

微囊藻毒素对尼罗罗非鱼原代肝细胞致毒机理的探讨

刘秀霞 梁旭方* 丁雪芬 王琳 林群 李光照 沈丹

(暨南大学生命科学技术学院 广州 510632)

摘要: 采用离体细胞培养诱导方法, 研究微囊藻毒素2LR (microcystin2LR, MC2LR) 对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 原代肝细胞的毒性效应。尼罗罗非鱼原代肝细胞经 10、50、150、500 LgPL MC2LR 体外诱导 24 h 后, 单细胞微量凝胶电泳(SCGE) 检测显示, 与对照组相比处理组出现明显的彗星拖尾现象, 说明 MC2LR 可引起尼罗罗非鱼肝细胞 DNA 的损伤, 并随着剂量的增加, DNA 的损伤程度增大。PP Annexin V 双染色流式细胞仪(FCM) 检测表明 MC2LR 能明显引起肝细胞凋亡, 与 SCGE 结果一致, 且 DNA 损伤程度越大, 细胞早期凋亡率越高, 呈现明显的时间、剂量依赖性。本研究为进一步从分子、细胞水平阐明 MC2LR 的毒性以及致毒机理提供重要的理论依据。

关键词: 微囊藻毒素(MC2LR); 原代肝细胞; 致毒机理; 尼罗罗非鱼

中图分类号: Q494 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)0525206

Microcystin2LR Toxicity on Primary Cultured Hepatocyte from *Oreochromis niloticus*

LIU Xiu2Xia LIANG Xu2Fang* DING Xu2Fen WANG Lin LIN Qun LI Guang2Zhao SHEN Dan

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The isolated hepatocytes of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) were exposed to MC2LR to study the mechanism of microcystin2LR (MC2LR) toxicity. After hepatocytes were exposed to 10, 50, 150, 500 LgPL MC2LR for 24 h respectively, the single cell gel electrophoresis assay (SCGE) was used to investigate the effects on DNA. Induction of DNA strand break in all MC2LR exposed groups was significantly higher than that of the control group. Treatment time and dose dependent DNA migration caused by MC2LR and was observed. Flow cytometry (FCM) analysis indicated that the percentage of hepatocyte apoptosis increased in a treatment time and dose dependent manner. These results provide first experimental evidence showing the mechanism of MC2LR toxicity at cellular and molecular levels.

Key words: Microcystin2LR(MC2LR); Primary cultured hepatocytes; Toxicity mechanism; Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

随着工农业生产排污的增加, 各地水体富营养化加剧, 藻类所引起的水污染问题已越来越引起人们的广泛关注。微囊藻毒素 (microcystin, MC) 是由铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)、水华鱼腥藻 (*Anabaena flos aquae*) 等产生的一组环状七肽的肝毒素^[1]。这种毒素具

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30670367), 广东省科技计划项目 (No. 2007B02070100, No. 2005B20301005) 和教育部留学回国人员科研启动基金项目;

* 通讯作者, E2mail: tliangxf@jnu.edu.cn;

第一作者介绍 刘秀霞, 女, 硕士; 研究方向: 基因表达调控; E2mail: xiuxia_791016@1631.com.

收稿日期: 200721222, 修回日期: 2008207202

有嗜肝特性, 进入机体后聚集在肝, 损伤肝细胞的细胞核及线粒体, 是肝癌的强烈促癌剂, 可引起鱼类等水生动物因肝损伤、肝内出血甚至肝坏死而中毒死亡^[2,3]。肝细胞膜上可能存在 MC 能通过的阴离子多肽通道, 或者通过胆酸转运蛋白进入肝细胞, 这可能是 MC 对肝细胞具有较高亲和力的原因^[4]。Guzman 等^[5] 在体内实验观察到, MC 中毒动物的肝组织损伤明显, 可见中央小叶区被炎症细胞浸润, 肝细胞出现脂肪样变性及细胞凋亡。动物体内实验表明, 细胞凋亡在微囊藻毒素 2LR (microcystin 2LR, MC2LR) 诱导的大鼠 (*Rattus norvegicus*) 肝损伤中起很大作用^[6,7]。MC 可同时特异性地改变肝细胞周期, 诱导肝细胞发生活跃的增生和凋亡, 两者之间的平衡失调有可能与其致癌机理有关^[8]。张建英^[9] 等对鲫鱼 (*Carassius auratus*) 淋巴细胞凋亡的研究, 得出 MC 是通过损伤鲫鱼淋巴细胞 DNA 而快速诱导淋巴细胞凋亡的结论。本研究选用尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 原代肝细胞为材料, 研究 MC2LR 对细胞的影响。采用单细胞微量凝胶电泳技术 (single cell gel electrophoresis assay, SCGE) 和 PIP Annexin V 双染色流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 检测 MC2LR 能否引起尼罗罗非鱼肝细胞 DNA 的损伤及细胞凋亡的改变, 以及其间的相互关系, 以进一步探讨 MC2LR 对细胞的毒性及作用机制。

1 材料与方法

111 材料 实验用尼罗罗非鱼购于广州石牌市场, 体重约 600 g。

112 主要实验试剂 微囊藻毒素购自 ALEXIS 公司。DMEM (dulbecco modified eagle medium) 购自 GibcoPBr1 公司。胎牛血清购自 Difco 公司。细胞凋亡检测抗体 Annexin VPI 试剂盒由北京宝赛生物技术有限公司生产。

113 尼罗罗非鱼肝实质细胞培养 实验鱼暂养 3 d 后, 剪断鳃部脉弓, 放血 10 min, 鱼体表面清洗、消毒后, 超净工作台内解剖取肝, 用 Hanks 液清洗, 然后将其剪成 1~ 2 mm³ 小块; 用 Hanks

液清洗后, 用 2 倍 (v/v) 的 0.125% 胰蛋白酶液 25 ~ 28 e 消化 50 min。依次过 100 目、200 目、400 目滤网, 800 rpm 离心 5 min 收集肝细胞, Hanks 液清洗 2 次, 培养基再悬浮, 计数细胞密度, 使其达到 (0.15~ 1.10) × 10⁶ cells/ml, 并用 0.14% 台盼蓝测定细胞活力 > 96%。肝细胞在多孔培养板或培养瓶中培养, 以含 10% 小牛血清及 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养液为培养基, 在 5% CO₂ 28 e 条件的 CO₂ 培养箱内培养。

114 肝细胞形态学观察 用显微镜观察细胞形态的变化并拍照。

115 微囊藻毒素对细胞凋亡和 DNA 的影响

11511 DNA 损伤观察 细胞培养方法同 113。加入 MC2LR 使其终浓度分别为 10、50、150、500 U/ml, 与细胞共同培养 24 h, 对照组加入 PBS。SCGE 实验参照 Singh 等^[10] 的方法并稍加改进: (1) 制片: 吸取 85 μl 10% 正常熔点琼脂糖均匀铺在预热的磨砂载玻片 (112 mm × 75 mm × 25 mm) 上, 迅速盖上盖玻片 (18 mm × 18 mm), 置 4 e 固化 10 min, 即第 1 层胶。取出载玻片小心揭去盖玻片, 吸取 70 μl 含约 10⁴ 个肝细胞的 0.175% 低熔点琼脂糖均匀铺在第一层凝胶上, 迅速加盖盖玻片, 置 4 e 固化 10 min, 即第 2 层胶。轻轻揭去盖玻片, 再于其上铺 70 μl 0.175% 低熔点琼脂糖, 同样盖上盖片, 置 4 e 固化 10 min, 即第 3 层胶。(2) 裂解: 取下盖玻片, 将凝胶载玻片浸没于新配制的裂解液中 (215 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂EDTA, 10 mmol/L Tris, pH 10.10。用前加终浓度为 1% Triton X2100 和 10% DMSO), 4 e 冰箱预冷至少 30 min。(3) 解旋: 从裂解液中取出载玻片用蒸馏水洗去多余的盐移入水平电泳槽解旋 40 min (0.12 mmol/L Na₂EDTA, 10 mmol/L NaOH, pH 13)。(4) 电泳: 电压 25 V, 电流 300 mA, 低温避光, 电泳时间 40 min。(5) 染色和观察: 电泳后的载玻片用 Tris-HCl 缓冲液中和 3 次, 每次 5 min, 中和后用 PBS 轻轻冲洗一遍。SYBR2Gold 染色剂染色 10 min, 染色后用蒸馏水轻轻冲洗一遍, 尽快置于荧光倒置显微镜下, 观察 DNA 图像, 用 ZEISS AX200

型荧光倒置显微镜系统进行观察与拍照。

11512 细胞凋亡测定 细胞培养方法同 113。加入 MC2LR 使其终浓度分别为 50、150、500 LgPL, 与细胞共同培养 8 h、24 h, 对照组加入 PBS。按上述时间终止细胞培养, 将对照组及实验组的尼罗罗非鱼肝细胞悬液浓度调整为(0.15~110) @10⁶ Pml, PBS 洗涤 2 次。离心收集细胞, 加入 500 LI 孵育液重悬浮。加入 10 LI Annexin V2FITC (20 LgPml) 混匀, 4 e 暗处孵育 30 min, 上机前加入 5 LI 碘化丙啶(propidium iodide, PI, 50 LgPml), 轻轻混匀, 避光于室温下孵育 5 min, 上机进行流式细胞仪检测。流式细胞仪光源为 488 nm 氩离子激光器, FITC 受激发后发绿色荧光, PI 发红色荧光。流式细胞仪分析数据。

2 结果

211 细胞形态 显微镜观察可见, 肝细胞正常, 细胞核完整、无固缩或碎裂现象, 能进行生长和细胞分裂并形成细胞团(图 1)。

212 彗星电泳图 荧光显微镜下观察 DNA 被 SYBR2Gold 染成绿色。对照组经 SCGE 显示未见明显彗星尾(图 2A), 只有 1 个圆形的荧光信

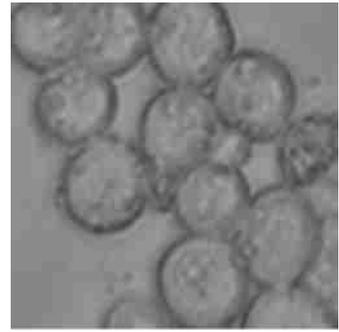


图 1 尼罗罗非鱼肝实质细胞培养的显微观察 (640@)

Fig. 1 Microscopic observation of cultured Nile Tilapia hepatocytes

号, 表明没有发生 DNA 链的断裂; 处理组出现明显的彗星拖尾, 表明 DNA 链发生断裂, 断片向阳极方向迁移, 从而形成一个像彗星样的拖尾, 并随着 MC2LR 浓度增大, 其彗星尾长越明显(图 2: B~ E)。500 LgPL MC2LR 处理组, 细胞 DNA 损伤最严重, 其荧光信号变小, 甚至不明显, 尾部长且尾部面积大(图 2E); DNA 损伤较轻者, 其头部较大, 尾部短且面积小(图 2B)。213 PIPAnnexin V 双染色流式细胞仪检测经 FCM 定量发现, 在 50~ 500 LgPL 剂量范围

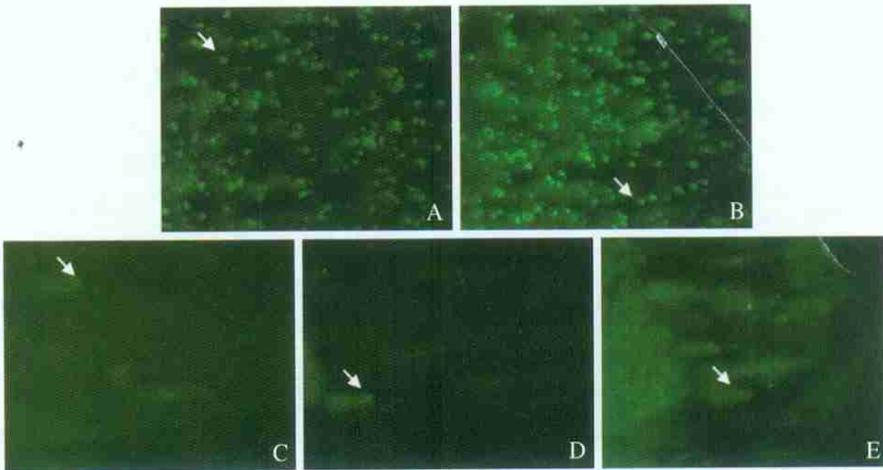


图 2 彗星电泳图 (250@)

Fig. 2 The comet images

A. PBS 处理尼罗罗非鱼肝细胞 24 h; B. 10 LgPL MC2LR 处理尼罗罗非鱼肝细胞 24 h; C. 50 LgPL MC2LR 处理尼罗罗非鱼肝细胞 24 h; D. 150 LgPL MC2LR 处理尼罗罗非鱼肝细胞 24 h; E. 500 LgPL MC2LR 处理尼罗罗非鱼肝细胞 24 h。

A. The control; B. Exposure to 10 LgPL MC2LR for 24 h; C. Exposure to 50 LgPL MC2LR for 24 h;

D. Exposure to 150 LgPL MC2LR for 24 h; E. Exposure to 500 LgPL MC2LR for 24 h.

内,不同浓度MC2LR作用下细胞凋亡率显著增加,不同时间作用下细胞凋亡率也显著增加。50 LgPL 染毒 8 h, 早期凋亡率为 516%; 500 LgPL

染毒 24 h, 早期凋亡率增高至 1713%。不同浓度MC2LR 处理 24 h 后各组的肝细胞凋亡率与 8 h 处理组比较, 差异均有显著性(图 3, 4)。

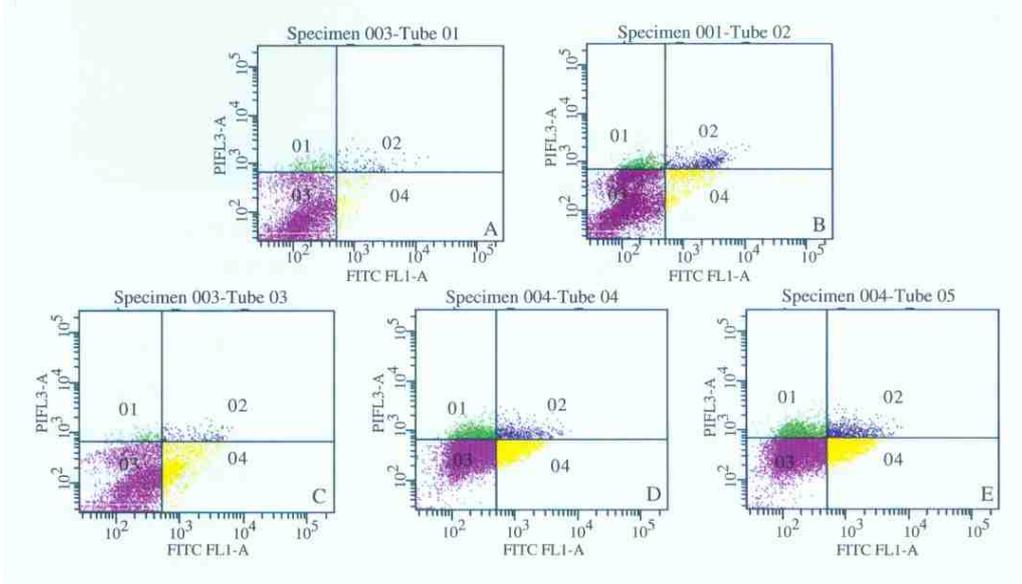


图 3 流式细胞仪 PPAnnexin V 双染色法检测细胞凋亡散点图

Fig. 3 Contour diagram of PPAnnexin V flow cytometric detection of apoptosis

A. PBS 处理尼罗罗非鱼肝细胞 8 h; B. 50 LgPL MC2LR 处理尼罗罗非鱼肝细胞 8 h; C. 150 LgPL MC2LR 处理尼罗罗非鱼肝细胞 8 h; D. 150 LgPL MC2LR 处理尼罗罗非鱼肝细胞 24 h; E. 500 LgPL MC2LR 处理尼罗罗非鱼肝细胞 24 h.
A. The control; B. Exposure to 50 LgPL MC2LR for 8 h; C. Exposure to 150 LgPL MC2LR for 8 h; D. Exposure to 150 LgPL MC2LR for 24 h; E. Exposure to 500 LgPL MC2LR for 24 h.

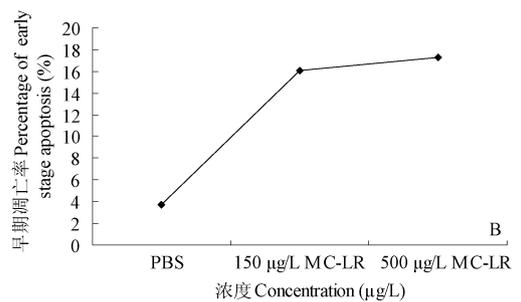
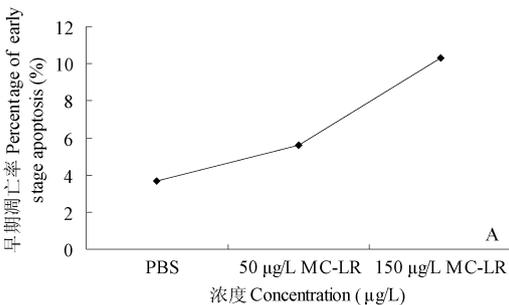


图 4 不同浓度时间下 MC2LR 对尼罗罗非鱼肝细胞凋亡的影响

Fig. 4 The dose and treatment time dependent effect of MC2LR on apoptosis in Nile Tilapia hepatocytes

A. PBS, MC2LR 处理尼罗罗非鱼肝细胞 8 h; B. PBS 处理尼罗罗非鱼肝细胞 8 h; MC2LR 处理尼罗罗非鱼肝细胞 24 h.

A. Exposure to PBS and MC2LR for 8 h; B. Exposure to PBS for 8 h and MC2LR for 24 h.

3 讨论

细胞凋亡是细胞的一种程序性死亡, 受多因素调控, 并参与调节机体许多病理生理过程。

研究MC2LR对尼罗罗非鱼原代肝细胞的致毒机理对肝肿瘤发病机理及其防治均具有重要参考价值^[11~13]。细胞凋亡过程具有特殊的形态学和生物化学特征, 还可激活内源性Ca²⁺、

Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶,使 DNA 降解为 180~200 bp 及其倍数的片段^[14],降解的 DNA 片段在碱性环境中电泳时迁移速度加快,脱离未断裂的核双链 DNA 向阳极迁移,形成明显的/拖尾0现象,且随着细胞核 DNA 受损伤程度的加重,产生的断链或碱变性断片增多,片段越小,/拖尾0现象也越明显^[15,16]。

本研究通过 10、50、150、500 LgPL MC2LR 处理尼罗罗非鱼肝细胞 24 h,经 SCGE 检测显示处理组出现明显的慧星拖尾现象,并随着浓度的增加,拖尾现象越明显,表明 MC2LR 使尼罗罗非鱼肝细胞 DNA 受到损伤,并呈剂量依赖性。张占英等^[17]研究发现 MC2LR 可引起大鼠淋巴细胞 DNA 迁移长度显著大于对照组,这与本实验结果一致。FCM 检测结果表明,经 50、150 LgPL MC2LR 诱导 8 h,50 LgPL MC2LR 处理组早期凋亡率为 51.6%,150 LgPL MC2LR 处理组增高至 101.3%,呈现明显的剂量效应关系;经 150 LgPL MC2LR 诱导 8、24 h,8 h 早期凋亡率为 101.3%,24 h 处理组增高至 161.1%,呈现明显的时间效应关系。这与已报道的 MC2LR 诱导 CHO2KI 细胞^[18]、鲫鱼淋巴细胞^[9]、小鼠 (*Mus musculus*) 肝细胞^[19] 及 Hep G2^[20] 发生凋亡的时间和剂量效应关系一致。因此,罗非鱼肝细胞凋亡率可以作为评价 MC2LR 细胞毒性效应的一种有效生物指标。

MC2LR 诱导细胞凋亡的具体机制目前仍未完全清楚。施玮等^[21] 研究认为 MC2LR 通过促进细胞伸展诱导肝细胞去分化,使细胞进入增殖阶段,同时又能在 G2PM 期阻滞细胞继续增殖,使增殖细胞不能顺利进入下一个周期的 G0 期,而是向凋亡方向发展,导致肝细胞的凋亡。Ding 等^[22-24] 发现,MC 通过破坏线粒体电子传递链的功能,细胞内活性氧 ROS(主要以 H_2O_2 及 O_2^- 为代表)水平即明显升高,引发细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的丧失及通透性改变(mitochondrial permeability transition, MPT),最后导致细胞凋亡。Zegura 等^[20] 在研究 MC 对人肝癌细胞 Hep G2 的影响中观察到,MC 可能通过活性氧 ROS 直接氧化

导致细胞 DNA 损伤。本实验显示,随着 MC2LR 浓度的增加(50~500 LgPL),DNA 损伤程度加重,肝细胞凋亡率也随着增加,表明肝细胞凋亡率的趋势与 DNA 损伤程度一致,说明细胞对 MC2LR 的氧化应激机制是导致自身 DNA 损伤的重要原因之一,DNA 损伤后能继发性地启动凋亡程序引起细胞凋亡,且 DNA 损伤程度越重,细胞凋亡率亦随之增高,两者之间存在正相关关系。此研究结果将进一步为从分子及细胞水平阐明 MC2LR 对细胞的毒性及致毒机制提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Camichael W W. The toxins of cyanobacteria. *Sci Am*, 1994, 270: 64~ 721
- [2] Codd G A. Cynobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Sci Technol*, 1995, 32: 149 ~ 156
- [3] Dawson R M. The toxicology of microcystins. *Toxicol*, 1998, 36 (7): 953~ 9621
- [4] Fisher W J, Alzheimer S, Cattori V, et al. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 203 (3): 257~ 2631
- [5] Guzman R E, Solter P. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure. *Toxicol Pathol*, 1999, 27(5): 582~ 588
- [6] Ding W X, Shen H M, Ong C N. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin2-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*, 2000, 32(3): 547~ 555
- [7] McDermott C M, Nho C W, Howard W, et al. The cyanobacteria toxin, microcystin2LR can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicol*, 1998, 36(12): 1 981~ 1 9961
- [8] 施玮,朱惠刚,晏晓蓉等.微囊藻毒素 MC2LR 对肝细胞毒性机理研究. *中国公共卫生*, 2002, 18(2): 139~ 1401
- [9] 张建英,张杭君,陈英旭.微囊藻毒素导致鲫鱼淋巴细胞凋亡的研究. *环境科学学报*, 2005, 25(8): 1 101~ 1 1041
- [10] Singh N P, Mccoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp Cell Res*, 1988, 175(2): 184~ 1911
- [11] Osborne B A, Schwarts L M. Essential genes that regulate apoptosis. *Trends Cell Biol*, 1994, 4: 3941
- [12] Bortner C D, Oldenburg N B E, Cidlowski J A. The role of

- DNA fragmentation in apoptosis. Trends Cell Biol, 1995, 5: 211
- [13] 王琳, 梁旭方, 廖婉琴等. 斑马鱼胚胎发育中细胞凋亡的研究进展. 遗传, 2006, 28(8): 1 009~ 1 014 .
- [14] Oberhammer F, Wilson J W, Dive C, et al. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. EMBO J, 1993, 12: 3 6791
- [15] Mckebe2Martin V J, GreenMH, Schmezer P, et al. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. Mutat Res, 1993, 288(1): 411
- [16] Vijayalaxmi, Tice R R, Strauss G H. Assessment of radiation2 induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis technique. Mutat Res, 1992, 271(3): 243~ 2521
- [17] 张占英, 俞顺单, 陈传炜. 微囊藻毒素LR对DNA和自然杀伤细胞的损伤效应研究. 中华预防医学杂志, 2001, 35(2): 75~ 781
- [18] Nidhi G S C, Pant R, Vijayaraghavan P V, et al. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. Toxicology, 2003, 188: 285~ 2961
- [19] Rao P V L, Bhattacharya R, Das G S. Isolation, culture and toxicity of cyanobacterium (blue-green alga) Microcystis aeruginosa from freshwater source in India. B Environ Contam Toxicol, 1994, 52: 878~ 8821
- [20] Zegura B, Sedmak B, Filipic M. Microcystin2LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line Hep G21 Toxicol, 2003, 41(1): 41~ 481
- [21] 施玮, 朱惠刚, 晏晓蓉等. 微囊藻毒素MC2LR对原代肝细胞的影响. 环境与职业医学, 2002, 19(3): 129~ 1311
- [22] Ding W X, Shen H M, Ong C N. The critical role of ROS and mitochondrial membrane permeability in microcystin2LR induced rapid apoptosis in primary rat hepatocytes. Hepatology, 2000, 32(3): 547~ 5551
- [23] Ding W X, Shen H M, Zhu H G, et al. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. Environ Res, 1998, 78(1): 12~ 181
- [24] Ding W X, Shen H M, Ong C N. Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin induced cell death in rat hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(2): 321~ 3311

5动物学杂志6投稿注意事项

1 稿件的投寄

稿件可通过本刊的电子信箱(E2mail: journal@ioz.ac.cn)投寄(Word文件作附件),同时邮寄打印稿。打印稿小四号字单面隔行打印。

2 论文的格式要求

题目 应言简意赅。中文题目字数一般不超过20个字;英文题目不超过10个实词,实词首字母大写。

作者 署名人应是对论文的全部或部分内容的做出主要贡献,并能对文章内容负责的人。

单位 应写作者单位的标准全称及所在地和邮编。

摘要 中文摘要放在文首。内容必须包括:研究目的、方法、结果(主要数据)和结论。用第三人称叙述。英文摘要放在中文摘要下面,其内容应与中文摘要相对应或略详于中文摘要。

关键词 一般为3~5个,中英文对应,分别列在中英文摘要下面。

前言 结合文献阐述国内外相关研究领域的发展状况及本研究的目的和意义。

正文 材料与方法的来源及方法的出处应详细陈述;结果的数据要完整,微观形态的稿件应有实验照片作为依据,文字叙述要简洁明了,与图表内容相互呼应;讨论应依据前言的内容、结果的数据、现象展开讨论,以达到解决问题或得出结论的目的。

全文书写规格 文中请使用国家颁布的法定计量单位和符号及规范化的名词、术语。文中首次出现的英文缩写词,应先写出中文名称后,再在括号内写出英文全称和缩写词。物种名称在文中第一次出现时应附拉丁学名(种属名用斜体,属名首字母大写)。名词术语的用法文中应前后一致。

¹ 小标题:应简短准确、层次清楚。各级标题一律采用阿拉伯数字连续编码,左顶格编排,如/10(一级标)、/1110(二级标)√11110(三级标)。(下转第44页)