DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15488

低温胁迫诱导斑马鱼 ZF4 细胞 ROS 及 MAPK 相关蛋白 表达的影响

许琼琼,韩兵社,罗军涛,李艳,侯艳雯,胡鹏,张俊芳 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室,上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306

摘要:为了研究鱼类低温下分子调控机制及其与活性氧(reactive oxygen species, ROS)之间的关系,本实验对斑马 鱼(*Danio rerio*)胚胎成纤维 ZF4 细胞进行不同程度的低温胁迫(18℃和 10℃),监测其在不同低温胁迫时间下(1 d、3 d 和 5 d) ROS 的变化以及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路中蛋白的表达情况。结果显示:(1) DCFH-DA 探针法表明在低温胁迫作用下,细胞内 ROS 含量增加。细胞内 ROS 上升水平与外界胁迫压力成正相关。 低温处理 3 d 后,18℃和 10℃的细胞,其 ROS 含量与对照组(28℃)相比分别显著升高到(1.23±0.04)倍(*P*<0.05)和 (2.31±0.08)倍(*P*<0.05)。(2) Western Blot 检测磷酸化的 p38 (p-p38) 和磷酸化的 JNK (p-JNK p54 和 p-JNK p46) 的 水平变化,结果显示低温胁迫可以使 p38 和 JNK 的活性增强,且均在 10℃处理 3 d 达到最高水平。(3)进一步检测 DNA 断裂标记蛋白 γH2A.X 的表达水平,结果显示,无论在 18℃还是 10℃,其在第 3 天呈现高表达。本实验初步 证实低温胁迫能够诱导斑马鱼细胞 ROS 的产生;通过对不同时间点的蛋白表达水平检测,发现 p-JNK、p-p38 和 γH2A.X 激活时间点与低温诱导 ROS 表达时间点相吻合。该研究为后期对斑马鱼细胞低温胁迫实验奠定基础,其 中低温下处理 3 d 可以作为一个检测各个蛋白变化的关键时间点。

关键词: ROS; 斑马鱼 ZF4 细胞; 低温胁迫; MAPKs; γH2A.X 中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2016)04-0771-06

鱼类作为变温动物,水温直接决定了其重要 的生理特征和行为^[1-2]。当水温低于鱼类的适应温 度范围时,低温胁迫产生的压力会严重影响鱼类 的生理活动,甚至会导致鱼类死亡^[3-5]。因此,探 讨低温胁迫下的关键分子调控机制能更清晰地阐 明鱼类如何适应低温胁迫。

目前,利用高通量测序技术已经鉴定出了大 量与温度相关的候选基因^[6]。另外,在之前的研究 中,通过对生活在极端寒冷的南极海域中的南极 鱼亚目鱼类与温带鱼类进行转录组比较分析,本 课题组鉴定出了一些与低温响应相关的信号通路, 其中包括活性氧(reactive oxygen species, ROS)的 清除和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路^[7]。ROS 是需氧细 胞在代谢过程中产生的一系列活性氧簇,包括超 氧自由基(O_2^-)、过氧化氢(H₂O₂)和羟自由基(-OH) 等^[8]。在拟南芥中,低温能促使 ROS 在细胞中积 累,而 ROS 作为第二信使,能诱导钙离子信号从 而引起寒冷调控的信号通路,来影响下游基因的 表达^[9]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是一类丝氨酸–苏氨酸蛋白 激酶,其信号通路从酵母到人类都较为保守,来 调节细胞生长和对环境的应激适应等多种重要的 生理过程^[10]。MAPK 由 4 个亚族组成: ERK、p38、

收稿日期: 2015-12-28; 修订日期: 2016-01-29.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372516); 上海市自然科学基金项目(13ZR1419500); 上海市教育委员会"东方学者"计划 支持项目; 上海市人才发展资金项目(201457)资助.

作者简介: 许琼琼(1992-), 女, 学生, 硕士, 专业方向为生物学. E-mail: 1026021414@qq.com

通信作者: 张俊芳, 教授. E-mail: jfzhang@shou.edu.cn

JNK 和 ERK5, 其中 JNK 蛋白因其具有或者不含有 碳末端的羧基, 产生分子量分别为 46 kD 和 54 kD 的两种蛋白, 分别称为 p46 和 p54。这些 MAPK 的活性都受到其蛋白上活化环中的磷酸化位点来 控制。在哺乳动物细胞中, ROS 能直接调控 MAPK 通路中的关键蛋白(例如: p38、JNK、ASK1 等)来影响细胞的增殖和分化^[11-12]。尽管一些研究 表明低温会诱导鱼类组织中 ROS 水平的上升^[13-14], 但是关于 ROS 以及 MAPK 通路在鱼类低温响应 分子机制中所发挥的作用尚不明确。

斑马鱼(Danio rerio)由于其易于饲养维护、繁 殖周期较短和基因组注释信息完备,因而成为一种 广泛应用于遗传学和分子生物学的模式动物^[15]。斑 马鱼 ZF4 细胞系是来源于孵化后 1 d 的斑马鱼胚 胎^[16],其被广泛应用于低温下鱼类基因表达调控和 信号通路的研究中^[17]。本研究监测了不同时间(1 d、 3 d 和 5 d)、不同低温条件 (18℃和 10℃)下斑马鱼 ZF4 细胞 ROS 水平以及 MAPK 蛋白的表达情况,为 研究鱼类低温下响应分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

斑马鱼胚胎成纤维细胞 ZF4 购于 American Type Culture Collection (ATCC), 置于 28℃、5% CO₂培养箱中。用 DMEM: F12 培养基(10%胎牛 血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素)培 养。每 2 d 换液, 待细胞生长汇合至 90%以上用 0.25%不含 EDTA 的胰蛋白酶消化, 1:3 传代后继 续培养。本实验所用 ZF4 细胞为 4~6 代。

1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清和胰蛋白酶购于 Gibco 公司; DMEM: F12液体培养基(Hyclone, SH30023.01B)、 谷氨酰胺 L-Glutamine(Hyclone, SH30034.01)和杜 氏磷酸缓冲液 DPBS 购于 Thermo 公司; 2, 7 二氨 基荧光素联乙酰 DCFH-DA 探针和二甲基亚砜 DMSO购于Sigma公司; 兔属p-p38(Thr202/Tyr204)、 p-JNK(Thr183/Tyr185)单抗和辣根过氧化物酶标 记的羊抗兔、羊抗鼠二抗购于 Cell Signaling Technology 公司; β-actin 单抗购于 Sigma 公司; 鼠 属 γH2A.X (phosphorylate S139)单抗购于 Abcam 公司; Western 裂解液、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓 冲液、TEMED 购于碧云天公司; Bradford 蛋白浓 度测定试剂盒购于上海生工生物工程技术服务有 限公司; ECL 显影液购于 Bio-Rad; 其他常用试剂 均为国产分析纯。

主要仪器:细胞低温培养箱(Galaxy170R, eppendorf)、Accuri C6 流式细胞仪(BD)、凝胶成 像系统(Amersham Imager 600);电泳仪(Bio-Rad); 倒置荧光显微镜(Zeiss)。

1.3 细胞低温处理及形态观察

取对数生长期的细胞,以每孔4.5×10⁵的密度 接种于35 mm 细胞培养皿中,在28℃培养24 h 后, 其汇合度至70%~90%放到低温培养箱中(18℃和 10℃)处理1 d、3 d 和 5 d。低温处理后,利用倒 置显微镜观察细胞形态并拍照。

1.4 ROS 测定

收集 35 mm 细胞培养皿中常温(28℃)和不同时 间点(1 d、3 d 和 5 d)不同低温处理(18℃和 10℃)的 细胞,加入 DCFH-DA 探针液(终浓度为 20 μ mol/L) 孵育 30 min。去掉探针孵育液,用 DPBS 清洗 3 遍后,1000 g 离心 5 min 收集细胞,最后用 500 μ L DPBS 重悬细胞于 1.5 mL 离心管中用于上流式细 胞仪分析。在流式细胞仪中,利用 FL1 通道(激发 波长 488 nm)检测探针结合的情况,来反映细胞 中 ROS 的含量。

1.5 Western Blot 分析蛋白表达

吸掉 35 mm 培养皿中培养基, DPBS 清洗 3 遍, 加入 500 μL Western 细胞裂解液(含有 cocktail 蛋 白酶抑制剂),用刮板将细胞收集于 1.5 mL 离心 管中,4[°]C 12000 g 离心 15 min,收集上清,用 Bradford 法测蛋白浓度。蛋白样品中加入 5×蛋白 loading buffer,95[°]C变性 5 min,等量取出 30 μg 总 蛋白,于 12% SDS-PAGE 凝胶上分离蛋白质。电 泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上,用丽春红染 色检测转膜效率,清洗干净后用 5%的脱脂牛奶 封闭 2 h,一抗 4[°]C孵育过夜,再用以辣根过氧化 物酶标记的二抗封闭液封闭 2 h,用 ECL 显影曝 光拍照,分析蛋白表达变化。

1.6 数据统计分析

所有实验结果均是来自至少 3 次独立实验, 图中所示结果均为均值±标准差(\bar{x} ±SD)。单因素 方差分析(one-way ANOVA)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 Turkey's 多重比较来检测。

2 结果与分析

2.1 ZF4 低温下形态学检测

倒置相差显微镜下观察可见,在常温下(28℃), ZF4 细胞呈现多边形,细胞核呈椭圆形,细胞呈 现铺路石排列(图 1)。在 18℃低温处理下,细胞形 态变化不大,处理 5 d 的时候,有少量贴壁细胞脱 落。而在 10℃低温处理 3 d 的时候,可以看见细胞 收缩成长条状,细胞之间的空隙变大,而在 10℃ 处理 5 d 的时候,能够在培养基中发现明显可见 的细胞脱落悬浮在培养基中。

2.2 低温诱导 ROS 产生

与常温下细胞相比, 无论是在 18° 还是在 10° , 低温均能诱导细胞内 ROS 水平上升 (图 2 A)。与对 照组(28°)相比, 在低温处理 5 d 后, 18° 处理的细 胞其 ROS 含量显著升高到(1.42 ± 0.06)倍(P<0.05); 而 10° 处理的细胞其 ROS 含量显著升高到 (2.46 ± 0.08)倍(P<0.05)(图 2B)。从 ROS 上升的时 间梯度点上来看, 18° 处理 5 d 后, 细胞的 ROS 含量 有显著的升高; 而在 10° 处理 1 d 后, ROS 含量就显 著上升[达到(1.36 ± 0.16)倍, P<0.05], 在处理 3 d 后, ROS 升高更加显著[达到(2.31 ± 0.05)倍, P<0.05]。



图 1 ZF4 细胞在常温 28℃以及低温(18℃和 10℃)处理 1 d, 3 d 和 5 d 的细胞形态图 Fig. 1 The cellular morphology at normal (28℃) and low (18℃ and 10℃) temperatures at indicated time points (1 d, 3 d and 5 d)

2.3 低温诱导 MAPK 通路中关键蛋白 p-p38、p-JNK 以及 γH2A.X 的表达

MAPK 蛋白激酶家族蛋白 p38 和 JNK 的活化 需要在其内部特定位点进行磷酸化修饰,所以检 测其磷酸化水平(p-p38 和 p-JNK)可以反映其活性 状态。Western Blot 结果显示,无论在 18℃还是 10℃,低温都诱导了 p-JNK p54 的表达。值得注 意的是在 10℃处理 3 d 后, p-JNK p54 和 p-JNK p46 的表达量大幅度上升,同样 p-p38 的蛋白也发

现了类似的结果(图 3)。

 γ H2A.X 是组蛋白 H2A.X 的磷酸化形式, DNA 发生损伤时, H2A.X 可被磷酸化为 γ H2A.X。 为了查看是否低温引起了 DNA 断裂,我们检测 了 DNA 断裂标记蛋白 γ H2A.X 的表达,我们同样 发现 10℃处理 3 d 后, γ H2A.X 的表达有明显的升 高;而在 18℃处理 3 d 后,我们同样也观察到 γ H2A.X 的表达被强烈的诱导,说明 18℃的低温 胁迫也引起了细胞内的 DNA 断裂(图 3)。



图 2 细胞内 ROS 含量检测

A. 各个温度和时间点下 ROS 的含量检测; B. 低温处理下
ROS 含量的变化. 图中所示为均值±标准误,数据来自 4 次
独立的生物学重复. 差异的显著性用不同字母来表示.

Fig. 2 Determination of ROS level in cells at different temperatures by flow cytometry

A: The detection of ROS under various temperatures and times points. B: The fold change of ROS level of each cell population was quantified. Data shown are the means \pm standard deviation of at least four independent experiments. Significances (*P*<0.05) between samples are indicated by different lower cases.

18°C 10°C 28°C 28°C 3 d 5 d 1 d 3 d 5 d 1 d p54 p-JNK b46 p-p38 γH2A.X ACTB



白表达变化

ACTB (β-actin) 作为内参.

Fig. 3 Western Blot showing the protein levels of phosphorylated-JNK(Thr183/Tyr185), phosphorylated-p38 (Thr202/Tyr204) and γ H2A.X (phosphorylate S139) at low temperatures ACTB served as a control.

3 讨论

在之前的研究中, 通过对南极鱼亚目的鳞头

犬牙南极鱼(Dissostichus mawsoni)和 5 种温带硬 骨鱼类——斑马鱼(Danio rerio)、鲑鱼(Salmo salar)、 三刺鱼(Gasterosteus aculeatus)、底鳉(Fundulus heteroclitus)和青鳉(Orvzias latipes)—在脑、肝、 卵巢、肾 4 个组织中进行转录组比较分析、Chen 等^[7]发现了很多与 ROS 清除相关的基因在南极鱼 中显著上调、包括磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶 PHGPx、过氧化物还原酶 Prdx5 和超氧化物歧化 酶 SOD 等。这提示低温会诱导产生 ROS 而引起 氧化损伤、而南极鱼类为了适应低温而代偿性地 增加一些抗氧化剂的表达。在本研究中、低温能 明显诱导斑马鱼的 ZF4 细胞中 ROS 水平的增加, 并且增加程度依赖于低温胁迫的强度(18℃和10℃) 和低温胁迫持续的时间(1~5 d)(图 2)。尽管细胞内 ROS 含量随着低温处理的时间增加而上升,但是 10℃低温处理 3~5 d, ROS 含量没有显著性上升 (图 2B), 这说明斑马鱼细胞对 ROS 含量的调控有 着精确的反馈机制、笔者推测在这个过程中斑马 鱼细胞通过对低温刺激的适应,而高表达一些抗 氧化酶如 SOD 来调控细胞内 ROS 的含量。在斑 马鱼中研究也表明、低温胁迫会引起大脑中 SOD 活性升高^[18]。

在之前的低温胁迫研究中,研究者们通过对 斑马鱼实施18℃^[18]、16℃^[19]或12℃的低温胁迫^[20], 来检测与温度耐受相关的一些基因的表达状况。 本研究中,我们依据之前的研究体系^[17],选取了 2 个温度点对斑马鱼细胞进行低温处理:18℃和 10℃。这两个温度点能典型地反映出斑马鱼细胞 低温刺激的生理状态:斑马鱼在18℃的低温下还 能保持正常的游动;而在 10℃的低温下,斑马鱼 有着较少的游动。这两个温度点能够很好的研究 在较低和较强低温胁迫下 ROS 的产生情况。通过 观察细胞的状态,我们也能发现:斑马鱼细胞在 18℃的低温胁迫下能很好地适应;而在 10℃低温 胁迫下有着数目可观的细胞脱离培养皿而悬浮在 培养基中(图 1)。

MAPK 通路中包括 3 个重要的丝裂原活化蛋白激酶: ERK、JNK、p38, 它们介导将细胞外的刺激信号(例如冷温)转导至细胞及核内,并引起细

胞内的一系列生物学反应、包括细胞增殖、分化 及凋亡^[21]。而这些 MAPKs 的活性是由活化环的 氨基酸序列中的磷酸化位点所调控。通过对 ZF4 细胞中 MAPK 通路蛋白表达的检测、本研究发现 p-JNK p54、p-JNK p46 和 p-p38 表达量在 10℃处 理 3 d 的时候被强烈诱导,并且 DNA 断裂标示物 γH2A.X 显著上调(图 3)。值得注意的是,在同一 个时间点, ROS 的含量大幅度上升(图 2B), 这说 明了在斑马鱼 ZF4 细胞中 ROS 的升高和 MAPK 通路存在着很强的联系。在之前的研究中, ROS 上升和 MAPK 通路激活的同步性已经在哺乳动物 模型中得到证实,并且抗氧化剂能够减少 ROS 的 产生同时抑制 MAPK 通路的激活^[22-23]。ROS 能 够产生氧化压力、在小鼠 ASK1 敲除实验中证实氧 化压力会激活级联蛋白激酶 ASK1、从而来调控 JNK 和 p38 信号通路^[24]。考虑到 MAPK 通路是非 常保守的^[25]、同样在斑马鱼 ZF4 细胞中、p-JNK p54、 p-JNK p46 和 p-p38 的表达在 10℃下明显 增高(图 3)。综合以上发现,我们推测在斑马鱼中, ROS 也可能通过 ASK1 来调控 JNK 和 p38 信号通 路,需要更多的实验来证明这点。值得注意的是, 我们在 18℃刺激 3 d 的细胞中、发现了强烈的 p-p38 的表达, 这暗示有其他不依赖于 ROS 的分 子通路来激活 p38 通路、这需要更多的研究去探 明其中的分子通路机制。

总而言之,本研究通过对斑马鱼细胞的不同 低温胁迫,研究不同时间点下细胞内 ROS 的含量 以及激活的 MAPKs (p-JNK p54、p-JNK p46、p-p38) 的表达分析,发现在 10℃处理 3 d 后,细胞内 ROS 含量显著上升以及 MAPK 通路被激活,这个 低温处理的关键时间点(3 d)可以为我们以后在 ZF4 细胞系中研究低温适应的分子机制提供一个 很好的切入点。

参考文献:

- Brett J R. Temperature and fish[J]. Chesapeake Sci, 1969, 10(3): 275–276.
- [2] Perry A L, Low P J, Ellis J R, et al. Climate change and distribution shifts in marine fishes[J]. Science, 2005, 308(5730): 1912–1915.

- [3] Donaldson M R, Cooke S J, Patterson D A, et al. Cold shock and fish[J]. J Fish Biol, 2008, 73(7): 1491–1530.
- [4] Bonga S W. The stress response in fish[J]. Physiol Rev, 1997, 77(3): 591–625.
- [5] Long H. The effect of temperature to fish survival[J]. Fishery Modernization, 2005(2): 20-22.[龙华. 温度对鱼类生存的 影响[J]. 渔业现代化, 2005(2): 20-22.]
- [6] 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.
- [7] Chen Z, Cheng C H, Zhang J, et al. Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(35): 12944– 12949.
- [8] Nordberg J, Arner E S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(11): 1287–1312.
- [9] Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J K. Cold stress regulation of gene expression in plants[J]. Trends Plant Sci, 2007, 12(10): 444–451.
- [10] Chen J Y, Wang C, Wang J, et al. Advances in MAPK signaling pathway[J]. China Medicine and Pharmacy, 2011, 1(8): 32-34.[陈建勇, 王聪, 王娟, 等. MAPK 信号通路研究进展[J]. 中国医药科学, 2011, 1(8): 32-34.]
- [11] Ray P D, Huang B W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling[J]. Cell Signal, 2012, 24(5): 981–990.
- [12] Son Y, Cheong Y K, Kim N H, et al. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?[J]. J Signal Transduct, 2011: Article ID 792639.
- [13] Lesser M P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 253–278.
- [14] Heise K, Estevez M, Puntarulo S, et al. Effects of seasonal and latitudinal cold on oxidative stress parameters and activation of hypoxia inducible factor (HIF-1) in zoarcid fish[J]. J Comp Physiol B, 2007, 177(7): 765–777.
- [15] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013, 496(7446): 498–503.
- [16] 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.
- [17] Hu P, Liu M, Zhang D, et al. Global identification of the genetic networks and cis-regulatory elements of the cold re-

sponse in zebrafish[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(19): 9198-9213.

- [18] Tseng Y C, Chen R D, Lucassen M, et al. Exploring uncoupling proteins and antioxidant mechanisms under acute cold exposure in brains of fish[J]. PLoS ONE, 2011, 6(3): e18180.
- [19] Long Y, Li L, Li Q, et al. Transcriptomic characterization of temperature stress responses in larval zebrafish[J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e37209.
- [20] Tang S J, Sun K H, Sun G H, et al. Cold-induced ependymin expression in zebrafish and carp brain: implications for cold acclimation[J]. FEBS Lett, 1999, 459(1): 95–99.
- [21] Johnson G L, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase

pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. Science, 2002, 298(5600): 1911–1912.

- [22] Torres M, Forman H J. Redox signaling and the MAP kinase pathways[J]. Biofactors, 2003, 17(1–4): 287–296.
- [23] Mccubrey J A, Lahair M M, Franklin R A. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways[J]. ARS, 2006, 8(9–10): 1775–1789.
- [24] Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis[J]. EMBO Rep, 2001, 2(3): 222–228.
- [25] Widmann C, Gibson S, Jarpe M B, et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human[J]. Physiol Rev, 1999, 79(1): 143–180.

Effects of cold stress on ROS production and expression of MAPK proteins in zebrafish ZF4 cells

XU Qiongqiong, HAN Bingshe, LUO Juntao, LI Yan, HOU Yanwen, HU Peng, ZHANG Junfang

Ministry of Education; College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In our previous study, we compared the transcriptome between Antarctic fish and temperate fish and found that genes were involved in reactive oxygen species (ROS) scavenge and Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway associated with the cold adaptation in fish. To further study the regulatory network and the reactive oxygen species (ROS) homeostasis under cold stress in fish, we examined the level of ROS and the expression of stress-related proteins in zebrafish Danio rerio-derived ZF4 cells exposed to mildly and severely cold temperatures, 18°C and 10°C, at various time points (1 d, 3 d, and 5 d). Results showed that (1) DCFH-DA probe method was used to determine the level of ROS in cells. We found that the level of ROS in cell positively correlated with the intensity of cold stress. After 3 days of cold treatment, the level of ROS in cells significantly increased to 1.23 ± 0.04 (P<0.05) and 2.31 ± 0.08 (P<0.05) times, respectively, at 18°C and 10°C, compared with that in cells at 28°C. (2) Western blot showed that the expression of MAPKs (p-JNK p54, p-JNK p46 and p-p38) was induced under cold stress, and reached the highest at 3 d of 10°C. (3) In addition, the expression of γ H2A.X reached peak after 3 days both at 18°C and 10°C. These findings showed that cold temperature could induce the production of ROS in ZF4 cells. The level of ROS in ZF4 cells is dependent on the stress intensity and duration. We observed the markedly induction of ROS in the cells at the first 3 days of cold treatment, while the expression of p-JNK, p-p38, and γ H2A.X was markedly induced at the 3 d, indicating that 3 d of cold treatment might be a key time point to determine the protein expression in ZF4 cells.

Key words: ROS; zebrafish ZF4 cells; low temperature stress; MAPKs; γH2A.X **Corresponding author:** ZHANG Junfang. E-mail: jfzhang@shou.edu.cn