

草鱼 *Bcl-2* 基因的克隆、组织表达分析及 DHA 诱导下其在脂肪细胞中的表达变化

黄吉芹¹, 张建禄¹, 李 杨^{1,2}, 刘 品¹, 李南充¹, 雷彩霞¹, 吉 红^{1,2*}

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2. 西北农林科技大学水产科学研究所, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为获知草鱼 B 细胞淋巴瘤-2 (B cell CLL/lymphoma-2, *Bcl-2*) 基因序列及其在草鱼各组织和脂肪细胞中的表达情况, 采用 cDNA 快速末端扩增技术获得了草鱼 *Bcl-2* 的全长 cDNA 序列, 通过实时定量 PCR 研究了 *Bcl-2* 在草鱼不同组织中的表达水平及经二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 处理后, 草鱼脂肪细胞 *Bcl-2* 的表达变化。结果显示, 所获得草鱼 *Bcl-2* 基因全长 cDNA 序列长度为 1 292 bp, 包含 133 bp 的 5' 非翻译区和 784 bp 的 3' 非翻译区; 开放阅读框为 375 bp, 编码 124 个氨基酸。草鱼 *Bcl-2* 与鲤、斑马鱼 *Bcl-2* 氨基酸同源性分别为 89.5% 和 91.1%, 与人、原鸡、小鼠、野猪、欧洲牛、褐家鼠、家猫和犬等其他动物的氨基酸同源性为 57.7%~62.0%。其编码蛋白的分子量为 14.14 ku, 等电点为 4.68。*Bcl-2* 基因在草鱼心脏、肝胰脏、脾脏、鳃、肾脏、肌肉、腹腔脂肪组织、脑、肠和精巢 10 个组织中均有表达, 其中在腹腔脂肪组织、肾脏和精巢中表达丰度最高, 在肌肉中表达最低。DHA 处理草鱼前体脂肪细胞后, *Bcl-2* 基因表达在增殖阶段下调, 而在分化阶段上调。研究表明, *Bcl-2* 在草鱼各组织中广泛表达, 且 DHA 对其在脂肪细胞中的表达具有调控作用。

关键词: 草鱼; B 细胞淋巴瘤-2; DHA; 基因表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

B 细胞淋巴瘤-2 (B cell CLL/lymphoma-2, *Bcl-2*) 蛋白家族是一类参与细胞凋亡过程的重要蛋白质, 主要分布在线粒体和内质网膜上, 按功能该家族成员可分为两类: 一类具有抗凋亡作用, 如 *Bcl-2*、*Bcl-xl*、*Bcl-w*; 一类具有促凋亡作用, 如 *Bax*、*Bak*、*Bad*。研究者发现, 细胞凋亡的内源性凋亡途径 (也被称为线粒体途径), 主要由 *Bcl-2* 家族成员调控, 它们是位于线粒体膜的一种整合蛋白^[1-2], 可激活 caspase-9 使线粒体释放细胞色素 c, 最终使下游的 caspase-3 等因子激活, 引起细胞核内 DNA 的降解导致细胞凋亡^[3]。另一方面, *Bcl-2* 只有通过结合 *Bax* 才能发挥抗凋亡作用^[4]。Lindsten 等^[5]发现 *Bax* 是多种组织正常发育所必需的, 且 *Bax* 的表达促进细胞凋亡^[6], 而 *Bcl-2* 特有的 BH3 区域才能阻止 *Bax* 诱导的细胞凋亡^[7]。

目前对于 *Bcl-2* 的研究集中于癌细胞^[8-9], 在肌肉^[10]、肝脏^[11]和脂肪组织^[12]也有报道。关于水产动物的研究仅见斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 *Bcl-2* 家族功能的探讨^[13]和鲤 (*Cyprinus carpio*) *Bcl-2* 基因的克隆^[14]等工作, 而草鱼方面尚未见报道。

吉红等^[15]发现高不饱和脂肪酸可以抑制脂质蓄积, 而脂肪细胞凋亡是减少脂质蓄积重要途径之一^[16-17]。二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 是高不饱和脂肪酸的一种, 可促进 3T3-L1 细胞发生凋亡^[18], 并可通过上调 *Bax*/*Bcl-2* 比率促进人的乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡^[19]。而 DHA 能否通过调控 *Bcl-2* 基因表达诱导脂肪细胞凋亡尚未见报道。

实验采用 cDNA 快速末端扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术克隆草鱼

收稿日期: 2013-01-25 修回日期: 2013-03-30

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31072223)

通信作者: 吉 红, E-mail: jihong0405@hotmail.com

(*Ctenopharyngodon idella*)*Bcl-2* 的全长 cDNA 序列,通过实时定量 PCR (qRT-PCR) 研究其在草鱼不同组织中的表达状况,并评估 DHA 对草鱼前体脂肪细胞中 *Bcl-2* 基因表达的影响,以期为进一步探讨 *Bcl-2* 的功能、DHA 引起细胞发生凋亡的作用机理以及草鱼脂质代谢的研究提供参考资料和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验草鱼

用于 *Bcl-2* 基因克隆和组织表达检测的 4 尾草鱼 (500 ~ 800 g) 购自陕西杨凌康乐路水产品市场,均健康无病。实验鱼购回后立即解剖取其心脏、肝胰脏、脾脏、鳃、肾脏、肌肉、腹腔脂肪、脑、肠和精巢 10 个组织,液氮浇冻后于 -80 °C 保存备用。

用于细胞培养的健康草鱼 (1 kg 左右),购自陕西杨凌康乐路水产品市场。

1.2 草鱼前体脂肪细胞获得及培养

实验鱼在水族箱中停食暂养 1 d 左右。实验前将鱼敲晕后剪断鳃弓放血,清洗干净并用 75% 酒精擦拭鱼体进行消毒,无菌环境中解剖取出腹腔肠系膜脂肪组织,将其放入不含胎牛血清的 DMEM 培养基 (Gibco) 中,并称量记录分离的脂肪组织总重量。

将脂肪组织用 PBS 洗 3 次后放入烧杯,加入等体积的 0.1% I 型胶原酶 (Gibco),用剪刀将脂肪组织剪碎,20 min 后用含有 10% 胎牛血清的培养液终止消化反应。随后将混合液放于 50 mL 离心管,800 × g 离心 10 min,弃上清液,加入 20 mL 红细胞裂解液 (0.154 mol/L NH₄Cl, 10 mmol/L NaHCO₃, 0.1 mmol/L EDTANa₂),静置 5 min,800 × g 离心 5 min,弃上清液。将获得的草鱼前体脂肪细胞用不含血清的 DMEM 培养基 (Gibco) 重悬,800 × g 离心 5 min,重复上一步操作。用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 (Hyclone) 将细胞重悬,以 10 g/25 cm² 密度接种于预先用 1% 明胶 (Sigma) 涂布板底的细胞培养皿,于 28 °C,5% CO₂ 条件下进行培养,隔 2 d 换液。当细胞生长至汇合阶段 (接种第 7 天),更换细胞诱导培养基 [含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 (Hyclone),胰岛素 (Sigma) 20 μg/mL、地塞米松 (Sigma) 1 μmol/L、三碘甲腺原氨酸 (Sigma) 10 nmol/L] 继续培养。

1.3 DHA 处理草鱼前体脂肪细胞

增殖阶段处理 细胞接种后,隔 2 d 换液。

对照组继续用生长培养基培养,处理组更换含 100 μmol/L DHA 的生长培养基,分别处理 1 d (P 1 d)、3 d (P 3 d) 和 5 d (P 5 d) 后,收集细胞提取细胞总 RNA。

分化阶段处理 当细胞生长至汇合阶段,对照组继续用诱导培养基培养,处理组更换含 100 μmol/L DHA 的诱导培养基,分别处理 1 d (D 1 d)、3 d (D 3 d) 和 5 d (D 5 d) 后,收集细胞提取细胞总 RNA。

1.4 总 RNA 提取

采用 RNAiso Plus 试剂盒 (TaKaRa) 提取草鱼各组织总 RNA,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,-80 °C 保存备用。

1.5 *Bcl-2* cDNA 中间片段克隆

以提取的草鱼脂肪组织总 RNA 为模板,进行 cDNA 的合成,按 PrimeScript™ RT reagent kit (TaKaRa) 说明书,合成 cDNA 第一链。根据 GenBank 中斑马鱼 (登录号:AY695820) 的 *Bcl-2* 保守序列设计 *Bcl-2* 引物 P⁺,P⁻ (表 1) 合成 *Bcl-2* 中间片段。*Bcl-2* cDNA 5'端和 3'端非编码区的扩增采用 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 和 3'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends 扩增试剂盒 (Invitrogen),按照说明书进行操作,采用的引物见表 1。利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 [生工生物工程 (上海) 有限公司],将所获得的 PCR 产物进行纯化。回收的 DNA 片段连接到 pMD18-T 载体 (TaKaRa) 上,随后转化到感受态 *E. coli* DH 5α 感受态细胞 (TIANGEN) 后筛选阳性克隆,送交南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.6 *Bcl-2* mRNA 组织差异表达

根据克隆得到的草鱼 *Bcl-2* cDNA 序列,用 PrimerQuestSM 设计实时定量 PCR 特异引物 (*Bcl-2*⁺, *Bcl-2*⁻) 并在上海生物工程技术服务有限公司合成 (表 1)。提取草鱼心脏、肝胰脏、脾脏、鳃、肾脏、肌肉、腹腔脂肪、脑、肠和精巢 10 个组织,参照反转录试剂盒说明进行反转录。实时定量检测利用 CFX96 实时定量 PCR 检测系统 (Bio-Rad, USA) 进行,反应体系如下:0.6 μL 10 mmol/μL 的上下游引物、1 μL 反转录产物、10 μL SYBR[®] Premix Ex Taq™ II、7.8 μL ddH₂O。反应条件为 95 °C,10 s;95 °C,15 s;57 °C,30 s;40 个循环。同一样品重复 3 个反应,以 β-actin 作为参照基因。根据扩增曲线得到的 C_t 值 (荧

光信号达到设定的阈值时所经历的循环数),计算出 ΔC_t ;得到不同样品相对于参照样本基因表达倍数的基因 *Bcl-2* 和对照基因 β -actin C_t 值的差异 $2^{-\Delta\Delta C_t}$,从而制作出相对定量的图表。

表 1 检测引物列表
Tab.1 Primers used for PCR

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	用途 usage
P ⁺	GAGATGGCGTCCCAGGTAGATAATA	中间片段扩增
P ⁻	ACGTGTTTTGTGTGTCGATCTCTGT	中间片段扩增
GSP1	CAGAATGAGGACTCGCAGGAA	3'端扩增
GSP2	CAGGAACGCTCCCACACTTTA	3'端扩增
NGSP1	ATGGGTGGAACATAGAGTC	5'端扩增
NGSP2	AACTCCACAAAGGCATCCCA	5'端扩增
NGSP3	CATCCCAACCTCCATTTTCT	5'端扩增
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGHHGGHGGHGG	5'端扩增
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3'端和5'端扩增
Bcl-2 ⁺	AGATGGCGTCCCAGGTAGATAA	荧光定量引物
Bcl-2 ⁻	AGTCTCTCTGCTGACCGTACAA	荧光定量引物
β -actin ⁺	CGTGACATCAAGGAGAAG	内参引物
β -actin ⁻	GAGTTGAAGGTGGTCTCAT	内参引物

1.7 草鱼前体脂肪细胞 *Bcl-2* 基因表达

收集 P 1 d、P 3 d、P 5 d、D 1 d、D 3 d 和 D 5 d 的对照组和处理组细胞提取总 RNA。将提取的总 RNA,参照反转录试剂盒说明进行反转录。采用 qRT-PCR 法检测 *Bcl-2* 在草鱼脂肪细胞不同时间点的表达情况。实验方法及条件同上。

1.8 数据分析

采用 SPSS 13.0 软件和 Excel 2007,所得数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示,使用 *t* 检验进行比较,当 $P < 0.05$ 时,认为差异显著;当 $P <$

0.01 时,认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *Bcl-2* cDNA 全长序列扩增克隆

用引物 P⁺,P⁻ 进行 PCR,扩增得到 544 bp 的特异性条带,菌液送检测序,结果在 GenBank 中 BLAST 分析确定为草鱼 *Bcl-2* 目的片段。3'端和 5'端经巢式 PCR 扩增得到特异性条带,测序结果经 DNAMAN 分析,去掉重叠区后拼接得到 *Bcl-2* cDNA 全长序列(图 1 为全长 cDNA 序列)。

```

1   TCATTTGAGGCTCTACCGGGTGTACGAGAGGCTGGAGACGAGATAGAAAGGATATAC
59  CAGCGTGAATTTGAGGAGATGCCCCACCAGATGTCATTTCAGTCCCAATGTAGCGCAACGC
      M P H Q M S F S P N V A Q R
119 AGCTTCTTAACCGTGGCTGAAGAGCTCTTTAGAGACGAGGTGAACITGGAGCGGATCGTG
      S F L T V A E E L F R D E V N W R R I V
179 GCTTTCTTCGAGTTTGGTGGGACCATGTGTGGAAAGCGTCAACCAGGAGATGGCGTCC
      A F F E F G G T M C V E S V N R E M A S
239 CAGGTAGATAATATGACACTGGATGACAGACTACCTGAACGGGCTCTGGAAAACCTGG
      Q V D N I A H W M T D Y L N G P L E N W
299 ATCGAGGAAATGGAGTTGGGATGCCCTTTGTGGAGTTGTACGGTCAGCAGAGAGACTCT
      I E E N G G W D A F V E L Y G Q Q R D S
359 ATGTTCCACCCATTGTCATACCTAACGAAAGTGGATTGGCGGCGTTGGGCTTGGCA
      M F H P L S Y L T K V L G L A A L G L A
419 GGAGTGACCATCGCCTTTTTGCTCAGAAGTACAGCCCTGTGGGTCTTTCACCAATCT
      G V T I A F F A Q K
479 ATCTCACTTCTCTGCTGCTCTCTCTTTCAGCTTATCAAAGCATCTCTCAGCGCCACA
1139 CTCACTCCATTGGATGGACCTCTTGAGATCTCCCGTCAAACCAACAGATGTTGAGCATT
1199 CTCATTAATAAGTTCTCTTTGAAAAA

```

图 1 草鱼 *Bcl-2* cDNA 及预测的氨基酸序列

Fig.1 *Bcl-2* cDNA sequence and deduced amino acid sequence of grass carp

2.2 *Bcl-2* cDNA 全长序列基本特征

使用 CLC Main workbench 软件分析草鱼 *Bcl-2* cDNA 序列,结果显示,全长 cDNA 序列为 1 292 bp,各碱基含量为 A:350,C:306,G:300,T:336;预测开放阅读框与 NCBI 网上分析一致,包括 133 bp 5'UTR,784 bp 3'UTR,编码区 375 bp,

编码 124 个氨基酸;预测蛋白质的分子量和等电点分别为 14.14 ku 和 4.68。

2.3 *Bcl-2* 基因及预测氨基酸同源性分析

在 GenBank 中进行 BLAST 分析,获取到斑马鱼 (*Danio rerio* NM_001030253)、鲤 (*Cyprinus carpio* EU490408)、人 (*Homo sapiens* NM_

000633)、原鸡 (*Gallus gallus* NM_205339)、小鼠 (*Mus musculus* NM_177410)、野猪 (*Sus scrofa* EF681866)、欧洲牛 (*Bos taurus* NM_001166486)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus* NM_016993)、家猫 (*Felis catus* NM_001009340) 和犬 (*Canis familiaris* AY509563) 10 个物种的 *Bcl-2* 基因序列。结果显

示,草鱼 *Bcl-2* 与鲤、斑马鱼的基因同源性分别为 91.7% 和 87.1%, 而与其他物种的基因同源性在 42.1%~71.0% 之间; 编码氨基酸与其他物种之间的同源性为 57.7%~62.0%, 而与鲤和斑马鱼则为 89.5% 和 91.1%。图 2 为草鱼 *Bcl-2* 与其他物种 *Bcl-2* 氨基酸序列比对结果。

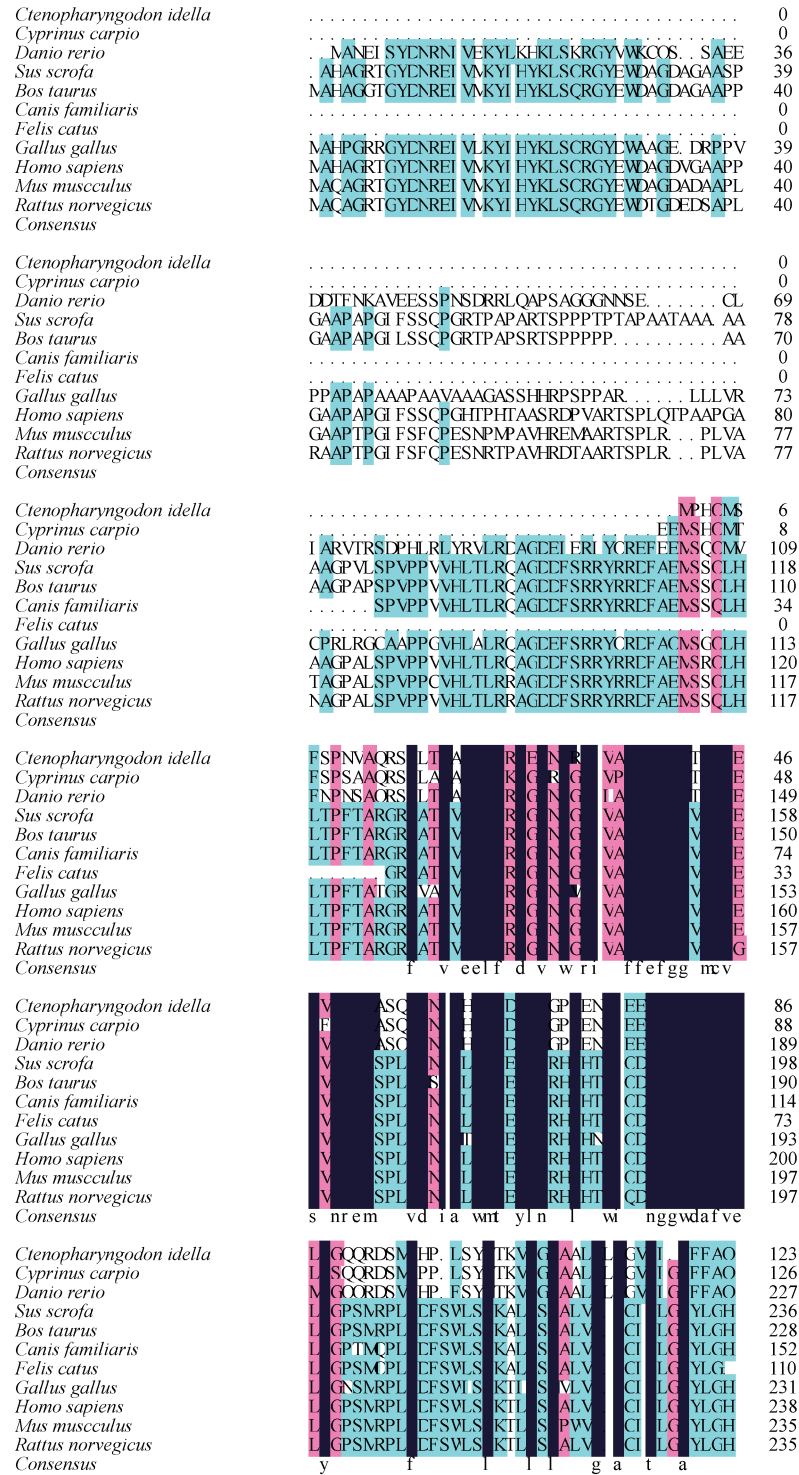


图 2 草鱼 *Bcl-2* 与其他物种 *Bcl-2* 氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of *Bcl-2* between grass carp and other species

2.4 构建 Bcl-2 基因系统进化树

使用 DNAMAN 软件构建草鱼、斑马鱼、鲤、人、原鸡、小鼠、野猪、欧洲牛、褐家鼠、家猫和犬 11 个物种 Bcl-2 基因系统进化树。结果发现,草鱼和斑马鱼的亲缘关系最近,与鲤次之,与其他物种的亲缘关系较远(图 3)。

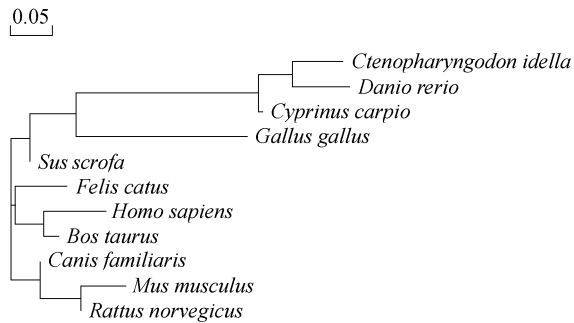


图 3 Bcl-2 基因系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of Bcl-2

2.5 Bcl-2 蛋白结构特征

使用 TMHMM Server 2.0 软件对编码氨基酸跨膜结构进行分析发现,草鱼 Bcl-2 具有 1 个螺旋跨膜结构,从 N 端的第 100 个氨基酸残基开始,至第 122 个氨基酸残基完成跨膜,其 N 端在细胞外,C 端在细胞内;其它 10 个物种分析都存在 1 个跨膜区。草鱼 Bcl-2 蛋白结构与哺乳类动物 Bcl-2 蛋白结构十分相似。使用 BLAST 软件将草鱼 Bcl-2 蛋白与其他物种比对,发现草鱼 Bcl-2 蛋白仅含有 BH1、BH2 和 BH3 结构域,而斑马鱼等物种含有 BH1、BH2、BH3 和 BH4 区域。

2.6 Bcl-2 mRNA 组织表达

采用 qRT-PCR 方法,对草鱼各组织的 Bcl-2

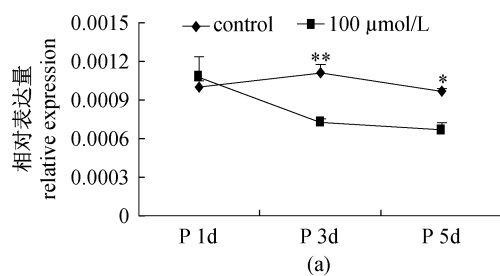


图 5 DHA 对草鱼脂肪细胞 Bcl-2 基因表达的影响

(a) 为增殖阶段,(b) 为分化阶段。

同一天 * 代表差异显著 ($P < 0.05$), ** 代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

Fig. 5 The effect of DNA on Bcl-2 gene expression of grass carp adipocyte

(a) indicates proliferation stage,(b) indicates differentiation stage.

* and ** mean significant difference ($P < 0.05$) and very significant difference ($P < 0.01$) on the same day.

mRNA 丰度进行检测(图 4),由图 4 可知,Bcl-2 基因在脂肪组织、肾脏和精巢中的表达量显著高于其它各组织 ($P < 0.05$),在脑和肠的表达次之 ($P < 0.05$),在心的表达较低 ($P < 0.05$),其中 Bcl-2 基因在肝胰脏、脾脏和鳃中的表达分别与在脑、肠及心的表达不存在显著差异,在肌肉中表达量显著低于其它各组织 ($P < 0.05$)。

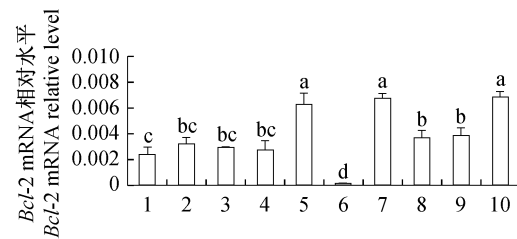


图 4 Bcl-2 基因在草鱼不同组织的表达

1. 心; 2. 肝脏; 3. 脾脏; 4. 鳃; 5. 肾; 6. 肌肉; 7. 脂肪; 8. 脑; 9. 肠; 10. 精巢。

字母不同代表差异显著 ($P < 0.05$)。

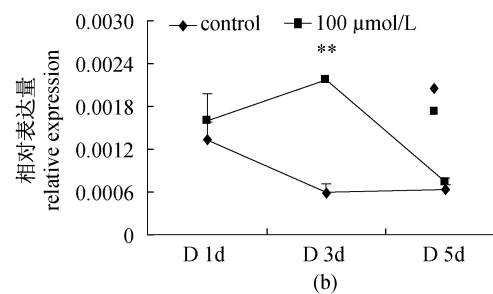
Fig. 4 Tissue expression of Bcl-2 in grass carp

1. heart; 2. liver; 3. spleen; 4. gills; 5. kidney; 6. muscle; 7. lipid; 8. brain; 9. intestine; 10. testis.

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

2.6 DHA 对草鱼脂肪细胞 Bcl-2 基因表达的影响

qRT-PCR 方法分析结果表明,从接种到汇合阶段(图 5-a),100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 处理草鱼脂肪细胞后,Bcl-2 表达水平在第 3 天极显著低于对照组 ($P < 0.01$),此后维持到第 5 天基本不变 ($P < 0.05$);细胞汇合进入诱导阶段后(图 5-b),处理组 Bcl-2 的表达在诱导第 3 天极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。



3 讨论

Bcl-2 家族因其在细胞凋亡中的作用受到了人们的关注。目前,人、小鼠、鸡、猪的 *Bcl-2* 基因均已被克隆,在鱼类中仅见于斑马鱼、鲤。实验成功克隆了草鱼 *Bcl-2* 基因 cDNA 全长,并发现,草鱼 *Bcl-2* cDNA 和氨基酸与斑马鱼、鲤具有很高同源性,而与其他动物的同源性较低。通过构建 *Bcl-2* 系统进化树分析表明,草鱼 *Bcl-2* 位于鱼纲这一支,与斑马鱼的亲缘关系最近。Cols Vidal 等^[14]通过对鲤和其他物种 *Bcl-2* 基因构建系统发育树指出,鲤 *Bcl-2* 基因与斑马鱼的亲缘关系最近。这与草鱼、斑马鱼和鲤都是鱼纲鲤科鲤形目的分类地位是一致的。

对草鱼 *Bcl-2* 氨基酸序列结构预测分析显示,该蛋白具有与哺乳动物十分相似的 1 个螺旋跨膜结构,通过一段螺旋跨膜区域固定在细胞膜上,23 个氨基酸组成跨膜区,说明 *Bcl-2* 是一种跨膜蛋白,这与 Hockenbery 等^[1]和 Yang 等^[2]发现人的 *Bcl-2* 是一种位于线粒体膜的跨膜蛋白一致。草鱼 *Bcl-2* 蛋白仅含有 BH1、BH2 和 BH3 结构域,在靠近 5' 的 N 端缺少 BH4 结构域,而斑马鱼^[9]、哺乳动物^[20-22]等物种同时含有 BH1-BH4 区域。草鱼 *Bcl-2* 基因缺少 4 个 BH 结构域中的 BH4 结构域,这可能是由于可变剪切造成的^[23]。人的 *Bcl-2* 蛋白分子量 25 ku^[1],实验获得草鱼 *Bcl-2* 蛋白的分子量为 14.14 ku,这可能也是由于草鱼 *Bcl-2* 蛋白发生可变剪切造成^[23]。在 *Bcl-2* 家族参与的细胞凋亡中,Strasser^[24]发现在 *Bcl-2* 的 4 个 BH 结构域中,BH1、BH2 和 BH3 发挥重要作用,BH4 结构域在细胞凋亡中也不可或缺^[25]。实验发现草鱼 *Bcl-2* 基因缺少 BH4 结构域,其具体机制还需要进一步研究。

实验发现,*Bcl-2* 在草鱼的 10 个组织中均有表达,且在脂肪组织、肾脏和精巢表达量最高,在脑、小肠中表达量次之,在肌肉中表达量最低。而实验发现 *Bcl-2* 主要存在于胸腺髓质存活的 T 细胞中,在非淋巴组织也有限表达,并存在于激素或生长因子调节增生和退化的腺上皮以及可以分化为多种类型细胞的上皮,例如皮肤和肠,还有长寿命的有丝分裂后细胞,如神经^[26]。此外,*Bcl-2* 在肝脏发育阶段、成人肝脏和肝脏处于病变状态时中均有表达^[27]。而在哺乳动物脂肪组织中,随着

脂肪生成 *Bcl-2* 表达升高^[28]。Chandler 等^[29]发现,在人的后肾间充质细胞诱导分化成肾泡和肾单位时,*Bcl-2* 表达快速上调,但 *Bcl-2* 在间叶细胞和肾壶腹中基本检测不到;处于发育时期的肾脏中,凋亡细胞的分布与 *Bcl-2* 的表达成负相关;在成人肾脏中 *Bcl-2* 也有表达。关于 *Bcl-2* 基因的组织差异表达分析尚未见报道。

DHA 能诱导平滑肌细胞等正常细胞、结肠癌细胞和 3T3-L1 脂肪细胞发生凋亡^[30-31,18],其在 3T3-L1 脂肪细胞中的作用具有剂量一效用关系,浓度越高,促进效果越明显^[18]。实验发现,在脂肪细胞增殖阶段,处理组 *Bcl-2* 的表达低于对照组,细胞汇合进入分化阶段后,处理组 *Bcl-2* 的表达高于对照组,且在诱导第 3 天存在极显著差异。先前有研究指出,添加 DHA 复合物后,U251 胶质瘤细胞的 *Bcl-2* mRNA 水平显著降低^[32],与实验脂肪细胞增殖阶段的情况类似;而 Verlengia 等^[33]发现 DHA 处理后,Raji 细胞中 *Bcl-2* 的表达升高,与实验脂肪细胞分化阶段的结果一致。Shu 等^[34]发现细胞性别和细胞年龄会影响人的脂肪组织来源的干细胞,而对患有乳腺癌的患者研究发现,*Bcl-2* 表达与患者的年龄、肿瘤大小等无关^[35]。由于实验对 *Bcl-2* 基因表达所采用的草鱼均为 1 kg 左右雄性草鱼,未能深入研究性别对 *Bcl-2* 表达的影响。DHA 对草鱼脂肪细胞凋亡基因的影响及其与脂肪细胞凋亡的关系、*Bcl-2* 的表达是否与年龄及体质量有关尚需深入研究。

参考文献:

- [1] Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death [J]. *Nature*, 1990, 348 (6299): 334 - 336.
- [2] Yang J, Liu X S, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked [J]. *Science*, 1997, 275 (5303): 1129 - 1132.
- [3] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy [J]. *Oncogene*, 2007, 26(9): 1324 - 1337.
- [4] Yin X M, Oltvai Z N, Korsmeyer S J. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax [J]. *Nature*, 1994, 369(6478): 321 - 323.
- [5] Lindsten T, Ross A J, King A, et al. The combined

- functions of proapoptotic bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues [J]. *Molecular Cell*, 2000, 6 (6) : 1389 – 1399.
- [6] Oltval Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74 (4) : 609 – 619.
- [7] Cheng E H, Wei M C, Weiler S, *et al.* BCL-2, BCL-X_L Sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis [J]. *Molecular Cell*, 2001, 8 (3) : 705 – 711.
- [8] Chen Z Y, Istfan N W. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells [J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2000, 63 (5) : 301 – 308.
- [9] Joensuu H, Pykkänen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer [J]. *The American Journal of Pathology*, 1994, 145 (5) : 1191 – 1198.
- [10] Velmurugan G V, White C. Calcium homeostasis in vascular smooth muscle cells is altered in type 2 diabetes by Bcl-2 protein modulation of InsP3R calcium release channels [J]. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 2012, 302 (1) : 124 – 134.
- [11] An F M, Gong B D, Wang H, *et al.* miR-15b and miR-16 regulate TNF mediated hepatocyte apoptosis via BCL2 in acute liver failure [J]. *Apoptosis*, 2012, 17 (7) : 702 – 716.
- [12] Briscini L, Tonello C, Dioni L, *et al.* Bcl-2 and Bax are involved in the sympathetic protection of brown adipocytes from obesity-linked apoptosis [J]. *Federation of European Biochemical Societies*, 1998, 431 (1) : 80 – 84.
- [13] Eimon P M, Ashkenazi A. The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2010, 15 (3) : 331 – 349.
- [14] Cols Vidal M, Hoole D, Williams G T. Characterisation of cDNAs of key genes involved in apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25 (5) : 494 – 507.
- [15] 吉红, 曹艳姿, 刘品, 等. 饲料中 HUFA 影响草鱼蛋白质代谢的研究 [J]. *水生生物学报*, 2009, 33 (5) : 881 – 889.
- [16] Papineau D, Gagnon A, Sorisky A. Apoptosis of human abdominal preadipocytes before and after differentiation into adipocytes in culture [J]. *Metabolism*, 2003, 52 (8) : 987 – 992.
- [17] Kim H K, Nelson-Dooley C, Della-Fera M A, *et al.* Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice [J]. *The Journal of Nutrition*, 2006, 136 (2) : 409 – 414.
- [18] Kim H K, Della-Fera M A, Lin J, *et al.* Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *The Journal of Nutrition*, 2006, 136 (12) : 2965 – 2969.
- [19] Chiu L C M, Wong E Y L, Ooi V E C. Docosahexaenoic acid from a cultured microalga inhibits cell growth and induces apoptosis by upregulating Bax/Bcl-2 ratio in human breast carcinoma MCF-7 cells [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004, 1030 : 361 – 368.
- [20] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival [J]. *Science*, 1998, 281 (5381) : 1322 – 1326.
- [21] Kelekar A, Thompson C B. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis [J]. *Trends in Cell Biology*, 1998, 8 (8) : 324 – 330.
- [22] Reed J C. Bcl-2 family proteins [J]. *Oncogene*, 1998, 17 (25) : 3225 – 3236.
- [23] Tsujimoto Y, Croce C M. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83 (14) : 5214 – 5218.
- [24] Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005 (5) : 189 – 200.
- [25] Reed J C, Zha H, Aime-Sempe C, *et al.* Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1996, 406 : 99 – 112.
- [26] Hockenbery D M, Zutter M, Hickey W, *et al.* BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88 (16) : 6961 – 6965.
- [27] Feldmann G. Liver apoptosis [J]. *Journal of Hepatology*, 1997, 26 (suppl. 2) : 1 – 11.
- [28] Sorisky A, Magun R, Gagnon A M. Adipose cell

- apoptosis:death in the energy depot[J]. International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders, 2000,24(Suppl.4):S3-7.
- [29] Chandler D, El-Naggar A K, Brisbay S, *et al.* Apoptosis and expression of the *bcl-2* proto-oncogene in the fetal and adult human kidney:Evidence for the contribution of *bcl-2* expression to renal carcinogenesis[J]. Human Pathology, 1994,25(8):789-796.
- [30] Diep Q N, Touyz R M, Schiffrin E L. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Hypertension, 2000,36(5):851-855.
- [31] Chen Z Y, Istfan N W. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 coloncancer cells[J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids,2000,63(5):301-308.
- [32] 姚文环,刘艳,冯宪光,等. 十二碳六烯酸复合物对 U251 胶质瘤细胞中 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达水平的影响[J]. 毒理学杂志,2010(1):24-26.
- [33] Verlengia R, Gorjão R, Kanunfre C C, *et al.* Effects of EPA and DHA on proliferation, cytokine production, and gene expression in Raji cells[J]. Lipids,2004,39(9):857-864.
- [34] Shu W, Shu Y T, Dai C Y, *et al.* Comparing the biological characteristics of adipose tissue-derived stem cells of different persons[J]. Journal of Cellular Biochemistry,2012,113(6):2020-2026.
- [35] 徐艳峰,王美清,李红. 乳腺癌中 Bcl-2 及 nm23 表达的研究[J]. 山东医科大学学报,1998,36(4):279-285.

Molecular cloning, tissue expression pattern of *Bcl-2* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and its expression change after the treatment of DHA in *in-vitro* cultured adipocyte

HUANG Jiqin¹, ZHANG Jianlu¹, LI Yang^{1,2}, LIU Pin¹, LI Nanchong¹, LEI Caixia¹, JI Hong^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. Institute of Fisheries Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: To investigate the effects of docosahexaenoic acid (DHA) on the expression profiles of B cell CLL/lymphoma-2 (*Bcl-2*) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) different tissues and adipocyte *in vitro*, the rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique was used to clone the full-length cDNA of *Bcl-2* gene of grass carp, and the real-time PCR (qRT-PCR) was employed in the analysis of gene expression pattern in different tissues and in the *in-vitro* cultured adipocyte of grass carp. The results revealed that the full-length *Bcl-2* cDNA is 1 292 bp and contains a 5'-untranslated region with 133 bp and 3'-untranslated region with 784 bp. The open reading frame (ORF) has 375 nucleotides encoding 124 amino acids. The deduced amino acid sequences of *Bcl-2* of grass carp displayed higher similarities with *Cyprinus carpio* (89.5%) and *Danio rerio* (91.1%), but lower identity to the other animals with the similarity ranging from 57.7% to 62.0%. The molecular weight of encoded protein was predicted at 14.14 ku with *pI* at 4.68. The *Bcl-2* gene is widely expressed in heart, hepatopancreas, spleen, gills, kidney, muscle, intrapancreal fat body (IPF), brain, intestine and spermary. The highest expression level was observed in IPF, kidney, spermary and the lowest expression level was observed in muscle. The expression of other tissues was between IPF and muscle. After DHA treatment, the *Bcl-2* expression was downregulated in the proliferation phase, but upregulated in the differentiation phase. This suggested the *Bcl-2* was expressed widely, and DHA could regulate the expression of *Bcl-2* gene.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; B cell CLL/lymphoma-2 (*Bcl-2*); docosahexaenoic acid; gene expression

Corresponding author: JI Hong. E-mail: jihong0405@hotmail.com