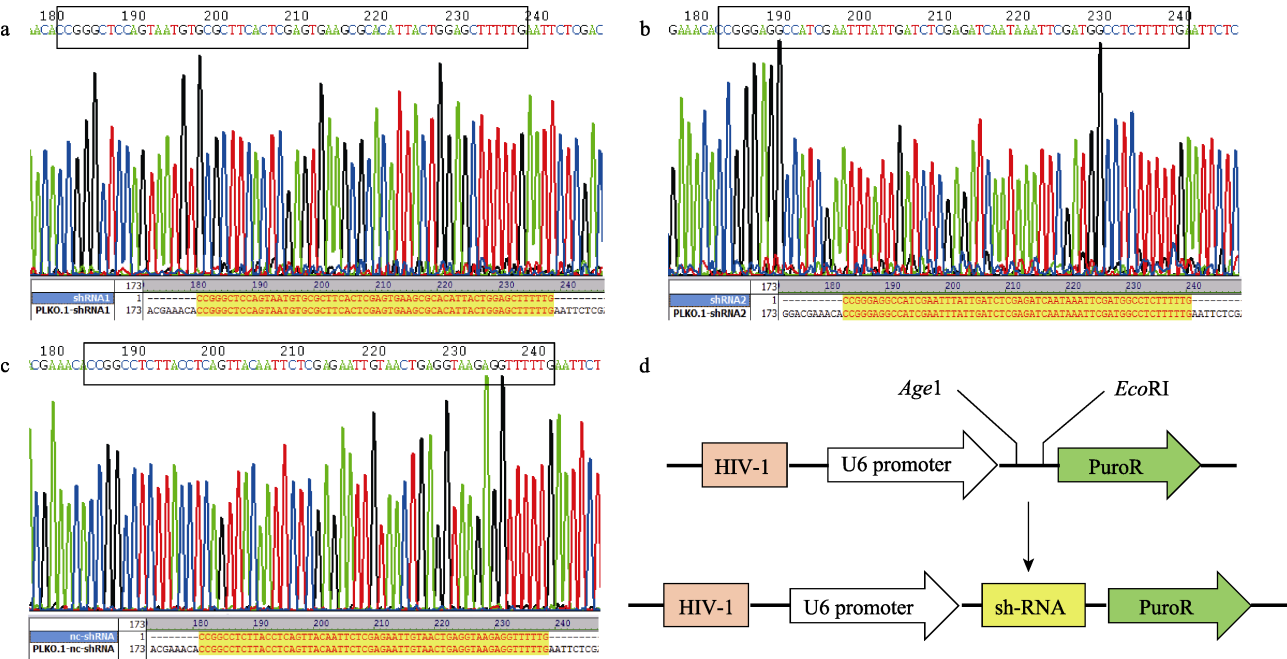


图 1 慢病毒干扰载体 plko.1-shRNA 测序结果及构建示意图

a. *dusp1*-shRNA1 序列比对结果; b. *dusp1*-shRNA2 序列比对结果; c. nc-shRNA 序列比对结果;
d. 慢病毒表达载体 plko.1-shRNA 构建示意图。

Fig. 1 The sequencing result for the shRNA RNAi vector plko.1-shRNA and schematics
a. *dusp1*-shRNA1 sequence blast result; b. *dusp1*-shRNA2 sequence blast result; c. nc-shRNA sequence blast result;
d. the schematics of lentiviral expression vector plko.1-shRNA.

细胞术检测结果可以看出, 28℃ 细胞大部分集中在活细胞区域, 10℃ 低温处理后凋亡数显著增加。

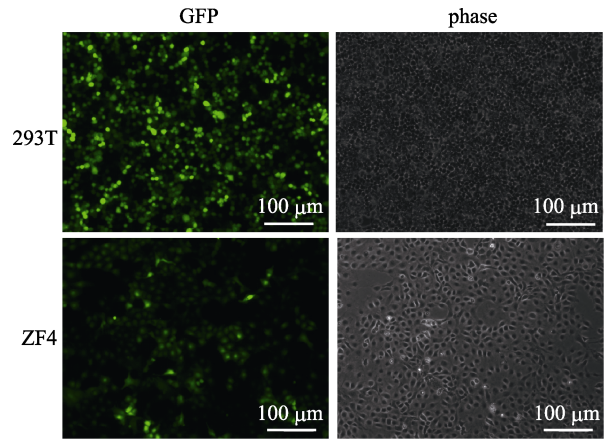


图 2 慢病毒表达载体 plko.1-EGFP 在 293T 细胞表达情况及感染 ZF4 稳定表达的细胞荧光监测
GFP 表示绿色荧光视野; phase 表示正常光视野, 上方为 293T 细胞, 下方为 ZF4 细胞。

Fig. 2 The expression of the lentiviral vector plko.1-EGFP in 293T cells and ZF4 stable expression cell fluorescence monitoring
GFP denotes green fluorescent vision. Above for 293T cells and below for ZF4 cells.

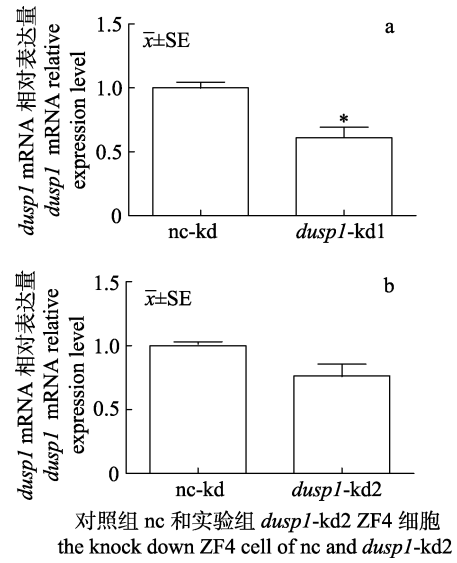


图 3 *dusp1* 在 ZF4 细胞中的相对表达

a. *dusp1*-kd1 的 *dusp1* 相对表达量; b. *dusp1*-kd2 的 *dusp1* 相对表达量。图中数据来自至少 3 次独立的生物学重复, *表示 *dusp1* 敲降组与 nc 相比差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Relative mRNA expression of *dusp1* in ZF4 cells
a. The *dusp1* relative mRNA expression of *dusp1*-kd1; b. The *dusp1* relative mRNA expression of *dusp1*-kd2. Data shown are of at least three independent experiments. *denotes significant differences between knock down *dusp1* group and control group ($P < 0.05$).

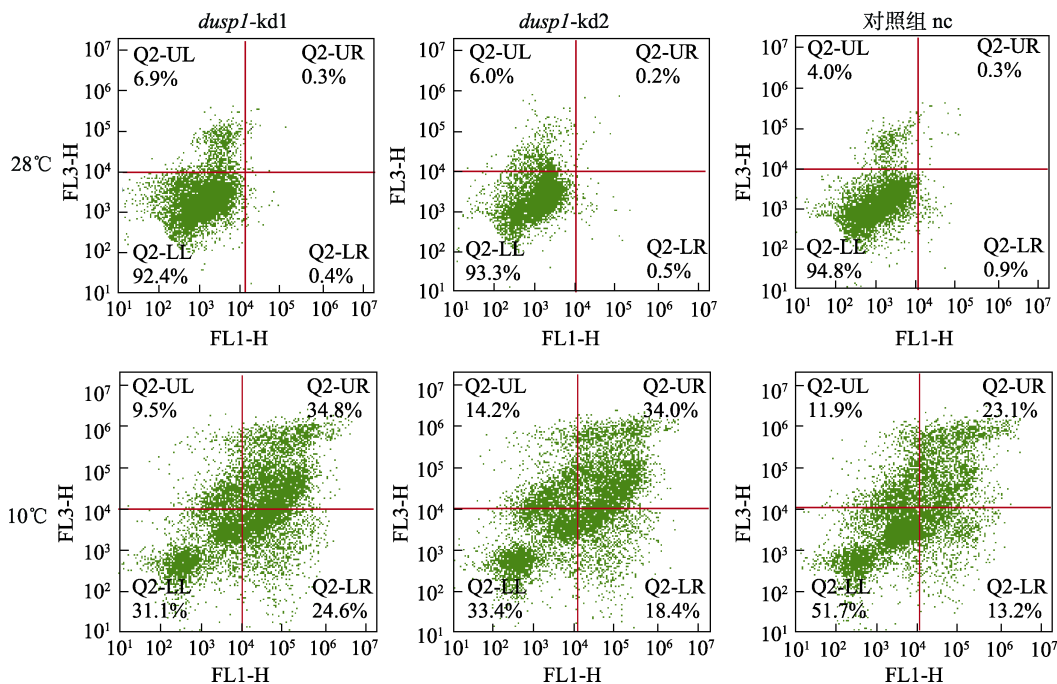


图 4 流式细胞术检测敲降细胞凋亡结果
UL 表示死细胞; LL 表示活细胞; UR 表示晚期凋亡; LR 表示早期凋亡。
Fig. 4 Knock down cells apoptosis by flow cytometry
UL denotes death cells; LL denotes living cells; UR denotes late apoptosis cells; LR denotes early apoptosis cells.

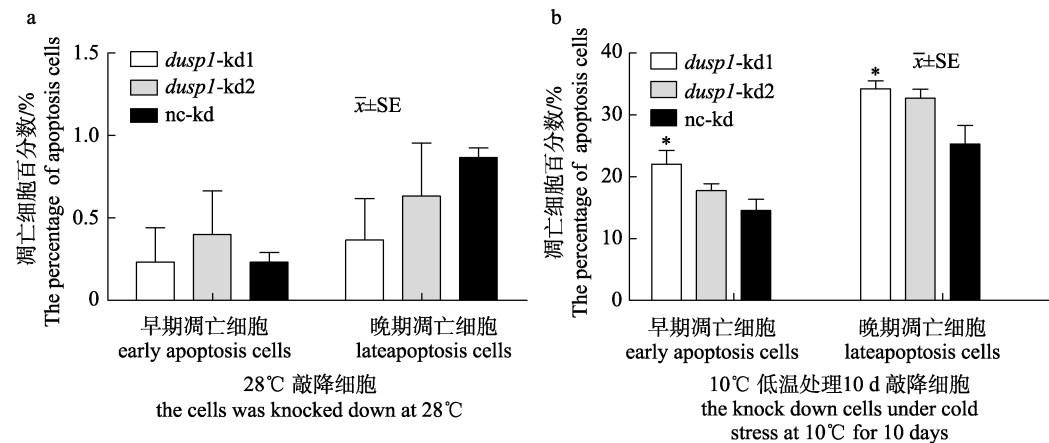


图 5 流式细胞术检测敲降细胞百分数统计结果
a. 流式细胞术检测 28°C 敲降的细胞统计结果; b. 流式细胞术检测 10°C 低温处理 10 d 的敲降细胞统计结果。
图中数据来自至少 3 次独立的生物学重复。*表示 *dusp1* 敲降组与阴性对照组 nc 差异显著 ($P < 0.05$)。
Fig. 5 The statistic results of the rate of knock down cells detected by flow cytometry
a. Knock down cells statistic results at 28°C by flow cytometry; b. Knock down cells statistic results at 10°C for 10 days by flow cytometry. Data shown are of at least three independent experiments.
*denotes significant differences between knock down *dusp1* group and control group (nc-kd) ($P < 0.05$).

对凋亡情况进行统计分析, 28°C 敲降细胞对照组与 *dusp1* 敲降细胞, 早期凋亡数和晚期凋亡数均无显著性差异(图 5a), 经 10°C 低温处理后 *dusp1*-kd1 与 nc 组相比, 早期和晚期细胞, 凋亡数显著增加。以上结果表明, *dusp1* 在低温下参与

细胞应激过程, 并保护细胞, 缓解细胞发生凋亡。

3 讨论

温度可以调控鱼类的基因表达, 影响鱼类的生命活动。在早期研究中, Gracey 等^[14]用鲤(*Cyp-*

rinus carpio)做了低温处理实验。将鲤分别置于 23℃、17℃、10℃各 22 d, 对照是 30℃的鲤, 然后取 7 个组织进行 RNA-seq 转录组测序, 在对基因进行聚类后, 作者找到了 3461 个冷调控基因, 其中 1949 个与已知的冷调控基因是同源的, 但是对这些基因没有做深入研究。胡鹏等^[15]分别在 18℃和 10℃对斑马鱼进行低温处理 12 h, 发现斑马鱼 18℃时活动比较正常, 温度降至 10℃时开始游动缓慢, 在 10℃取 8 个组织进行 RNA-seq, 对低温表达谱分析后, 得到 34 个基因类群和 1943 个低温下差异表达的基因。这提示斑马鱼为了适应低温环境会通过基因调控影响生理变化。根据这些研究笔者选取了 10℃作为低温处理的温度点。10℃低温处理的细胞与 28℃处理细胞相比死细胞数显著增多, 细胞凋亡数也显著增多(图 4)。显微镜下观察可以看到低温处理的 ZF4 细胞出现皱缩、悬浮等形态变化。之前本课题组对斑马鱼和罗非鱼进行低温处理, 发现在 8℃低温处理 0 h、6 h、12 h, 高表达基因大量富集在新陈代谢、嘧啶代谢、胰岛素信号通路、FoxO 信号通路中, 其中凋亡信号通路在低温处理 6 h、12 h 均有富集, 并且发现, 差异表达的基因 *dusp1* 在斑马鱼中, 随着低温处理时间的增加, 表达量逐渐增加^[16]。这提示 *dusp1* 在斑马鱼低温应激过程中, 通过高表达来缓解细胞应激过程, 与细胞凋亡存在密切的联系。

Zhang 等^[17]在小鼠骨髓瘤细胞中, 用慢病毒高表达 shRNA 的方法, 能够有效的抑制 *Hoxa9* 的表达。本研究使用同样的方法, 设计两个不同的靶点, 在 ZF4 细胞中敲降 *dusp1*, 有效抑制 *dusp1* 的表达。Kang 等^[18]分析发现, 在人卵巢癌细胞, 用去甲状腺诱导 *dusp1* 基因表达是通过调节 ADRB2(cAMP-PLC-PKC-CREB)信号通路活性抑制 JNK 磷酸化来阻止细胞凋亡。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor alpha TNF)可以激活 p38 MAPK 信号通路, 进而诱导细胞凋亡^[19-21]。以上的研究都在癌细胞中发现 *dusp1* 可以抑制细胞凋亡和癌细胞生长。本研究在 ZF4 细胞中同样发现 *dusp1* 可以保护细胞发生凋亡, 并且得到了一个新的发现, 在 28℃培养的 *dusp1* 敲降组细胞与对照组细胞均未检测到凋亡信号(图 5a), 而在 10℃

低温处理 10 d 后, 发现 *dusp1* 敲降的早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞比例显著高于对照组(图 5b), 证明 *dusp1* 可以在低温下保护细胞, 缓解应激反应。*dusp1* 是 MAPK 家族蛋白负调控基因, 抑制 p38 磷酸化作用^[22]。本研究敲降 *dusp1*, 经低温处理后, 可能激活 p38 信号通路, 促进 ZF4 细胞发生凋亡。

本研究设计 kd1 和 kd2 两个靶点, kd1 与对照相比 *dusp1* 表达量显著降低, kd2 可能由于脱靶效应导致敲降效率不明显(图 3)。低温处理下 kd2 比对照凋亡数增加, 但是无显著性差异(图 5b), kd1 和 kd2 靶点分别设计在 *dusp1* 编码区基因的前端和末端, 推测靶点位于末端导致脱靶效率较高, 敲降率不明显。总之, 本研究成功构建了 *dusp1* 干扰载体, 通过对斑马鱼细胞的低温胁迫, 在 10℃低温处理下, 发现 *dusp1* 被抑制的斑马鱼细胞凋亡数显著高于对照组, 进一步证明了 *dusp1* 参与鱼类低温应激过程, 抑制细胞凋亡, 为研究鱼类低温适应的分子机制提供一个很好的切入点。

参考文献:

- [1] Donaldson M R, Cooke S J, Patterson D A, et al. Cold shock and fish[J]. J Fish Biol, 2008, 73(7): 1491-1530.
- [2] Park J Y, Han K H, Cho J K, et al. Survival rate and hematological responses with temperature changes of red spotted grouper, *Epinephelus akaara* in South Korea[J]. Dev Reprod, 2016, 20(2): 103-112.
- [3] Bonga S W. The stress response in fish[J]. Physiol Rev, 1997, 77(3): 591-625.
- [4] Driever W, Rangini Z. Characterization of a cell line derived from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos[J]. In Vitro Cell Dev Biol-Anim, 1993, 29(9): 749-754.
- [5] Xu Q, Han B, Luo J, et al. The effects of cold stress on ROS production and expression of MAPK proteins in zebrafish ZF4 cells[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(4): 771-776. [许琼琼, 韩兵社, 罗军涛, 等. 低温胁迫诱导斑马鱼 ZF4 细胞 ROS 及 MAPK 相关蛋白表达的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 771-776.]
- [6] Calvisi D F, Pinna F, Meloni F, et al. Dual-specificity phosphatase 1 ubiquitination in extracellular signal-regulated kinase-mediated control of growth in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4192-4200.
- [7] Liu Y X, Wang J, Guo J, et al. DUSP1 is controlled by p53 during the cellular response to oxidative stress[J]. Mol Can-

- cer Res, 2008, 6(4): 624–633.
- [8] Cheng P, Zhu S, Jun L, et al. Production of DUSP1 protein using the baculovirus insect cell expression system and its in vitro effects on cancer cells[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(6): 1715–1719.
- [9] Wang J, Yin D P, Liu Y X, et al. Dual specificity phosphatase 1/CL100 is a direct transcriptional target of E2F-1 in the apoptotic response to oxidative stress[J]. Cancer Res, 2007, 67(14): 6737–6744.
- [10] Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-García C, et al. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer[J]. Oncogene, 2006, 25(23): 3335–3345.
- [11] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Brit J Cancer, 1972, 26(4): 239–257.
- [12] Pigazzi M, Manara E, Beghin A, et al. ICER evokes Dusp1-p38 pathway enhancing chemotherapy sensitivity in myeloid leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(4): 742–752.
- [13] Ashwell J D. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(7): 532–540.
- [14] Gracey A Y, Fraser E J, Li W, et al. Coping with cold: An integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(48): 16970–16975.
- [15] Hu P, Liu M, Zhang D, et al. Global identification of the genetic networks and cis-regulatory elements of the cold response in zebrafish[J]. Nucl Acids Res, 2015, 43(19): 9198–9213.
- [16] Hu P, Liu M, Liu Y, et al. Transcriptome comparison reveals a genetic network regulating the lower temperature limit in fish[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28952.
- [17] Zhang J, Han B, Li X, et al. Distal regulation of c-myc expression during IL-6-induced differentiation in murine myeloid progenitor M1 cells[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(9): e2364.
- [18] Kang Y, Nagaraja A S, Armaiz-Pena G N, et al. Adrenergic Stimulation of DUSP1 impairs chemotherapy response in ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(7): 1713–1724.
- [19] Shen J, Zhang Y, Yu H, et al. Role of DUSP1/MKP1 in tumorigenesis, tumor progression and therapy[J]. Cancer Med, 2016, 5(8): 2061–2068.
- [20] Chen N N, Wei F, Wang L, et al. Tumor necrosis factor alpha induces neural stem cell apoptosis through activating p38 MAPK pathway[J]. Neurochem Res, 2016, 41(11): 3052–3062.
- [21] Grethe S, Ares M P, Andersson T, et al. p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L)[J]. Exp Cell Res, 2004, 298(2): 632–642.
- [22] Kang Y S, Seok H J, Jeong E J, et al. DUSP1 induces paclitaxel resistance through the regulation of p-glycoprotein expression in human ovarian cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 478(1): 403–409.

The role of *dusp1* downregulation in apoptosis of zebrafish ZF4 cells under cold stress

NIU Hongbo, HU Peng, CHENG Pengli, CHU Xu, HU Chunlan, CHEN Liangbiao

College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University; Key laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The purpose of this study was to observe whether dual-specificity phosphatase 1 (*dusp1*) is involved in the apoptosis of zebrafish (*Danio rerio*) cells under cold stress. The recombinant plasmids plko.1-*dusp1*-shRNA1, plko.1-*dusp1*-shRNA2, plko.1- negative control, and plko.1-EGFP were constructed using the restriction enzymes *EcoRI* and *AgeI*. These plasmids were separately transduced into 293T cells together with the lentiviral packaging vectors pCMV-DR8.9.1 and pCMV-VSVG. The virus packaged by 293T cells was used to infect the ZF4 cell line derived from zebrafish, and analysis by real-time polymerase chain reaction showed that *dusp1* was knocked down. After puromycin selection for a stable *dusp1* knockdown ZF4 cell line, the cells were cultured at 28°C (normal temperature control) or 10°C (cold stress) for 10 days. Afterwards, they were stained with propidium iodide and annexin V-fluorescein isothiocyanate, then analyzed by flow cytometry. The results showed that the rate of apoptosis of the *dusp1*- knockdown cells increased significantly more under low temperature than that of the wild-type control cells did, as compared with the normal temperature control group. Furthermore, we designed two small hairpin RNAs named kd1 and kd2 based on the coding sequence of *dusp1*. Under cold stress, the frequencies of late and early apoptotic cells in the kd1-treated group were significantly higher, and the frequency of living cells was significantly lower, than those of the negative control group ($P<0.05$). The cells cultured at 28°C showed no significant difference in the rate of apoptosis according to *dusp1* silencing. However, under cold stress, apoptosis was significantly greater in the *dusp1*-silenced group than in the control group. *dusp1* is involved in several physiological processes of fish, and it negatively regulates MAPK family proteins; for example, it inhibits p38 phosphorylation. This paper provides a new insight into the regulation of the apoptotic response of fish cells under low-temperature conditions by *dusp1*. Taken together, the results suggest that suppressing *dusp1* expression may relieve the inhibition of the MAPK p38 signaling pathway, which promotes ZF4 cell apoptosis under cold stress.

Key words: *dusp1*; lentivirus; shRNA; ZF4 cells; apoptosis; cold stress

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