

DOI: 10.12264/JFSC2020-0601

吉富罗非鱼钙敏感受体基因的克隆、表达与其参与调控细胞凋亡的机制

李连歌¹, 曹哲明², 陶易凡², 张丽¹, 马俊蕾¹, 李鸣霄¹, 包景文², 朱昊俊²,
徐跑^{1,2}, 强俊^{1,2}

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要: 钙敏感受体(calcium-sensing receptor, CaSR)在 Ca^{2+} 刺激下可参与调控细胞凋亡等生理过程, 在机体适应逆境胁迫中发挥重要作用。为研究吉富罗非鱼(Genetically Improved Farmed Tilapia, GIFT)CaSR 基因的特点及其在缺氧胁迫下参与细胞凋亡的调控机制。本研究利用 RT-PCR 技术克隆了吉富罗非鱼 CaSR cDNA 全长序列, 利用 qRT-PCR 技术分析了该基因在不同组织中的表达模式, 并进一步检测了缺氧胁迫下(0.55 mg/L)肝脏中该基因和细胞凋亡相关基因 mRNA 的表达变化, 同时利用 ELISA 法检测了肝脏中抗氧化酶活性的变化, 以及通过 HE 和 TUNEL 染色法分别观察了肝细胞的形态变化和凋亡情况。结果显示, 吉富罗非鱼 CaSR cDNA 序列全长 3265 bp, 包括 21 bp 5'非编码区、2823 bp 开放阅读框和 421 bp 3'非编码区, 编码 940 个氨基酸。CaSR 基因 mRNA 在不同组织中均有表达, 其中肌肉中表达量最高, 肾脏次之; 组织切片观察发现缺氧可导致肝脏组织结构损伤, 促进肝细胞凋亡; 与对照组(5.0 mg/L)相比, 缺氧可增强 SOD、CAT 和 GSH-Px 抗氧化酶活性, 上调 CaSR mRNA 的表达, 并引起 Bcl-2、Caspase-3 和 P53 凋亡基因 mRNA 的表达变化。研究结果表明, CaSR 可能通过介导 Ca^{2+} 调控细胞凋亡, 从而参与吉富罗非鱼的缺氧应对机制。

关键词: 吉富罗非鱼; 钙敏感受体; 基因克隆; 缺氧胁迫; 细胞凋亡

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)09-1129-12

钙离子作为细胞内信号转导的第二信使, 与生物体内 Ca^{2+} 感应受体结合可调节多种生理过程^[1-2]。钙敏感受体(calcium-sensing receptor, CaSR)是 G 蛋白偶联受体(GPCRs)超家族中的一员, 1993 年首次在牛甲状旁腺中被研究证明具有 Ca^{2+} 传感器的作用^[3]。CaSR 基因在多种生物中广泛存在, 在与离子代谢调节有关的组织(如甲状旁腺、肾脏、骨骼等)中高表达^[4], 最主要的生物学功能是维持机体内环境钙稳态, 通过与 Ca^{2+} 等激动剂结合可启动不同 G 蛋白信号传导通路、调控细胞分泌、

基因表达、离子通道激活、细胞分化、增殖与凋亡等重要过程^[2,5-7]。

CaSR 与细胞凋亡的调控过程密切相关^[5,8]。目前 CaSR 在哺乳动物中的研究居多, Xing 等^[8]研究发现 CaSR 通过 G 蛋白偶联途径引起的钙超载可以激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)通路, 在细胞凋亡中发挥调控作用; Ran 等^[9]研究表明 CaSR 通过介导 PKC 和 PI3K/AKT 信号通路参与镉引起的大鼠成骨细胞钙稳态损伤, 并诱导 Caspase 依赖性细胞凋亡的发生; Yuan 等^[10]研究

收稿日期: 2021-01-19; 修订日期: 2021-03-10.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32002363); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD37, 2019ZY19, 2019JBFC01).

作者简介: 李连歌(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向水产生物技术. E-mail: liangeli768@gmail.com

通信作者: 强俊, 副研究员, 研究方向为水产动物健康养殖. E-mail: qiangj@ffrc.cn

发现随着大鼠心肌梗死持续时间的延长, CaSR 表达逐渐增加, 细胞凋亡程度显著升高, 且凋亡相关蛋白的表达水平受 CaSR 活性的调控。而鱼类中关于 CaSR 的功能的研究较为缺乏, 且多集中于离子转运和渗透调节方面^[11]。Qiang 等^[12]在研究缺氧条件下 miR-92a 对 CaSR 的靶向调控作用时发现, 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肝细胞中 CaSR 表达下调引起细胞中 Ca²⁺浓度以及细胞凋亡因子的转录水平明显降低, 细胞凋亡比例降低, 表明 CaSR 可参与鱼类应激调节。因此, 研究鱼类 CaSR 对细胞凋亡的调控作用可能有助于更多了解鱼类环境胁迫适应机制。

水产养殖中, 缺氧是常见环境应激因子之一。缺氧环境下鱼类体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量产生, 导致鱼类组织损伤, 严重影响鱼类的生长和存活^[13-14]。肝脏是能量和氧代谢的重要器官, 对溶氧变化较为敏感。急性低氧胁迫下大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[15]肝脏中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)等抗氧化酶的活性显著增强; 金鱼^[16](*Carassius auratus*)肝脏中 SOD 活性无显著变化, 但 CAT 和 GPx 活性显著升高。吉富罗非鱼(Genetically Improved Farmed Tilapia, GIFT)是我国南方地区重要的淡水养殖鱼类, 具有生长速度快、单位面积产量高等优势, 但由于恶劣天气、营养过剩、高密度集约化养殖等因素影响极易遭受缺氧胁迫^[17]。而目前有关缺氧胁迫对吉富罗非鱼影响的研究还不够完善。因此本研究以吉富罗非鱼为研究对象, 首先利用 RT-PCR 技术克隆获得 CaSR 基因 cDNA 全长序列, 通过 qRT-PCR 技术检测该基因 mRNA 在吉富罗非鱼各组织中表达情况, 研究缺氧胁迫下 CaSR 与细胞凋亡相关基因的表达变化, 同时利用 ELISA 法检测吉富罗非鱼肝脏中抗氧化酶活性的变化, 通过 HE 和 TUNEL 染色法观察肝细胞的病理学变化, 探究缺氧胁迫下 CaSR 对吉富罗非鱼细胞凋亡的调控作用, 以为吉富罗非鱼缺氧应对机制提供更多理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验吉富罗非鱼来自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心无锡宜兴基地, 实验开始前将鱼放入室内 450 L 循环水养殖桶中暂养, 水温(28±1) °C, pH 7.6±0.2。在此期间, 使用循环水连续充气保持水中溶氧≥5 mg/L, 每天投喂体质量 5% 的商品饲料(粗蛋白 29%, 粗脂肪 8%)两次(8:00 和 16:00)。

1.2 总 RNA 提取与吉富罗非鱼 CaSR 基因 cDNA 克隆

按照 Trizol Reagent 的使用方法提取吉富罗非鱼(体重约 30 g)肝脏组织样本总 RNA。通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测各组织总 RNA 的完整性, 紫外分光光度计检测 RNA 的浓度及纯度。以提取的肝脏组织总 RNA 作为模板, 利用 PrimeScript™ II 1st Stand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行反转录, 合成 cDNA 第一链, -20 °C 保存待用。根据 GenBank 提交的尼罗罗非鱼 CaSR 基因序列(XM_025910710.1)设计引物(表 1)。以吉富罗非鱼的 cDNA 为模板, 进行 CaSR 基因中间片段的克隆。PCR 反应体系: 10×LA PCR Buffer II (Mg²⁺) 2 μL, dNTP Mixture (2.5 μmol/L) 1 μL, 上下游引物各 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL, LA Taq 0.2 μL, ddH₂O 补至 20 μL; 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物回收、纯化, 挑选阳性克隆菌落送至无锡亦欣生物科技有限公司测序。CaSR 基因 5'和 3'端序列按同样方法进行克隆。

1.3 CaSR 基因序列分析

将 5'端序列、中间序列和 3'端序列拼接后得到 CaSR 基因 cDNA 全长序列。利用 NCBI ORF Finder 分析基因的开放阅读框; 利用 ExPASy、TMHMM 2.0、SignalP 和 NetNGlyc 1.0 等在线蛋白质分析网站预测基因编码氨基酸的理化性质和结构; 利用 NCBI 中 Blastn 和 Blastp 分别对序列进行核苷酸和氨基酸同源性检索, 通过 DANMAN 软件进行多序列比对后, 利用 MEGA 7.0 (Neighbor-joining 法)构建系统进化树, 分析比较不同物种间

表 1 基因克隆所用引物
Tab. 1 Primers used in gene cloning

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	扩增目标 amplification target
CASR-F	AGCACTAGTTTCAGGCCT	CASR partial sequence PCR
CASR-R	GTCATGATTTTGGTAGCTAG	
CASR-5-F	TCCAATCAAAGAAAAAAACC	CASR 5' PCR
CASR-5-R	GGTGTTCACACTTGCGAT	
CASR-3-F	CCGTGATGGCTCTAGGGTTT	CASR 3' PCR
CASR-3-R	CAGAATTTAGGTAATTTTACTT	
CASR-GSP-F	TCCGTGATGGCTCTAGGGTT	CASR qRT-PCR
CASR-GSP-R	CAGCTGAAACAAACTTGCCGT	
BCL-2-F	GACGATGATGCCAGGGAGAG	BCL-2 qRT-PCR
BCL-2-R	CTCAGAGTTCACTGGAGCGG	
CASPASE-3-F	TGAATTTCCGGGCCTGAGTG	CASPASE-3 qRT-PCR
CASPASE-3-R	GACAGACCGTCATCGTGCTT	
P53-F	TTTTCTCCTCCCTGTTTCGTGG	P53 qRT-PCR
P53-R	CGGGAACCTCATGCTTCACT	
β -actin-F	CCACACAGTGCCCATCTACGA	β -actin qRT-PCR
β -actin-R	CCACGCTCTGTCAGGATCTTCA	

亲缘关系的远近。

1.4 吉富罗非鱼不同组织 *CaSR* 基因表达分析

选取健康活泼发育良好的吉富罗非鱼(体重约 30 g) 6 尾, 深度麻醉(MS-222, 200 mg/L)后, 解剖取其脑、鳃、心脏、肝脏、肾脏、脾脏、胃、肠道以及肌肉组织, 液氮速冻后, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存用于 *CaSR* 不同组织表达分析。

1.5 缺氧胁迫实验与样品采集

依据前期对缺氧胁迫下吉富罗非鱼半致死浓度的实验研究^[18], 设置缺氧组(0.55 mg/L)和对照组(5.0 mg/L), 每个处理组设 3 个平行, 实验在 6 个养殖桶中进行, 每个桶内放置 40 尾大小均一、体质健康的吉富罗非鱼(体重约 30 g)。实验过程中, 每隔 2 h 用便携式溶氧仪检测 1 次水中溶氧, 通过充氮气和空气来调节水中溶解氧浓度, 使各组溶氧水平维持在设定范围内。实验周期为 96 h。分别在缺氧胁迫下第 0、2、8、24、48、96 小时, 从每个桶中随机取 3 尾鱼, MS-222 麻醉后剖取其肝脏组织, 选取部分组织样本放入液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存用于进行 qRT-PCR 和酶活性测定, 另选取部分组织样本放置于 4%多聚甲醛溶液中固定用于病理学观察。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测

利用 Trizol 法提取所采集的组织样本总 RNA。以提取的总 RNA 作为模板, 利用 PrimeScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa, 大连)进行反转录得 cDNA, 以此为模板, 根据获得的吉富罗非鱼 *CaSR* 基因序列设计荧光定量特异引物 CASR-GSP-F 和 CASR-GSP-R (表 1), 以已知罗非鱼 β -actin 基因作为内参^[19], 通过 qRT-PCR 技术检测 *CaSR* 基因 mRNA 在吉富罗非鱼不同组织中的表达情况, 以及缺氧胁迫下吉富罗非鱼肝脏中 *CaSR* 基因以及 *Bcl-2*、*Caspase-3* 和 *P53* 三种凋亡基因 mRNA 的表达变化。qRT-PCR 按照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus)试剂盒(TaKaRa, 大连)操作进行, 反应体系: $2\times$ SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μL , 上、下游引物各 1 μL , $50\times$ ROX reference Dye II 0.5 μL , cDNA 模板 2 μL , ddH₂O 补至 25 μL ; 反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。为确保引物特异性, 每次操作结束后确认 PCR 的扩增曲线及熔解曲线。根据荧光定量 PCR 测得的 C_t 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[20]计算各基因 mRNA 的相对表达量。各凋亡基因引物根据 NCBI 数据库罗非鱼基因组序列设

计(表 1)。

1.7 样品酶活性的测定

称取样品约 0.1 g 于 1.5 mL 无菌 EP 管(加研磨珠)中,分别加 9 倍体积的 0.1%磷酸盐缓冲液(预冷),振荡(60 Hz) 200 s,离心(4 °C, 9000 r/min) 20 min,后吸取上清液制成肝脏组织匀浆,利用上海朗顿生物有限公司酶联免疫检测(ELISA)试剂盒测定 SOD、CAT、GSH-Px 三种抗氧化酶活性。

1.8 HE 和 TUNEL 染色切片的制备

将肝脏组织于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h 后,经脱水、透明后用石蜡包埋,切片。再经二甲苯脱蜡后,分别进行 HE 染色和 TUNEL 染色^[21],封片后在显微镜下观察肝细胞的形态变化和凋亡情况。其中 TUNEL 染色检测中,正常未凋亡细胞的细胞核被苏木素染成蓝色,阳性凋亡细胞的细胞核为棕黄色。

1.9 统计与分析

实验所得数据均用平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。利用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行处理,先使用 Shapiro-Wilk 和 Levene 检验分析数据的正态性和方差同质性,然后使用独立样本 *t* 检验检测缺氧胁迫同一时间点实验组与对照组间的差异显著性,其中 $P < 0.05$ 具有显著差异;使用单因素方差分析(one-way ANOVA)检测同一处理组在不同时间点的差异显著性,以及不同组织 *CaSR* 基因的表达差异,当差异显著时,再用 Duncan 氏法进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 吉富罗非鱼 *CaSR* 基因全长 cDNA 序列特征和系统进化分析

拼接得到吉富罗非鱼 *CaSR* 基因 cDNA 序列全长为 3265 bp,包括 21 bp 5'非编码区、2823 bp 开放阅读框以及 421 bp 的 3'非编码区,编码 940 个氨基酸,预测的蛋白相对分子量为 105.6 kD,理论等电点 PI 为 5.98,其氨基酸组成中正电荷残基(Arg+Lys)数为 85,负电荷残基(Asp+Glu)数为 96。预测的 *CaSR* 蛋白结构具有 G 蛋白偶联受体超家族特有的七螺旋跨膜结构域,跨膜区前端为一长的、含 18 氨基酸信号肽序列和 11 个潜在 N-

糖基化修饰位点的 N 端胞外结构域,后端为一短的 C 端胞质尾(图 1)。

Blast 检索分析结果显示,吉富罗非鱼 *CaSR* 序列在核苷酸水平上与尼罗罗非鱼、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*, AY541693.1)的同源性最高,为 99%,与斑马拟丽鱼(*Maylandia zebra*, XM_004563992.1)、伯氏朴丽鱼(*Haplochromis burtoni*, XM_005922221.2)的同源性为 97%;在氨基酸水平上同源性均为 99%。选取不同物种 *CaSR* 的氨基酸序列构建了系统进化树(图 2)。结果显示 *CaSR* 基因进化树可分为鱼类和陆上动物两大支。吉富罗非鱼 *CaSR* 与同属鲈形目的鱼类聚为一支,其中与尼罗罗非鱼和莫桑比克罗非鱼的亲缘关系最近。总之吉富罗非鱼 *CaSR* 系统进化树中的亲缘关系符合传统分类学。

2.2 *CaSR* 基因在吉富罗非鱼不同组织中的表达

荧光定量 PCR 技术检测结果显示,*CaSR* 基因 mRNA 在吉富罗非鱼脑、鳃、心脏、肝脏、肾脏、脾脏、胃、肠道以及肌肉等 9 个组织中均有表达,其中肌肉组织中表达量最高,其次为肾脏、肠道、肝脏,心脏中表达量最少(图 3)。

2.3 缺氧胁迫对吉富罗非鱼肝脏组织的影响

2.3.1 HE 染色结果 利用 HE 染色法检测吉富罗非鱼肝脏组织的形态变化,结果显示,缺氧处理下肝脏表现为肝细胞无序,肝细胞质明显减少,肝细胞内空泡化显著(图 4b 和 4d)。

2.3.2 TUNEL 染色结果 利用 TUNEL 染色法检测肝脏组织的细胞凋亡情况,结果显示,与对照组(图 5a 和 5c)相比,缺氧组(图 5b 和 5d)肝脏组织中凋亡细胞数目明显增加,表明缺氧胁迫可显著促进吉富罗肝细胞凋亡。

2.4 肝脏组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 抗氧化酶活性变化

图 6 中分别显示了缺氧胁迫下吉富罗非鱼肝脏组织中 3 种氧化应激指标活力较对照组的變化。可以看到,随着缺氧胁迫时间的延长,处理组 SOD、CAT 和 GSH-Px 抗氧化酶活性均逐渐增强,在第 24、48、96 小时均维持在较高水平,其中 SOD 活性在第 24、48、96 小时较对照组差异显著($P < 0.05$),CAT 活性在第 24 小时和 96 小时较对

```

1          tccaatcaagaagaaaaaacATGAGACTGCTTCTGTATTATTGACACTGCTGGGGTCCAGTTATGTGATTTCAACGTAC
1  M R L L L Y Y L T L L G S S Y V I S T Y
82  GGACCCACCAGAGACAGATGACTGGTGATATTTACTTGGAGGCTTTTCCCCTTACACTTCGCATTCGATCCAAA
21  G P H Q R A Q M T G D I L L G G L F P L H F G I A S K
163  GATCAAGACCTTGCAGCCGGCCAGAATCCACCAGTGTGTCAGTTCAATTCCTGGTTCGTTGGCTAGGCCCATG
48  D Q D L A A R P E S T Q C V R F N F R G F R W L Q A M
244  ATTTTTCGATGAAGAGATTAATAACAGCAGTACACTCCTCCCAACATCACGCTGGGTACAGGATTTTGGACACATGC
75  I F A I E E I N S S T L L P I T L G Y R I F D T C
325  AACACTGTGCAAAAGCCTTGAAGCCACCTAAGTTTGTGGCCAAAATAAGATTGACTTTAAATTTAGATGAGTTT
102  N T V S K A L E A T L S F V A Q N K I D S L N L D E F
406  TGCAACTGCACTGATCACATCAACCATGCAAGTGTAGTAGGAGCTGCTGGATCTGCTTCCACAGCAGTTGCAAA
129  C N C T D H I P S T I A V V G A A G S A V S T A V A N
487  TTGGCTGGTCTACTTTATATCCCTCAGATCAGTACGCTGTGAACTCTAGCCGCTACTGAGCAACAAGAACTCAGTACA
156  L L G L L Y I P Q I S Y A S S S R L L S N K N Q Y K S
568  TTCATGAGAACCATTCTACAGATGAGTACCAGGCCACAGCCATGGCAGACATTATTGAGTACTTTCAGTGGAACTGGGTC
183  F M R T I P T D E Y Q A T A M A D I I E Y F Q W N W V
649  ATTGCTGTGGCCTCCGATGATGAGTATGGCGTCCAGGGATTGAAAAGTTTGGAGAAGGAGATGGAAGAGCAGACATCTGC
210  I A V A S D D E Y G R P G I E K F E K E M E R D T C
730  ATTCATCTAAATGAACTTATTCTCAGTGTGTTGAGGATCATGAAATCAAAGCTCTGGTTGACAGGATTGAGAATCCACA
237  I H L N E L I S Q C F E D H E I K A L V D R I E N S T
811  GCTAAAGTAATCGTTGTGTTGCCAGTGGCCAGATGTTGAACTCTAATCAAGGAGATGGTTAGGAAACATCACAGAT
264  A K V I V V F A S G P D V E P L I K E M V R R I T D
892  CGGATCTGGTATGACAGTGAAGCTTGGGCAATCTCCTCCTTGTGCTAAACCAGAATATCTTGATGTTATGGCAGGGACT
291  R I W L A S E A W A I S S L V A K P E Y L D V M A G T
973  ATGGTTTTGCTTTAAAGCAGGTGATACCTGGCTTTAGAGAGTTCTTACAGCAGTCCAACAAAAGAAAGACAGTCAT
318  I G F A L K A G R I P G F R E F L Q H V Q P K K D S H
1054  AATGAATTTGTGAGAGATTTTGGGAAGAAACCTCAACTGCTATCTAGAAGATAGTCCAGGATTTCAAGAAAGTGAGAAT
345  N E F V R E F W E E T F N C Y L E D S P G F Q E S E N
1135  GGACAGCACTAGCTTCAAGCCTTTGTGATGTTGAGGAGGACATCGCAAGTGTGAAACACCATACCTGGCAGTCAAAAC
372  G S T S F R P L C S G E E D I A S V E T P Y L D Y K H
1216  CTTGATCTCCTATAACGTTTATGTTGAGTTTCCATTGACAGGCGCTACAGGACATACTCACATGCACACCTGGG
399  L R I S Y N V V A V Y S I A Q A L Q D I L T C T P G
1297  CGTGGACTTTTGAACAAATCTCCTGCGCAGATATAAAAAAATGGAAGCATGGCAGGCTTAAAGCAGTTAGGCATTTG
426  R G L F A N S C A D I K K M E A W Q V L K Q L R H L
1378  AACTACCAACAGCATGGGAGAAAAGATGCGCTTTGACGAGAACTCAGATATGGAAGCAAATTACACCATTATAAAGTGG
453  N Y T N S M G E K M R F D E N S D M E A N Y T I I N W
1459  CACAGTCTACTGAAGATGGCTCTGTGGTTTTGAGGAGTTGGATATTACAACATGATGCAAGAGAGAGGAGCCAAAGCTG
480  H R S T E D G S V V F E E V G Y Y N M H A K R G A K L
1540  TTCATTGACAGGACAAAGATCTTTGGAATGGCTATAGCACAGAGGTGCCGTTCTTAATTGACAGTGGAGGATGTGAACCT
507  F I D R T K I L W N G Y S T E V P F S N C S E D C E P
1621  GGCACAAGAAAGGGGATCATAGACAGCATGCTACTTGTCTGTTGAATGCACAGAGTGTCTGATGGTGAATACAGTAAT
534  G T R K G I I D S M P T C C F E C T E C S D G E Y C
1702  CATAAAGATGCCAGTGTTCGCAAGTGTCAAATAACTCCTGGTCAAATGGGAACACACATTCGTTCTCCTCAAGGAA
561  H K D A S V C A K C P N S W S N G N H T F C F L K E
1783  GTCAGTTTCTCTCGGACAGAACCTTTGGGATAGCTCTGGCTATATGTGACAGTTCTGGGTGTTGCTTGGACGCTT
588  V E F L S W T E P F G I A L A I C A V L G V V L T T A F
1864  GTGATGGAGTC TTTGTCAGATTTGCAACCCCAATTTGTGAAGGCCACAACCGAGAAGTCTGATGTTGCTCTTTTC
615  V I G V F V R F R N T P I V K A T N R E L S Y V L L F
1945  TCATTATCTGTTGCTTCCAGCTCTCTCATCTTTATTGGAGGCCACAAGACTGGACATGCGCTTTACGCCAACCCGCC
642  S L I C C F S S L I F I G E P Q D W T C R L R Q P A
2026  TTTGGGTCAAGTTTGTCTCTGATCTCTGATCTGTAAGAACTAAACAGAGTCCCTTTGGTATTGAGGCCAAGATT
669  F G V F V L C I S C I L V K T N R V L L V F E A K I
2107  CCTACGAGTCTCCATCGTAAATGGTGGGGATTGAACTGCAAGTTTCTCCTGGTGTTCGTGACATTTGTCCAAGTCATG
696  P T S L H R K W W G L N L Q F L L V F L C T F V Q V M
2188  ATATGTGTGGTTCGCTTTACAATGCCCCTCTTACACTCAACAAATGACATGACATGATGATGATGATGATGATGATGATG
723  I C V V W L Y N A P P S S Y Q N H D I D E I I F I T C
2269  AATGAGGGCTCCGTGATGGCTAGGGTTTTAATTGGCTACACATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
750  N E G S V M A L G F L I G Y T C I L A A I C F F F A F
2350  AAGTCACGGAAACTTCCAGAAAACCTTACAGAGCCAAAGTTCATTAATTTAGCATGCTCATATTTCTTTATTTGGATC
777  K S R K L P E N F T E A K F I T F S M L I F F W I
2431  TCTTTTATCCCGCATCTCAGTACTACGGCAAGTTTGTTCAGCTGTGGAGGTCATTGCTATCCTGGCTTCTAGCTTT
804  S F I P A Y F S T Y G K F V S A V E V I A I L A S S F
2512  GGGATGCTAGCCTGTATCTTCAACCAAGGCTACATCATCTCTTCAAACCCTCAGGAACACCATTTAGGAAAGTCAGA
831  G M L A C I F F N K V Y I I L F K P S R N T I E E V R
2593  TGACAGCATGAGCCATGCTTCAAAAGTGGCTGCCAAAGCTACATTAACACACAGCAACAATTCAGAAAAAAGCCGGC
858  C S T A A H A F K V A A K A T L K H S T T S R K K T G
2674  AGCCTCGTGGGTCTTCTGCTCAACTCCTCTCATCCATCAGCGTCAAGACCAATGGCAATGACTACGACACTGCTTCA
885  S L G S S A S T P S S S I S V K T N G N D T A S
2755  GGAAAGCAGGCCAAGGGTGGAGCTTTGGCAGTGGAAAGGTTACTTTGCTTGAAGTTTCAGAGGATCCAGGAGGAGTTCT
912  G K H R P R V S F G S G T V T L S L S F E E S R R S S
2836  CTGATGTAAtcgtaggtgtgatgtcactcactgacccaataatagtaggtatttttagacttttagaa
939  L M *
2917  tgttttctctatatttatcagaatgatgagtcacaacaatactgactgaattctgttaccttagattttt
2998  gattaaggtgactcgcctaataatgtaaaacacatacagccaatatttcaattgtctgttcttagagattac
3079  cacttctaaaaggcttgcactgtttatggcacaactcctcctctataaacctcctctataatccctctattat
3160  atttttgatcattatgagctgtaaaatacaactactaccgattgtgttatataataaaaatgaaccaagat
3241  gcaagtaaaattactaaattctg

```

图 1 吉富罗非鱼 *CaSR* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列分析

小写字母表示 5'和 3'端非编码区,大写字母表示编码区,加粗部分表示起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA),灰色阴影部分表示信号肽序列,加粗斜体“C”表示半胱氨酸残基,下划线部分表示跨膜区,方框部分表示潜在 N-糖基化位点.

Fig. 1 Sequence analysis of full-length cDNA and amino acid of *CaSR* in GIFT

The lowercase indicates 5' UTR and 3' UTR, and the coding sequence is presented in capital letters. The bold part represents the start codon (ATG) and the stop condon (TAA). The signal peptide sequence is shaded in gray; the italic “C” in bold indicates the cysteine residue; transmembrane domains are underlined; potential N-glycosylation sites (N) are boxed.

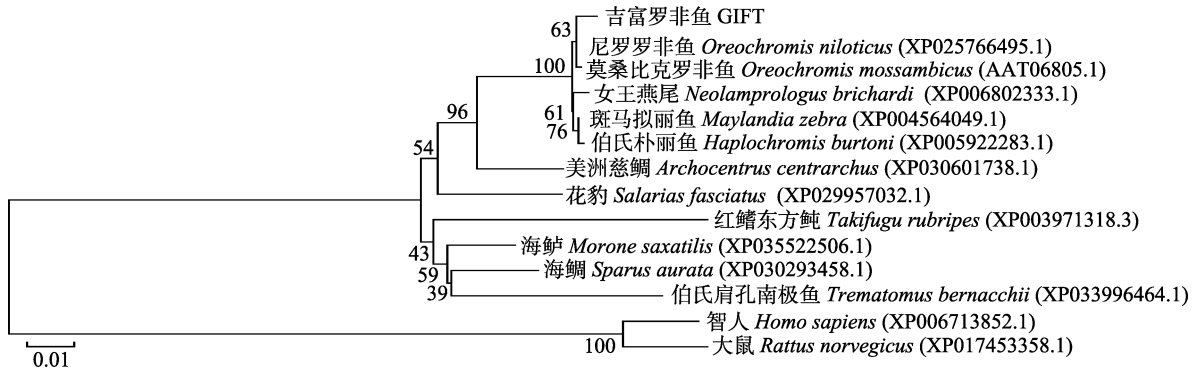


图 2 吉富罗非鱼与其他物种 CaSR 的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree derived from CaSR of GIFT and other species

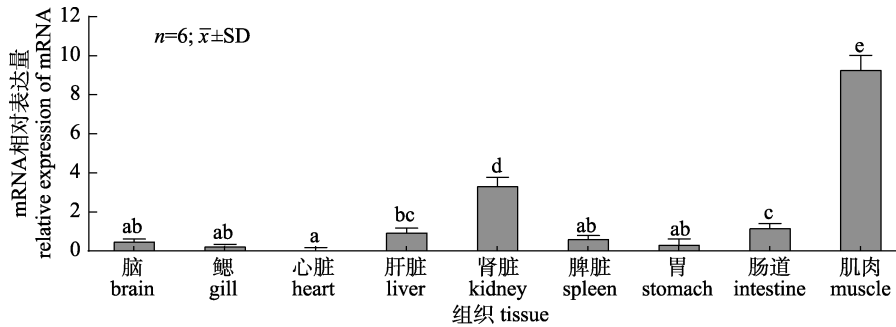


图 3 *CaSR* 基因 mRNA 在吉富罗非鱼不同组织中的表达
不同小写字母表示组织间表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Expression level of *CaSR* mRNA in different tissues of GIFT
Different lowercase letters donate significant difference in expression level between tissues ($P < 0.05$).

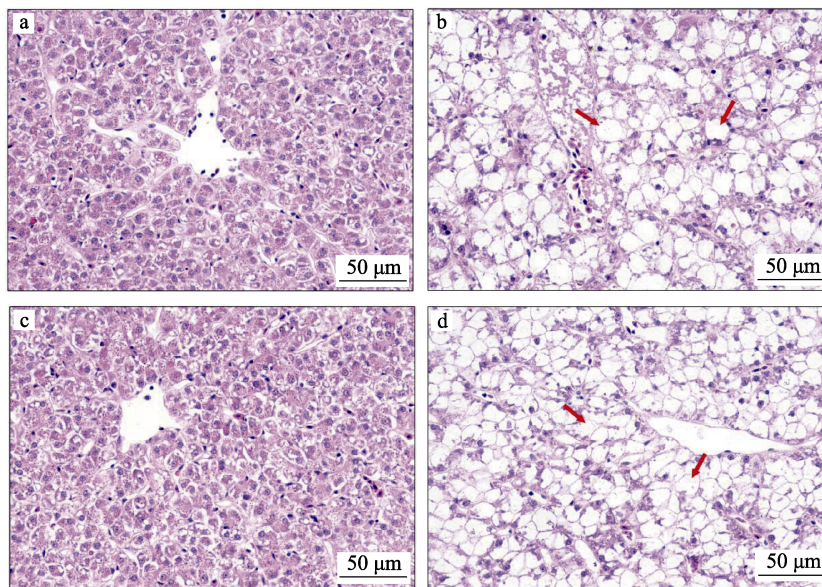


图 4 缺氧胁迫对吉富罗非鱼肝脏组织结构的影响
a. 对照组 48 h; b. 低氧组 48 h; c. 对照组 96 h; d. 低氧组 96 h.
红色箭头表示细胞空泡。

Fig. 4 Effects of hypoxia stress on liver tissue structure of GIFT
a. Control group for 48h; b. Hypoxia group for 48 h; c. Control group for 96 h; d. Hypoxia group for 96 h.
The red arrows indicate cell vacuoles.

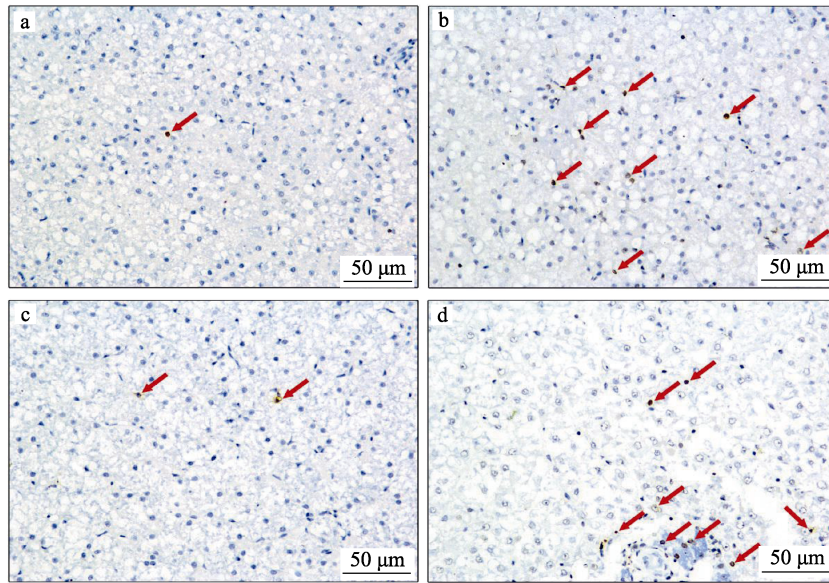


图 5 缺氧胁迫对吉富罗非鱼肝脏组织细胞凋亡的影响

a. 对照组 48 h; b. 低氧组 48 h; c. 对照组 96 h; d. 低氧组 96 h. 红色箭头表示凋亡细胞.

Fig. 5 Effects of hypoxia stress on apoptosis in liver tissue of GIFT

a. control group for 48 h; b. hypoxia group for 48 h; c. control group for 96 h; d. hypoxia group for 96 h. The red arrows indicate apoptotic cells.

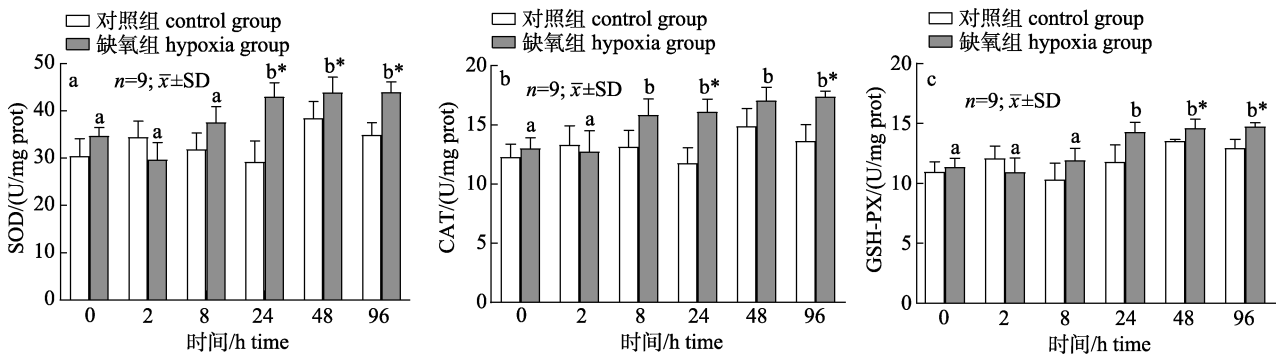


图 6 缺氧胁迫下吉富罗非鱼肝脏组织中 SOD(a)、CAT(b)和 GSH-Px(c)活性的变化

不同小写字母表示实验组在不同时间点有显著性差异($P<0.05$), *表示同一时间点实验组与对照组有显著性差异($P<0.05$).

Fig. 6 The changes of SOD (a), CAT (b) and GSH-Px (c) activity in liver of GIFT under hypoxia stress

Different lowercase letters donate significant difference among different time points in the experimental group ($P<0.05$).

* donates significant difference between experimental and control group at the same time ($P<0.05$).

照组差异显著($P<0.05$), GSH-Px 活性在第 48 小时和 96 小时较对照组差异显著($P<0.05$).

2.5 肝脏组织中 *CaSR*、*Bcl-2*、*Caspase-3* 和 *P53* 基因 mRNA 的表达变化

利用 qRT-PCR 技术检测缺氧胁迫下吉富罗非鱼肝脏组织中 4 种基因在各个时间点较对照组的表达变化(图 7), 结果表明, 随着缺氧胁迫时间的延长, 缺氧组 *CaSR*、*Caspase-3* 基因 mRNA 表达量逐渐升高, 至第 48 小时达到最高, 与对照组差异显著($P<0.05$), 在第 96 小时表达量下降(图

7a、7c); 与对照组相比, 缺氧组 *Bcl-2*、*P53* 基因 mRNA 表达量在第 2 小时和 8 小时基本保持不变, 但至第 24 小时显著升高, 在第 48 小时达到最高, 与对照组差异显著($P<0.05$), 在第 96 小时表达量呈下降趋势(图 7b、7d)。

3 讨论

3.1 吉富罗非鱼 *CaSR* 序列特征分析

CaSR 属于一种 G 蛋白偶联受体, 在许多物种中广泛存在, 包括大鼠^[22]、小鼠^[23]、鱼类^[24]以及

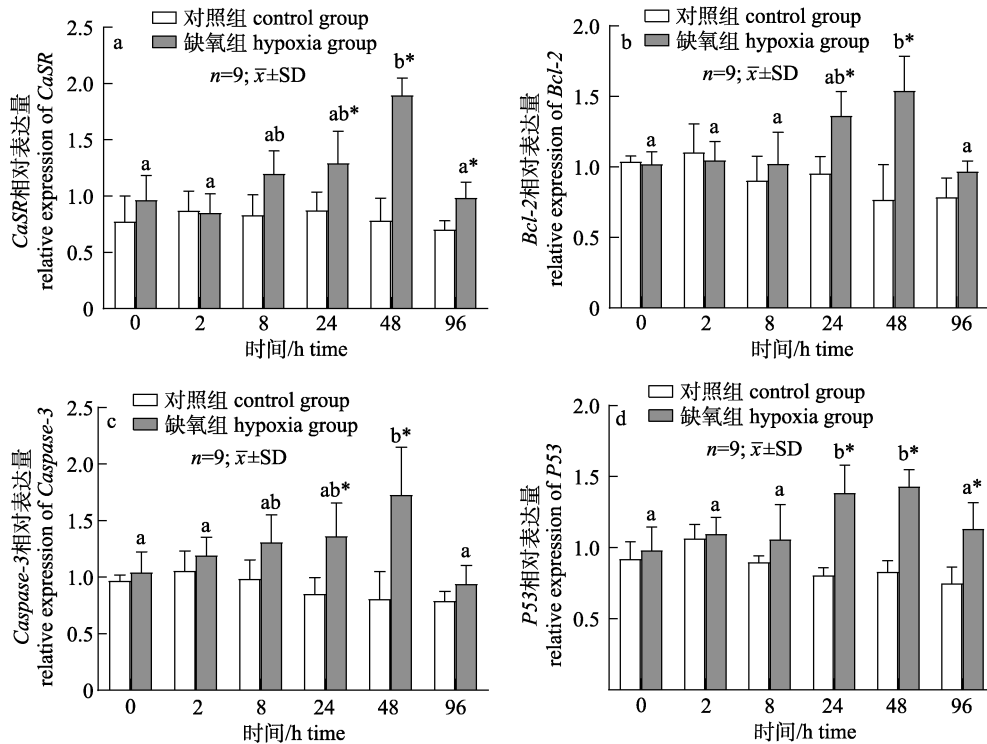


图 7 缺氧胁迫下吉富罗非鱼肝脏组织中 *CaSR* (a)、*Bcl-2* (b)、*Caspase-3* (c)和 *P53* (d)基因 mRNA 的表达量变化不同小写字母表示实验组在不同时间点有显著性差异($P < 0.05$), “*”表示同一时间点实验组与对照组有显著性差异($P < 0.05$)。

Fig. 7 The mRNA expression change of *CaSR* (a), *Bcl-2* (b), *Caspase-3* (c) and *P53* (d) in liver of GIFT under hypoxia stress * donates significant difference between experimental and control group at the same time ($P < 0.05$).

人类^[25]等, 其都具有相似的蛋白结构: 大的 N 端胞外结构域(ECD), 7 层跨膜结构域(TMD), 以及细胞内 C 端结构域(ICD)。本实验利用 RT-PCR 技术克隆了吉富罗非鱼 *CaSR* 基因全长 cDNA 序列, 预测的蛋白整体结构特征与上述一致。ECD 序列 N 端形成的 VFT 区能够识别并结合 Ca^{2+} 等配体, 并通过半胱氨酸富集区(CRD)将接收到的 G 蛋白信号传递给 TMD, 导致 TMD 构象发生改变, 从而激活受体, ICD 具有的多种蛋白激酶磷酸化作用位点可以对接和激活 G 蛋白, 继而启动下游信号传导通路^[26-28]。其中 9 个半胱氨酸残基在 CRD 内会形成 4 个二硫键桥, 对于维持受体的表达和功能具有重要作用^[2]。吉富罗非鱼 *CaSR* 具有与哺乳动物 *CaSR* 相同的 CRD, 这一特征与对莫桑比克罗非鱼 *CaSR* 基因的分析结果相一致^[29], 表明 *CaSR* 基因在不同物种间表达具有较高的保守性。

3.2 吉富罗非鱼 *CaSR* 组织表达分析

CaSR 作为一种细胞外 Ca^{2+} 传感器, 在哺乳动物的肾脏、大脑和消化道中表达丰富^[30-32], 其主

要与调节 Ca^{2+} 平衡和激素分泌作用有关。Loretz 等^[29]研究发现莫桑比克罗非鱼肾脏、鳃、消化道中高表达的 *CaSR* 具有离子调节作用, 通过离子转运直接调控 Ca^{2+} , 帮助调节鱼类的渗透压平衡。本实验通过 qRT-PCR 检测到 *CaSR* 基因 mRNA 在吉富罗非鱼不同组织中均有分布, 其在肌肉中表达量最高, 肾脏次之。肌肉是能量代谢的重要器官, 肌肉收缩等生理活动离不开 Ca^{2+} 的调控^[33], 因此可推测 *CaSR* 在罗非鱼肌肉中也发挥离子调节作用。肝脏也是鱼类代谢的重要器官, 虽然关于 *CaSR* 在肝脏中的功能研究较少, 但在刺激作用下 *CaSR* 为维持钙稳态可能通过相关通路参与肝脏的代谢过程, 其具体机制需要进一步深入研究。

3.3 缺氧胁迫对吉富罗非鱼肝脏组织氧化应激指标的影响

缺氧影响鱼类的行为、生长以及生理活动, 甚至导致鱼类死亡^[34]。ROS 的稳态水平有利于有氧生物进行正常细胞代谢, 当生物体内 ROS 产生

过多打破了与机体原本的抗氧化防御之间的平衡时会引发氧化应激, 从而造成细胞凋亡、脂质氧化、组织损伤等^[35-37]。本实验中缺氧胁迫下吉富罗非鱼肝脏组织细胞凋亡程度明显增加, 说明缺氧引起的氧化应激促进了吉富罗非鱼肝细胞凋亡, 其具体机制可能与细胞凋亡通路中起调控作用的各种因子有关。抗氧化防御系统是鱼类应对氧化应激的重要反应机制, 其中 SOD、CAT、GPx 等抗氧化酶是重要组成部分, 它们能够清除体内的超氧自由基和过氧化物, 保护机体免受氧化损伤^[38]。缺氧胁迫下鱼类不同组织抗氧化酶活性发生适应性变化, 在鱼类应对环境变化以及生存策略中起着重要作用^[16]。本研究发现缺氧胁迫下肝脏中几种抗氧化酶的活性均显著增强, 在第 24、48、96 h 时一直维持在较高水平, 这可能是由于吉富罗非鱼肝脏组织在缺氧胁迫下受到损伤, 需要不断增强抗氧化酶的活性来帮助清除体内过多的有害自由基, 这与大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)在低氧胁迫前期的研究结果相一致^[15,38], 同时也体现出吉富罗非鱼肝脏组织具有较高的抗氧化能力。

3.4 吉富罗非鱼 CaSR 参与缺氧胁迫下细胞凋亡的响应

细胞凋亡是生命的基本现象, 有利于个体发育和维持内环境稳态。氧化应激下 ROS 的过度产生可能通过破坏线粒体膜的通透性和呼吸链或者刺激 Ca^{2+} 浓度的增加等方式诱导细胞凋亡^[39]。上述结果中我们发现缺氧引发的氧化应激促进了吉富罗非鱼肝细胞凋亡, 其原因可能与细胞内增加的 ROS 有关。Caspase 是一类半胱氨酸蛋白酶, 在蛋白水解级联中传递凋亡信号, 其活性可以用来检测应激诱导的鱼类细胞凋亡^[40]。Caspase-3 是 Caspase 家族的重要成员之一, 在线粒体凋亡途径中被 Caspase-9 蛋白水解激活介导凋亡信号, 最终引起细胞凋亡^[41]。抑癌因子 P53 是调节 DNA 修复和细胞凋亡的重要因子, 缺氧条件下过量 ROS 导致 DNA 损伤, 激活 P53, P53 直接作用于线粒体, 影响 Cyt-C 的释放以及 *Bax*、*Bcl-2* 等凋亡因子的转录, 从而诱导细胞凋亡^[39,42]。Zhang 等^[43]研究发现氧化应激诱导黄颡鱼(*Pelteobagrus*

fulvidraco)幼鱼肝细胞凋亡并上调肝脏中 *P53*、*Caspase-3* 等凋亡基因的转录水平。因此在本实验中低氧胁迫下 *Bcl-2*、*Caspase-3* 和 *P53* 基因 mRNA 的表达增强可以表明这 3 种基因参与了氧化应激诱导的吉富罗非鱼细胞凋亡的调控, 其原因可能与缺氧胁迫下 ROS 的升高导致线粒体损伤, 从而诱导线粒体凋亡通路有关。而 *Bcl-2* 是一类抗凋亡因子, 它可以改变线粒体膜的通透性, 直接抑制线粒体中 *Cyt-C* 的释放^[41]。吴鑫杰^[21]研究发现缺氧导致团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)心肌细胞发生凋亡并使 *Bcl-2* mRNA 表达量降低, 但严重缺氧又会引起 *Bcl-2* mRNA 表达量显著升高, 本实验中 *Bcl-2* 表达量出现了明显升高, 这可能与鱼类在应对缺氧应激时自身防御机制有关, 但从切片观察结果来看, 促凋亡因子在细胞命运决定中占主导作用, 也进一步说明了缺氧可以诱导细胞凋亡, 引起罗非鱼肝脏损伤。

细胞内 Ca^{2+} 是参与信号传导的第二信使, 急性低氧胁迫可导致鱼体内 Ca^{2+} 浓度增加^[44]。CaSR 能够感知胞外 Ca^{2+} , 通过离子调节参与调控细胞凋亡等生理过程^[2]。在哺乳动物 *CaSR* 功能研究中发现低氧应激下过多的 ROS 可以激活 *CaSR*, *CaSR* 的过表达导致胞外 Ca^{2+} 浓度增加, 造成 Ca^{2+} 内流引起线粒体中钙超载, 导致线粒体损伤, 同时调控 *Bcl-2*、*Cyt-C*、*Caspase-3* 等凋亡因子的表达, 最终促进细胞发生凋亡^[8,45]。同时, 在鱼类中也发现低氧胁迫下 *CaSR* 的表达变化可以引起细胞中 Ca^{2+} 浓度以及相关凋亡因子转录水平的变化, 从而调控细胞凋亡^[12]。本实验发现缺氧胁迫上调吉富罗非鱼 *CaSR* mRNA 表达, 表明 *CaSR* 参与罗非鱼缺氧信号传导过程, 其表达增加可能与肝脏中产生的过量 ROS 有关, 其中在第 0~8 小时未出现明显变化可能是因为短时间内缺氧应激尚未对罗非鱼组织造成较重损伤, 但随着胁迫时间的延长, ROS 的过度积累导致 *CaSR* 表达增强。而 *Bcl-2*、*Caspase-3* 和 *P53* 三种基因的表达变化与 *CaSR* 基本一致, 说明 *CaSR* 表达增强能够影响细胞凋亡相关因子的表达水平。因此可以推测, 缺氧胁迫下 *CaSR* 在 ROS 刺激下表达增强, 介导细胞内 Ca^{2+} 浓度增加, 继而引起细胞凋亡相关调控

因子的变化, 最终导致细胞凋亡的发生, 从而参与吉富罗非鱼的缺氧应对机制。但有关具体的 Ca^{2+} 信号传导机制以及细胞凋亡信号通路等问题, 还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Brown E M. Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis[J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013, 27(3): 333-343.
- [2] Tu C L, Chang W H, Shoback D M. Biology of the extracellular calcium-sensing receptor[M]//*Principles of Bone Biology*. Amsterdam: Elsevier, 2020: 539-571.
- [3] Brown E M, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid[J]. *Nature*, 1993, 366(6455): 575-580.
- [4] Jiang C M, Xu C Q, Wang Z Y. Progress on extracellular calcium sensing receptor[J]. *International Journal of Pediatrics*, 2006, 33(2): 131-133. [姜春明, 徐长庆, 王竹颖. 细胞外钙感受体的研究进展[J]. *国际儿科学杂志*, 2006, 33(2): 131-133.]
- [5] Diez-Fraile A, Lammens T, Benoit Y, et al. The calcium-sensing receptor as a regulator of cellular fate in normal and pathological conditions[J]. *Current Molecular Medicine*, 2013, 13(2): 282-295.
- [6] Lin L Y, Yeh Y H, Hung G Y, et al. Role of calcium-sensing receptor in mechanotransducer-channel-mediated Ca^{2+} influx in hair cells of zebrafish larvae[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 649-662.
- [7] Zhang H, Chang Z Y, Mehmood K, et al. Calcium-sensing receptor arbitrates hypoxia-induced proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells via the G protein-PLC-IP₃ pathway[J]. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2019, 29(1): 69-76.
- [8] Xing W J, Kong F J, Li G W, et al. Calcium-sensing receptors induce apoptosis during simulated ischaemia-reperfusion in Buffalo rat liver cells[J]. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 2011, 38(9): 605-612.
- [9] Ran D, Liu W, Ma Y G, et al. Role of calcium-sensing receptor in cadmium-induced apoptosis of rat primary osteoblasts *in vitro*[J]. *Toxicology in Vitro*, 2020, 67: 104923.
- [10] Yuan H, Yang G, Li S, et al. Calcium sensing receptor involving in therapy of embryonic stem cell transplantation alleviates acute myocardial infarction by inhibiting apoptosis and oxidative stress in rats[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Science*, 2020, 23(10): 1353-1359.
- [11] Velan A, Hulata G, Ron M, et al. Comparative time-course study on pituitary and branchial response to salinity challenge in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and Nile tilapia (*O. niloticus*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 37(4): 863-873.
- [12] Qiang J, He J, Tao Y F, et al. Hypoxia-induced miR-92a regulates p53 signaling pathway and apoptosis by targeting calcium-sensing receptor in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *PLoS ONE*, 2020, 15(11): e0238897.
- [13] Kramer D L. Dissolved oxygen and fish behavior[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1987, 18(2): 81-92.
- [14] Yang K, Fan Q X, Zhang L, et al. Effect of dissolved oxygen levels on growth performance, energy budget and antioxidant responses of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson)[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(8): 2025-2033.
- [15] Yang S, Yan T, Wu H, et al. Acute hypoxic stress: Effect on blood parameters, antioxidant enzymes, and expression of *HIF-1alpha* and *GLUT-1* genes in largemouth bass (*Microp-terus salmoides*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 449-458.
- [16] Lushchak V I, Lushchak L P, Mota A A, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation[J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2001, 280(1): R100-R107.
- [17] Qiang J, Zhu X W, He J, et al. miR-34a regulates the activity of *HIF-1a* and *P53* signaling pathways by promoting *GLUT1* in genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) under hypoxia stress[J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 670-681.
- [18] Sheng Y, Hua Z Y, Yang Z, et al. Effects of acute hypoxic stress on biochemical parameters, immune regulation and metabolic capacity of the blood in genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2019, 35(4): 978-986.
- [19] Tao Y F, Qiang J, Bao J W, et al. Changes in physiological parameters, lipid metabolism, and expression of microRNAs in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) with fatty liver induced by a high-fat diet[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1521-1534.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Wu X J. The effects of hypoxia on cell apoptosis and the activity of antioxidant enzymes in *Megalobrama amblycephala*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015. [吴鑫杰. 低氧对团头鲂细胞凋亡及抗氧化酶活性的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.]
- [22] Riccardi D, Park J, Lee W S, et al. Cloning and functional

- expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(1): 131-135.
- [23] Ho C, Conner D A, Pollak M R, et al. A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism[J]. Nature Genetics, 1995, 11(4): 389-394.
- [24] Fellner S K, Parker L. A Ca^{2+} -sensing receptor modulates shark rectal gland function[J]. Journal of Experimental Biology, 2002, 205(13): 1889-1897.
- [25] Aida K, Koishi S, Tawata M, et al. Molecular cloning of a putative Ca^{2+} -sensing receptor cDNA from human kidney[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, 214(2): 524-529.
- [26] Molostvov G, James S, Fletcher S, et al. Extracellular calcium-sensing receptor is functionally expressed in human artery[J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 2007, 293(3): F946-F955.
- [27] Conigrave A D, Ward D T. Calcium-sensing receptor (CaSR): Pharmacological properties and signaling pathways[J]. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013, 27(3): 315-331.
- [28] Chavez-Abiega S, Mos I, Centeno P P, et al. Sensing extracellular calcium – an insight into the structure and function of the calcium-sensing receptor (CaSR)[M]// Calcium Signaling. Cham: Springer, 2020, 1131: 1031-1063.
- [29] Loretz C A, Pollina C, Hyodo S, et al. cDNA cloning and functional expression of a Ca^{2+} -sensing receptor with truncated C-terminal tail from the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*)[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(51): 53288-53297.
- [30] Hebert S C, Cheng S, Geibel J. Functions and roles of the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor in the gastrointestinal tract[J]. Cell Calcium, 2004, 35(3): 239-247.
- [31] Yano S, Brown E M, Chattopadhyay N. Calcium-sensing receptor in the brain[J]. Cell Calcium, 2004, 35(3): 257-264.
- [32] Graca J A Z, Schepelmann M, Brennan S C, et al. Comparative expression of the extracellular calcium-sensing receptor in the mouse, rat, and human kidney[J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 2016, 310(6): F518-F533.
- [33] Ma G L, Liu J D, Nguyen N T, et al. Let there be light: A bright future for Ca^{2+} signaling[J]. Science Bulletin, 2018, 63(16): 1029-1031.
- [34] Dan X M, Yan G J, Zhang A J, et al. Effects of stable and diel-cycling hypoxia on hypoxia tolerance, postprandial metabolic response, and growth performance in juvenile qingbo (*Spinibarbus sinensis*)[J]. Aquaculture, 2014, 428-429: 21-28.
- [35] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 101(1): 13-30.
- [36] Birnie-Gauvin K, Costantini D, Cooke S J, et al. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review[J]. Fish and Fisheries, 2017, 18(5): 928-942.
- [37] Sun J L, Zhao L L, Liao L, et al. Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 923-936.
- [38] Yang M, Sun S M, Fu H T, et al. Hypoxia and reoxygenation on antioxidant enzyme activities and histological structure of *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(3): 493-503. [杨明, 孙盛明, 傅洪拓, 等. 低氧和复氧对日本沼虾抗氧化酶活力及组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 493-503.]
- [39] Zhang T X, Yan Z G, Zheng X, et al. Effects of acute ammonia toxicity on oxidative stress, DNA damage and apoptosis in digestive gland and gill of Asian clam (*Corbicula fluminea*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 99: 514-525.
- [40] Cheng C H, Yang F F, Ling R Z, et al. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*)[J]. Aquatic Toxicology, 2015, 164: 61-71.
- [41] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-776.
- [42] Hammond E M, Giaccia A J. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 331(3): 718-725.
- [43] Zhang M Z, Li M, Wang R X, et al. Effects of acute ammonia toxicity on oxidative stress, immune response and apoptosis of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and the mitigation of exogenous taurine[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 79: 313-320.
- [44] Huang J S, Lu Z, Chen G, et al. Acute hypoxia stress on blood biochemical indexes of large-sized juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Haiyang Xuebao, 2019, 41(6): 76-84. [黄建盛, 陆枝, 陈刚, 等. 急性低氧胁迫对军曹鱼大规模幼鱼血液生化指标的影响[J]. 海洋学报, 2019, 41(6): 76-84.]
- [45] He W, Sun J F, Jiang R Y, et al. Effect of calcium-sensing receptor on the apoptosis of rat spinal cord neurons in anoxia/reoxygenation injury and its significance[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2017, 39(5): 623-628. [何炜, 孙继芾, 蒋润宇, 等. 大鼠脊髓神经元缺氧复氧损伤中钙感受体对其凋亡的影响及意义[J]. 中国医学科学院学报, 2017, 39(5): 623-628.]

Cloning and expression of the calcium-sensing receptor gene in Genetically Improved Farmed Tilapia and its mechanism of regulating apoptosis

LI Liange¹, CAO Zheming², TAO Yifan², ZHANG Li¹, MA Junlei¹, LI Mingxiao¹, BAO Jingwen², ZHU Haojun², XU Pao^{1,2}, QIANG Jun^{1,2}

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: Hypoxia is one of the main environmental stress factors affecting the growth, reproduction, and survival of fish in aquaculture. In addition to the antioxidant defense system, the mechanism of hypoxia tolerance in fish also includes many regulatory factors that play an important role in hypoxia signal transduction. The calcium-sensing receptor (CaSR) is a transmembrane receptor belonging to the G-protein-coupled receptor (GPCRs) superfamily, and is widely conserved in mammals, fish, and other vertebrates. CaSR can participate in a variety of important physiological processes by regulating different signal pathways under the stimulation of Ca^{2+} and other agonists. Apoptosis is an important physiological activity in most organisms, and under normal conditions it promotes the development of the organism and helps maintain homeostasis. Oxidative stress induced by hypoxia can induce cell apoptosis. It was found that hypoxia upregulated the expression of *CaSR*, and increased *CaSR* promoted intracellular calcium overload, which induced endoplasmic reticulum stress, and could affect cell apoptosis genes in specific pathways, leading to downstream apoptosis. However, the regulation of *CaSR* on cell apoptosis under anoxic conditions is primarily observed in mammals and has rarely been reported in fish. The aim of this study was to investigate the characteristics of the *CaSR* gene and its regulatory mechanism involved in apoptosis during hypoxia stress in Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT). The cDNA full-length sequence of the *CaSR* gene of GIFT was cloned by RT-PCR. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to analyze the expression pattern of *CaSR* in different tissues, and further detected expression changes in *CaSR* and the mRNA of other apoptosis-related genes in the liver under hypoxic conditions (0.55 mg/L). Finally, ELISA was used to detect changes in activities of antioxidant enzymes in the liver, while morphological changes and apoptosis in the liver were observed by HE and TUNEL staining, respectively. The results showed that the cDNA full-length sequence of the *CaSR* gene in GIFT was 3265 bp in length, including 21 bp at the 5'-UTR, 421 bp at the 3'-UTR, and a 2823 bp open reading frame (ORF) encoding 940 amino acids. The predicted protein structure contained a seven-transmembrane domain unique to the GPCRs superfamily. Multiple sequence comparisons of CaSR proteins indicated that CaSR has the highest similarity with the corresponding protein in tilapia. *CaSR* gene mRNA was found to be expressed in nine tissues, with the highest expression in muscle, followed by kidney. Hypoxic stress could lead to structural damage of liver and promote apoptosis of liver cells. Compared with the control group (5.0 mg/L), hypoxic stress could enhance the activity of SOD, CAT and GSH-Px antioxidant enzymes and maintain them at high levels, and could also significantly upregulate the expression of *CaSR* mRNA and cause mRNA expression changes in *Bcl-2*, *Caspase-3*, and *P53*, all of which are apoptosis genes. The results suggest that hypoxic stress could induce oxidative stress and cause damage in the tissues of GIFT, and that activated *CaSR* might participate in the process of hypoxia signal transduction through mediating Ca^{2+} to affect the expression of key genes in the apoptosis pathway under oxidative stress, thus leading to the apoptosis of fish hepatocytes.

Key words: GIFT; *CaSR*; gene cloning; hypoxia stress; cell apoptosis

Corresponding author: QIANG Jun. E-mail: qiangj@ffrc.cn