

α -硫辛酸在微囊藻毒素-LR诱导草鱼卵巢细胞损伤中的作用

王辉, 何丽, 阮记明, 梁惜梅, 李福贵, 隗黎丽

引用本文:

王辉, 何丽, 阮记明, 梁惜梅, 李福贵, 隗黎丽. α -硫辛酸在微囊藻毒素-LR诱导草鱼卵巢细胞损伤中的作用[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(3): 527-534.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0241>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

草鱼幼鱼肝脏抗氧化系统对MC-LR胁迫的响应

隗黎丽, 何丽, 阮记明, 刘毅, 付建平, 钟其旺

农业环境科学学报. 2019, 38(1): 44-50 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0159>

MC-LR急性胁迫对草鱼脾脏、头肾显微结构及BAFF和APRIL基因表达的影响

隗黎丽, 刘毅, 王自蕊, 阮记明, 周颖, 熊六凤, 钟其旺

农业环境科学学报. 2017, 36(12): 2379-2387 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0764>

农田水样中微囊藻毒素-LR拉曼检测方法的研究

黄珊, 孟辉, 曾昆, 黄哲

农业环境科学学报. 2020, 39(8): 1862-1868 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0341>

敌草快对斑马鱼组织损伤及慢性肝脏损害作用

沈文静, 张潇, 赵子昂, 方再光, 谢曦, 王蓉, 胡文婷

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 949-956 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0043>

钇(Y³⁺)对缺氮、缺磷胁迫下铜绿微囊藻生长和生理特性及藻毒素释放的影响

杜金戈, 王应军, 武阳, 成晶星

农业环境科学学报. 2017, 36(8): 1500-1507 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0495>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王辉, 何丽, 阮记明, 等. α -硫辛酸在微囊藻毒素-LR 诱导草鱼卵巢细胞损伤中的作用[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(3): 527–534.

WANG H, HE L, RUAN J M, et al. Protective role of α -lipoic acid against microcystin-LR-induced grass carp ovary cell damage[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2024, 43(3): 527–534.



开放科学 OSID

α -硫辛酸在微囊藻毒素-LR 诱导草鱼卵巢细胞损伤中的作用

王辉, 何丽, 阮记明, 梁惜梅, 李福贵, 隗黎丽*

(江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045)

摘要:为研究 α -硫辛酸(Alpha lipoic acid, α -LA)在微囊藻毒素-LR(Microcystin-LR, MC-LR)诱导水生动物毒性效应中的保护作用,本研究以草鱼卵巢(Grass carp ovary, GCO)细胞为研究对象,检测分析了不同浓度 α -LA以及 α -LA与MC-LR共同暴露对GCO细胞活力的影响,随后根据测定的结果设置对照组(不添加MC-LR和 α -LA)、125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -LA组、24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR组及125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -LA+24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR组,检测分析了 α -LA在缓解MC-LR对GCO细胞活性、氧化应激以及炎症方面的影响。结果表明:与对照组相比,24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR可诱导乳酸脱氢酶(LDH)活性和丙二醛(MDA)含量显著上升,同时显著抑制谷胱甘肽(GSH)活性($P<0.05$),当MC-LR处理组中加入125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -LA后,与MC-LR单独暴露组相比,LDH活性和MDA含量均显著下降($P<0.05$),但GSH活性却显著上升($P<0.05$)。对氧化相关基因分析发现,与对照组相比,24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR可显著降低SOD1、CAT和GST基因的表达式($P<0.05$),当125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -LA与24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR共同作用于GCO细胞后,与MC-LR单独暴露组相比,联合暴露组的GST基因的表达式显著上升($P<0.05$),但SOD1和CAT两个基因的表达变化不显著($P>0.05$)。此外,对炎症因子进行分析发现,MC-LR单独暴露组TNF α 和IL11基因的相对表达水平显著高于对照组($P<0.05$),但联合暴露组中的TNF α 和IL11基因的相对表达水平却显著低于MC-LR单独暴露组($P<0.05$)。研究结果表明, α -LA可缓解MC-LR诱导的氧化应激,提高细胞活力,抑制GCO细胞炎症的发生,从而减弱MC-LR对GCO细胞的损伤。

关键词:草鱼卵巢细胞; α -硫辛酸;微囊藻毒素-LR;氧化应激;炎症反应

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2024)03-0527-08 doi:10.11654/jaes.2023-0241

Protective role of α -lipoic acid against microcystin-LR-induced grass carp ovary cell damage

WANG Hui, HE Li, RUAN Jiming, LIANG Ximei, LI Fugui, WEI Lili*

(College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: To evaluate the protective effects of alpha lipoic acid (α -LA) on microcystin-LR (MC-LR)-induced toxicity in aquatic animals, grass carp ovary (GCO) cells were used in this study. The viability of GCO cells across different concentrations of α -LA treatment and the joint exposure of α -LA with MC-LR were analyzed. Then, the control (without adding MC-LR and α -LA), 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -LA, 24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR, and 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -LA+24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR groups were set according to these cell viability results; finally, the effects of α -LA on the cell viability, oxidative stress, and inflammation of MC-LR-induced GCO cells were analyzed. The results showed that 24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR treatment significantly increased lactic dehydrogenase (LDH) activity and malondialdehyde (MDA) content, and significantly inhibited the glutathione (GSH) activity of the GCO cells compared to that of the control group ($P<0.05$). When 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -LA was added to the MC-LR treated group, LDH activity and MDA content were significantly reduced compared to those of the MC-LR

收稿日期:2023-03-30 录用日期:2023-06-01

作者简介:王辉(1998—),男,江西赣州人,硕士,从事鱼类免疫毒理学研究。E-mail: wh.huiwang@qq.com

*通信作者:隗黎丽 E-mail: hbliliwei@163.com

基金项目:国家自然科学基金项目(31760764, 31460146)

Project supported: National Natural Science Foundation of China (31760764, 31460146)

exposed group ($P<0.05$); however, GSH activity was significantly increased ($P<0.05$). Compared with the control group, the $24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MC-LR group exhibited a significant lower *SOD1*, *CAT*, and *GST* gene expression ($P<0.05$). In the $125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -LA+ $24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MC-LR group, *GST* gene expression was significantly increased ($P<0.05$); however, the expressions of *SOD1* and *CAT* genes were not significantly changed compared with those of the MC-LR exposure group ($P>0.05$). In addition, analysis of inflammatory factors demonstrated that the relative expression levels of *TNF α* and *IL11* genes in the MC-LR exposure group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$); nonetheless, the relative expression levels of *TNF α* and *IL11* genes in the combined exposure group were significantly lower than those in the MC-LR exposure group ($P<0.05$). These results indicate that α -LA can alleviate MC-LR-induced oxidated stress, improve cell viability, and inhibit inflammation of GCO cells, and thus reduce MC-LR-mediated damage to GCO cells.

Keywords: grass carp ovary cell; α -lipoic acid; microcystin-LR; oxidative stress; inflammation

微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是淡水水体有毒蓝藻产生的一类藻毒素,目前已有超过279种微囊藻毒素异构体,其中微囊藻毒素-LR(Microcystin-LR, MC-LR)是毒性最大、研究最广泛的一种异构体^[1]。研究表明MC-LR具有显著的肝毒性^[2],它通过抑制丝氨酸-苏氨酸磷酸酶1和2A而引起蛋白质磷酸化增加,导致细胞骨架结构的改变^[3]。此外,研究表明,氧化应激在MCs诱导毒性作用中也起着重要作用,它们可以诱导细胞内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的形成,氧化和破坏细胞大分子,导致组织和器官的损伤^[4]。目前,MCs的氧化毒性机制已引起广泛的关注,一些学者尝试使用天然或化学抗氧化剂来减少MCs诱导的组织或器官的损伤,例如,Gehringer等^[5]研究发现维生素E对MC-LR诱导的小鼠肝脏有保护作用,其他学者还发现姜黄素、褪黑素、N-乙酰半胱氨酸、水飞蓟素、岩藻多糖和大蒜等可显著降低MC-LR诱导的肝脏氧化损伤^[6-10]。

MC-LR除了诱导肝毒性之外,还可在生殖系统中蓄积并产生生殖毒性^[11]。研究发现,MC-LR可破坏哺乳动物睾丸、卵巢、前列腺和胎盘等器官的结构和功能,从而降低哺乳动物的生殖能力;同时,MC-LR的毒性还可以通过胎盘传给后代,造成后代死亡、畸形、生长迟缓以及器官功能障碍等^[12]。在鱼类中,MC-LR能影响斑马鱼的内分泌和卵子发生,并干扰卵母细胞减数分裂,从而对斑马鱼的生殖造成不利影响^[13],同时其还能在鱼类的卵巢和精巢中积累并传递给后代^[14]。卵巢由于富含不饱和脂质而很容易受到氧化损伤^[15]。Hou等^[16]研究发现卵巢的抗氧化防御系统可能是斑马鱼对抗MC-LR毒性作用的重要机制。因此,有学者对抗氧化剂降低MC-LR诱导的生殖毒性做了一些探索性的工作。例如,N-乙酰半胱氨酸可以降低MC-LR诱导的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)和C57BL/6小鼠卵巢的氧化损伤^[15,17],但这方面的研究

还比较少。

α -硫辛酸(Alpha lipoic acid, α -LA)是一种含有1个二硫键的天然有机硫化物(图1)^[18-19],属于B族维生素,兼具水溶性和脂溶性的性质,极易被多种组织器官吸收利用^[20]。此外, α -LA对内源性的抗氧化剂如维生素C、维生素E以及谷胱甘肽(Glutathione, GSH)等具有再生作用,从而可提高机体的抗氧化能力^[21]。同时, α -LA还可通过提高抗氧化酶的活性从而发挥抗氧化功能,如饲料中添加 α -LA可显著提高皱纹盘鲍体内的超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性以及GSH含量^[22]。 α -LA作为一种强大的抗氧化剂,可有效提高机体的抗氧化能力,从而降低MC-LR的毒性。也有一些研究表明, α -LA能有效降低MC-LR对鱼类肝脏、大脑和肌肉的毒性^[23-25],并通过激活核因子相关因子2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)再生GSH来保护MC-LR诱导的肝毒性^[26]。但目前还没有报道 α -LA在MC-LR诱导的生殖毒性方面的保护作用。草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)作为我国四大家鱼之一,是我国重要的淡水养殖鱼类,但目前关于MC-LR对草鱼生殖的影响还未见报道,更没有相关研究报道 α -LA在MC-LR诱导的草鱼卵巢(Grass carp ovary, GCO)细胞毒性中的作用。结合相关文献报道,我们推测 α -LA可通过抑制MC-LR诱导GCO细胞氧化应激从而保护细胞。因此,本研究以GCO细胞为研究对象,探讨 α -LA在MC-LR致GCO细胞毒性中的保

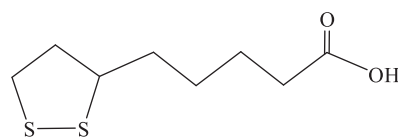


图1 α -硫辛酸的化学结构式

Figure 1 Chemical structure of α -lipoic acid

护作用,并为MC-LR生殖毒性的防治提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验细胞

试验所用GCO细胞是中国科学院水生生物研究所所在20世纪70年代开展草鱼出血病研究时建立的一株细胞系,由江西师范大学付建平老师保存惠赠。

1.2 主要仪器与试剂

细胞培养所用的CO₂培养箱为Hengzi公司产品。冷冻离心机和NANODROP2000超微量分光光度计为Thermo公司产品。MULTISKANFC全波段扫描酶标仪和CFX96/384 Touch™实时荧光定量PCR仪为Bio-Rad公司产品。MC-LR(纯度>98%)与α-LA分别购自Expreess Technology与Sigma公司。胎牛血清、M199培养基、0.25%胰蛋白酶购自Biological Industries公司。青链霉素混合液、二甲基亚砜(DMSO)、1×PBS、噻唑兰(Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)检测试剂盒为Solarbio公司的产品。提取RNA的TRIzol Reagent试剂盒购自Invitrogen公司。合成cDNA的PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser试剂盒与用于qRT-PCR的SYBR® Premix Ex Tap™ II试剂盒均购自Takara公司。乳酸脱氢酶(Lactic dehydrogenase, LDH)、GSH、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司,二喹啉甲酸法(Bicinchoninic Acid Assay, BCA)蛋白浓度测定试剂盒购自Beyotime公司。

1.3 GCO细胞复苏及培养

从-80℃冰箱中取出冻存的GCO细胞,置于26℃水浴锅中水浴溶解,将溶解的GCO细胞悬液用基础培养基重复清洗两次,随后加入完全培养基重悬细胞,并将细胞转移到培养皿或培养瓶中,在条件为26℃、5% CO₂的培养箱中进行培养,并取对数生长期的细胞用于后续试验。

1.4 MTT法测定细胞活力

取对数生长期的GCO细胞,以 1.2×10^5 ind·mL⁻¹的浓度接种到96孔细胞培养板中,设置不同MC-LR浓度(0、5、10、20、40、60 μmol·L⁻¹)和α-LA浓度(0、62.5、125、250、500、1 000、2 000 μmol·L⁻¹)的完全培养基处理GCO细胞。每个浓度设5个平行,处理24 h后,采用MTT法^[20]分别分析MC-LR和α-LA对GCO细胞活力的影响。MTT法简单操作步骤如下:在避光条件下每孔加入20 μL MTT溶液,于培养箱内孵育4

h,小心吸出上清液,避免吸到蓝紫色结晶,随后每孔加入150 μL DMSO溶液,摇匀后,孵育10 min,充分溶解结晶,最后采用酶标仪测定各孔在570 nm处的吸光度值(OD),计算细胞活力。根据吸光度值采用SPSS 22.0软件计算得到MC-LR 24 h的半数增殖抑制浓度(Half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)约为48 μmol·L⁻¹,随后选择12 μmol·L⁻¹(IC₅₀/4)和24 μmol·L⁻¹(IC₅₀/2)MC-LR作用于GCO细胞并进行形态观察,发现24 μmol·L⁻¹ MC-LR组细胞内出现自噬体、细胞质内出现较多的空泡、线粒体发生肿胀、内质网扩张等,因此,选择1/2 IC₅₀即24 μmol·L⁻¹ MC-LR为后续试验的染毒浓度,相关信息参考本实验室前期发表的文章^[27]。

1.5 试验分组及处理

取对数生长期的GCO细胞,以 1.2×10^5 ind·mL⁻¹的浓度接种到100 mm培养皿中,待细胞贴壁生长至80%左右后,根据1.4活力测定的MC-LR和α-LA对GCO细胞活力影响的结果,设置空白对照组(不添加MC-LR和α-LA)、α-LA组(125 μmol·L⁻¹ α-LA)、MC-LR组(24 μmol·L⁻¹ MC-LR)以及α-LA+MC-LR组(125 μmol·L⁻¹ α-LA+24 μmol·L⁻¹ MC-LR),每个处理设置3个重复。细胞培养24 h后取样分析。

1.6 LDH活性和抗氧化指标的测定

由1.5分组处理结束后,采用PBS溶液洗两遍,离心收集细胞,加入200 μL PBS重悬细胞,利用超声仪超声破碎细胞使细胞内成分释放,离心10 min(12 000 r·min⁻¹),收集上清。LDH活性以及组织中MDA和GSH含量均按照试剂盒说明书严格操作测定,测定GSH及MDA含量时,采用BCA法测定蛋白含量。

1.7 引物设计

根据NCBI基因库已有的草鱼基因全长序列,使用Primer Premier 5软件设计实时荧光定量(qRT-PCR)的引物,其中内参基因GAPDH的选用参考本实验室前期已发表的文章^[26]。引物由上海生物工程有限公司合成,试验所用引物如表1所示。

1.8 RNA提取及qRT-PCR

根据1.5中的分组方案将GCO细胞处理24 h后,PBS溶液清洗细胞两次,收集细胞于无RNA酶的离心管。使用Trizol法提取细胞总RNA,再利用微量分光光度计测定RNA的纯度和浓度。然后严格按照PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒使用说明合成cDNA。将合成的cDNA稀释5倍,再根据SYBR® Premix Ex Tap™ II试剂盒使用说明配制10

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence(5'~3')		引物大小 Product size/bp
	正向引物 Forward primer(5'~3')	反向引物 Reverse primer(5'~3')	
CAT	GAAGTTCTACACCGATGAGG	CCAGAAATCCCAAACCAT	156
GST	TCTCAAGGAACCCGTCTG	CCAAGTATCCGTCCCACA	208
SOD1	CGCACTTCAACCCTTACA	ACTTTCCTCATTGCCTCC	218
TNFα	CAACAGTGACAGACCGACCA	CTACCTGACTGGCATGCTCC	170
IL11	GTCAGATGACCAGAGCAGAGG	CCTGAGAGGACTGAACCACC	99
GAPDH	AACTGACTCTGTGTATCC	GTCCGTTGTTGACCTCACCT	124

μL qRT-PCR反应体系,每个样品设置3个重复孔,采用Bio-Rad CFX 荧光定量PCR仪进行反应,以GAPDH为内参基因,采用2^{-ΔΔCt}法计算各基因在GCO细胞中的相对表达量。

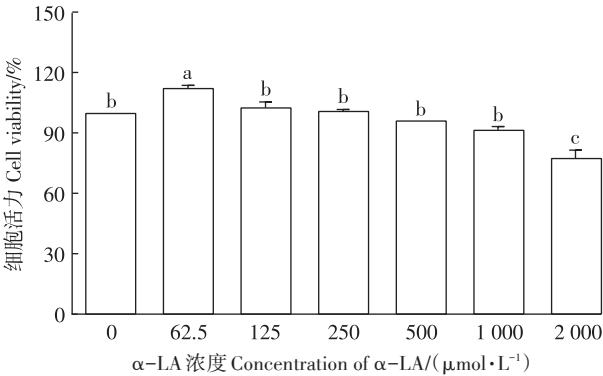
1.9 统计学处理

本试验的所有结果均以平均数±标准差(Mean ± SD)表示。使用SPSS 22.0软件对数据进行单因素方差分析(One-ANOVA),运用Tukey检验进行组间多重比较,其中P<0.05表示组间差异显著,具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 α-LA对GCO细胞活力的影响

α-LA作用24 h对GCO细胞活力的影响结果如图2所示,与不添加α-LA组相比,随着α-LA浓度的升高,细胞活力呈现先上升后下降的趋势。62.5 μmol·L⁻¹ α-LA可显著提高细胞活力(P<0.05),而当α-LA浓度为125~1 000 μmol·L⁻¹时,细胞活力无显著变化(P>0.05),当α-LA的浓度上升至2 000 μmol·



不同字母表示处理间差异显著(P<0.05)。下同。
Different letters indicate significant difference among treatments (P<0.05). The same below.

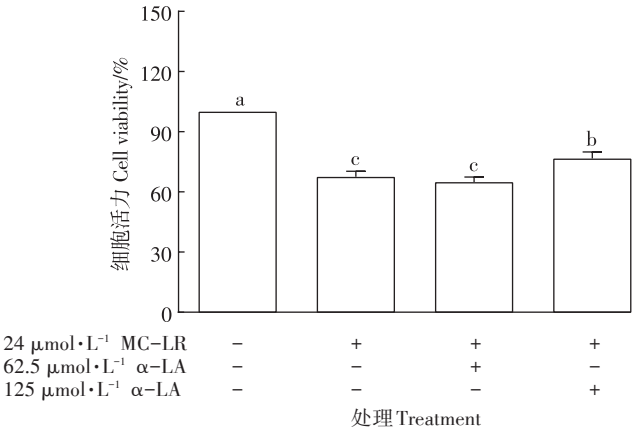
图2 α-LA对GCO细胞活力的影响

Figure 2 Effects of α-LA on the viability of GCO cells

L⁻¹时,细胞活力显著下降(P<0.05)。

2.2 α-LA对MC-LR诱导GCO细胞活力的影响

如图3所示,与对照组相比,MC-LR单独处理和MC-LR联合不同浓度α-LA处理均能够显著降低细胞活力(P<0.05),而与MC-LR组相比,125 μmol·L⁻¹ α-LA +MC-LR组细胞活力显著上升(P<0.05),说明该浓度的α-LA对MC-LR致GCO细胞毒性具有较好的保护效果。因此,后续选用125 μmol·L⁻¹的α-LA进行试验。



“+”表示该组处理经MC-LR或α-LA处理,
“-”表示该组未经MC-LR或α-LA处理。
“+” indicates that the group is treated as MC-LR or α-LA,“-” indicates that the group has not received MC-LR or α-LA processing.

图3 α-LA对MC-LR诱导GCO细胞活力的影响

Figure 3 Effects of α-LA on the cell viability of GCO induced by MC-LR

2.3 α-LA对MC-LR诱导GCO细胞培养基上清LDH活性的影响

GCO细胞培养基上清中LDH的活性结果如图4所示,与对照组相比,α-LA组LDH活性无显著变化(P>0.05),MC-LR组LDH活性显著上升(P<0.05)。而与MC-LR组相比,α-LA+MC-LR组LDH活性显著下降(P<0.05)。

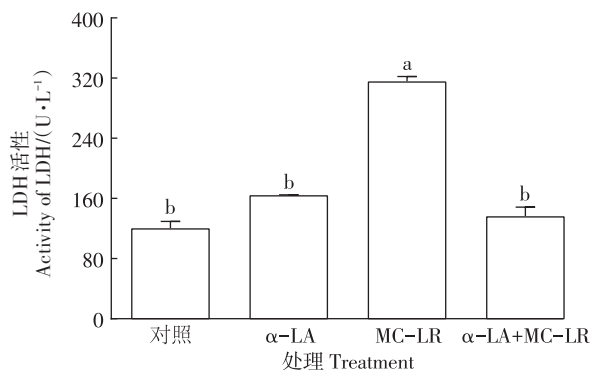


图4 α -LA对MC-LR诱导GCO细胞培养基上清LDH活性的影响

Figure 4 Effects of α -LA on the activity of LDH in the supernatant of GCO cell medium induced by MC-LR

2.4 α -LA对MC-LR诱导GCO细胞抗氧化指标的影响

如图5A所示,与对照组相比,GCO细胞内GSH相对含量在MC-LR组显著下降($P<0.05$),而在 α -LA+MC-LR组中其含量显著上升($P<0.05$)。与MC-LR组相比, α -LA+MC-LR组GCO细胞内GSH相对含量显著上升($P<0.05$)。由图5B可知,MC-LR组GCO细胞内MDA相对含量与各组相比均显著上升($P<0.05$),且在对照组、 α -LA组、 α -LA+MC-LR组间无显著变化。

如图5C、图5D、图5E所示,GCO细胞内SOD1、CAT、GST基因相对表达量在对照组与 α -LA组间均无显著变化($P>0.05$);相对于对照组与 α -LA组,MC-LR组、 α -LA+MC-LR组的SOD1、CAT、GST基因相对表达量均显著下降($P<0.05$);相对于MC-LR组, α -LA+MC-LR组的SOD1、CAT基因相对表达量无显著变化($P>0.05$),GST基因相对表达量显著上升($P<0.05$)。

2.5 α -LA对MC-LR诱导GCO细胞炎症相关基因表达的影响

α -LA对MC-LR诱导GCO细胞炎症相关基因表达的影响结果如图6所示。与对照组相比, α -LA组中TNF α 基因的相对表达量无显著变化($P>0.05$),与MC-LR组相比, α -LA+MC-LR组中TNF α 基因的相对表达量显著下降($P<0.05$,图6A)。与对照组相比, α -LA组中IL11基因的相对表达量无显著变化($P>0.05$),与MC-LR组相比, α -LA+MC-LR组中IL11基因的相对表达量显著下降($P<0.05$,图6B)。

3 讨论

卵巢是雌性动物的重要生殖器官,可以产生卵子

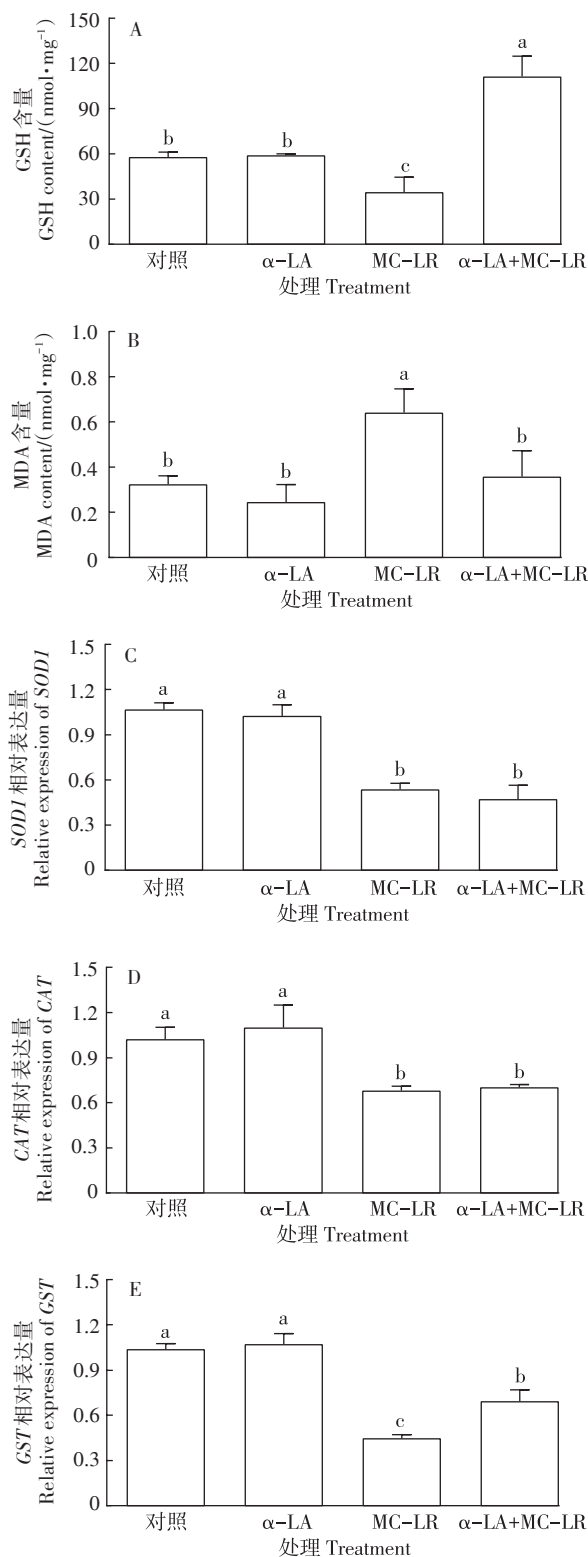


图5 α -LA对MC-LR诱导GCO细胞抗氧化指标的影响
Figure 5 Effects of α -LA on the antioxidant indexes in GCO cells induced by MC-LR

和类固醇性激素^[12]。急性暴露于MC-LR已被证明会导致斑马鱼卵巢的病理损伤,并引发氧化应激^[28]。本

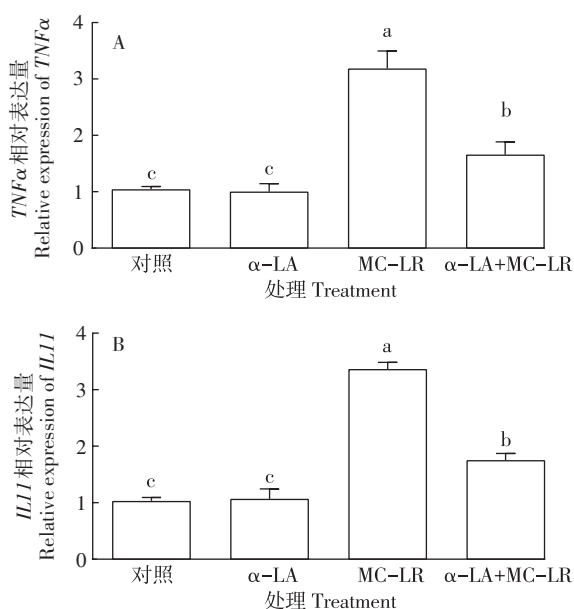


图6 α -LA对MC-LR诱导GCO细胞炎症相关基因表达的影响

Figure 6 Effects of α -LA on the expression level inflammation-related genes in GCO cells induced by MC-LR

实验室前期研究也发现MC-LR可诱导GCO细胞产生氧化应激^[27]。本研究旨在确定 α -LA是否对MC-LR诱导的GCO细胞氧化损伤具有缓解作用。

α -LA作为一种天然的抗氧化剂,含有1个二硫键,其一旦进入细胞,二硫键就被还原为二氢硫辛酸(DHLA),并与蛋白质氨基酸残基的氨基结合形成酰胺键,酰胺键可经脂酰胺酶作用裂解释放具有生理功能的 α -LA^[29]。研究表明 α -LA在保护机体免受氧化损伤方面具有巨大的潜力,因此其在临床研究以及生产实践中得到广泛应用^[30]。有研究表明, α -LA可以显著提高缺氧状态下大鼠皮层神经元细胞的活力^[31],并且 α -LA可显著提高镉胁迫下大鼠肝细胞活力^[32]。本研究发现 α -LA可显著提高MC-LR作用后的细胞活力($P<0.05$)。此外,LDH是无氧酵解和糖异生的重要酶系之一,在体内能量代谢过程中发挥重要作用,几乎存在于所有组织中,细胞损伤均可导致LDH浓度增加^[33]。进行离体细胞培养时,如果培养的细胞受损,LDH也会由细胞漏出至培养液中^[34]。本试验结果表明, α -LA+MC-LR组LDH活性较MC-LR组显著下降($P<0.05$),这与其他人的研究结果类似,如Zhang等^[35]研究发现, α -LA能降低缺氧诱导的脐静脉内皮细胞中LDH的释放。因此,本研究结果表明 α -LA能够缓解MC-LR导致的GCO细胞损伤。

MDA被认为是评价机体氧化应激最重要的标志

物之一,是来源于机体内不饱和脂肪酸被氧自由基攻击而形成的过氧化产物^[36-37],而GSH是机体内重要的抗氧化物,可被GST催化并与机体内有害的亲电基团结合,从而清除体内的脂质过氧化物^[38]。有研究显示,MCs能消耗GSH造成的细胞氧化应激和脂质过氧化(Lipid peroxidation, LPO),产生过氧化产物如MDA等,从而损伤细胞器,继而引起内质网应激^[39]。也有研究发现小鼠经腹腔注射MC-LR后,其肝脏GSH水平发生时间依赖性变化,且谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)和谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase, GR)等的活性发生改变^[40]。Amado等^[23]的研究表明, α -LA可提高鲤鱼脑和肝脏中GST的活性从而抵抗MC-LR诱导的机体损伤。Gu等^[26]的研究表明, α -LA可提高HepG2和Bel7402细胞内GSH的生成以及SOD的活性,同时降低ROS的生成和MDA的含量,从而减弱MC-LR对细胞的损伤。还有研究发现在饲料中添加 α -LA可提高鲫鱼肝脏GPx和CAT活性,并提高机体的总抗氧化能力,降低MDA含量,从而减轻MC-LR对鱼体的氧化损伤^[25]。在本研究中,相对于对照组,MC-LR可以显著升高GCO细胞内MDA含量,并显著降低GSH含量,这说明MC-LR可以诱导GCO细胞发生氧化应激。与MC-LR组相比, α -LA+MC-LR组GCO细胞内GSH含量显著上升,且MDA含量显著下降,说明 α -LA可能通过升高机体内GSH含量而增强机体抗氧化能力,以此降低MC-LR造成GCO细胞氧化应激而升高MDA含量。但在本研究中, α -LA+MC-LR组的CAT和SOD1基因表达水平相对于MC-LR组并没有显著差异,仅上调了GST基因的相对表达水平。因此推测本试验中 α -LA主要通过增加GCO细胞内GSH的含量,并促进GST的表达,从而促进GSH清除MC-LR诱导的自由基,最终降低细胞内MDA的生成,以此来缓解MC-LR引起的GCO细胞氧化损伤,这与Pflugmacher等^[41]的研究结果类似。

*IL11*是一种与炎症及免疫疾病相关的多功能细胞因子,也具有抗炎作用。有研究表明,炎症是刺激*IL11*表达的因素之一,当机体受到感染、损伤和炎症反应时,*IL11*基因表达会增加^[42]。*TNFα*也是一种炎性细胞因子,可与受体*TNFR2*结合介导细胞激活NF- κ B信号通路,进而抑制细胞凋亡或促进细胞炎症的发生,所以当机体发生炎症时,通常会促进*TNFα*的表达^[43]。有研究表明MC-LR能通过诱导血管内皮细胞氧化应激,致使*TNFα*的表达升高,从而诱导炎

症反应^[44]。在本研究中 MC-LR 同样可导致 *IL11* 和 *TNF α* 基因表达水平的升高,表明 MC-LR 诱导了 GCO 细胞反应的发生。有趣的是,有研究发现 α -LA 同样具有缓解机体内炎症损伤的作用。如 Costa 等^[45]研究发现, α -LA 可降低 *IL6* 和 *TNF α* 水平,抑制药物诱导小鼠炎症的发生,从而提高小鼠的存活率。此外, α -LA 还可作为抗炎剂抑制小鼠 *IL-1 β* 和 *TNF α* 蛋白的表达^[46]。本试验结果与上述研究结果相似,表明 α -LA 能通过下调 GCO 细胞中 *TNF α* 和 *IL11* 基因的表达来抑制炎症的发生,从而减弱 MC-LR 对 GCO 细胞的损伤。

到目前为止,人们尽管尝试了维生素 E、姜黄素、褪黑素、N-乙酰半胱氨酸、水飞蓟素、岩藻多糖和大蒜等天然或化学抗氧化剂来降低 MC-LR 诱导的肝脏、肾脏、心脏等组织或器官毒性^[5-10],但仍然处于实验室研究阶段。与其他抗氧化剂相比, α -LA 最独特的特点是它可以同时与脂质和水溶性化合物反应^[47]。研究表明 α -LA 在体内外实验中均展示了其可缓解 MC-LR 诱导的肝毒性^[23-25],也有文献表明 α -LA 可作为抗 MC-LR 诱导的肝脏氧化损伤的潜在药物^[26]。本研究所有结果也表明 α -LA 可缓解 MC-LR 诱导的生殖细胞毒性,然而,本研究缺乏体内生殖毒性实验的数据,对 α -LA 诱导的生殖毒性的具体调控机制也未开展研究,在今后的研究中,将重点对该方面进行深入探讨。

4 结论

α -硫辛酸作为抗氧化剂具有很大的潜力,可以提高草鱼卵巢细胞经微囊藻毒素-LR 诱导后的抗氧化能力,并通过缓解氧化应激反应的发生,抑制炎症反应,从而减弱微囊藻毒素-LR 对草鱼卵巢细胞的损伤。因此, α -硫辛酸对预防微囊藻毒素-LR 诱导的生殖毒性有一定的作用。

参考文献:

[1] BOUAICHA N, MILES C O, BEACH D G, et al. Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins[J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(12):714.
[2] WEI L L, SUN B J, SONG L R, et al. Gene expression profiles in liver of zebrafish treated with microcystin-LR[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2008, 26(1):6-12.
[3] DING W, SHEN H, ONG C. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes[J]. *Environmental Research*, 1998, 78:12-18.
[4] MA J, LI Y, DUAN H, et al. Chronic exposure of nanomolar MC-LR

caused oxidative stress and inflammatory responses in HepG2 cells[J]. *Chemosphere*, 2018, 192:305-317.
[5] GEHRINGER M M, GOVENDER S, SHAH M, et al. An investigation of the role of vitamin E in the protection of mice against microcystin toxicity[J]. *Environmental Toxicology*, 2003, 18(2):142-148.
[6] AL-JASSABI S, AHMED K A, ABDULLA A M. Antioxidant effect of curcumin against microcystin-LR-induced renal oxidative damage in Balb/c mice[J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2012, 11(4):531-536.
[7] ABDEL-DAIM M M, SAYED A A, ABDEEN A, et al. Piperine enhances the antioxidant and anti-inflammatory activities of thymoquinone against microcystin-LR-induced hepatotoxicity and neurotoxicity in mice[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019:1309175.
[8] AL-HAZMI A. Antioxidant activity of silymarin in microcystin-LR cardiac and pulmonary induced injuries on mice[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2020, 23(11):1369-1373.
[9] ALKAHTANE A A, ABUSHOUK A I, MOHAMMED E T, et al. Fuco-dan alleviates microcystin-LR-induced hepatic, renal, and cardiac oxidative stress and inflammatory injuries in mice[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27:2935-2944.
[10] AIT ABDERRAHIM L, TAIBI K, BOUSSAID M, et al. Allium sativum mitigates oxidative damages induced by microcystin-LR in heart and liver tissues of mice[J]. *Toxicon*, 2021, 200:30-37.
[11] CHEN L, CHEN J, ZHANG X, et al. A review of reproductive toxicity of microcystins[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 301:381-399.
[12] ZHANG S, DU X, LIU H, et al. The latest advances in the reproductive toxicity of microcystin-LR[J]. *Environmental Research*, 2021, 192:110254.
[13] LIU W, ZHAN C, ZHANG T, et al. Microcystin-LR influences the in vitro oocyte maturation of zebrafish by activating the MAPK pathway[J]. *Aquatic Toxicology*, 2019, 215:105261.
[14] ZHANG D, XIE P, LIU Y, et al. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(7):2191-2199.
[15] LIU H, ZHANG X, ZHANG S, et al. Oxidative stress mediates microcystin-LR-induced endoplasmic reticulum stress and autophagy in KK-1 cells and C57BL/6 mice ovaries[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9:1058.
[16] HOU J, LI L, XUE T, et al. Damage and recovery of the ovary in female zebrafish i. p. - injected with MC-LR[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 155:110-118.
[17] XUE L, LI J, LI Y, et al. N-acetylcysteine protects Chinese Hamster ovary cells from oxidative injury and apoptosis induced by microcystin-LR[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8:4911-4921.
[18] ZEHPFENNIG B, WIRIYASERMKUL P, CARLSON D A, et al. Interaction of α -lipoic acid with the human Na⁺/multivitamin transporter (hSMVT) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(26):16372-16382.
[19] SALEHI B, BERKAY YILMAZ Y, et al. Insights on the use of α -lipo-

- ic acid for therapeutic purposes[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(8):356.
- [20] MARQUET A, BUI B T, FLORENTIN D. Biosynthesis of biotin and lipoic acid[J]. *Vitamins and Hormones*, 2001, 61:51-101.
- [21] ZHANG J, ZHOU X, WU W, et al. Regeneration of glutathione by alpha-lipoic acid via Nrf2/ARE signaling pathway alleviates cadmium-induced HepG2 cell toxicity[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2017, 51:30-37.
- [22] ZHANG W B, CHEN Q Y, MAI K S, et al. Effects of dietary α -lipoic acid on the growth and antioxidative responses of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(11): e781-e787.
- [23] AMADO L L, GARCIA M L, PEREIRARAT C B, et al. Chemoprotection of lipoic acid against microcystin-induced toxicosis in common carp (*Cyprinus carpio*, *Cyprinidae*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2011, 154(3):146-153.
- [24] 张丽, 许国焕, 熊达, 等. 罗非鱼饲料添加 α -硫辛酸对藻毒素的解毒作用[J]. *淡水渔业*, 2014, 44(3):75-79. ZHANG L, XU G H, XIONG D, et al. Effects of dietary supplemental α -lipoic acid on the toxicity of microcystins in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* $\times$ *O. aureus*) [J]. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(3):75-79.
- [25] 徐文杰, 韩士群, 周庆, 等. 饲料中添加抗氧化剂对鲫鱼抵抗藻毒素作用的影响[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(2):417-422. XU W J, HAN S Q, ZHOU Q, et al. Effect of dietary antioxidant on microcystin-induced toxicosis in crucian[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Science*, 2020, 36(2):417-422.
- [26] GU L, LI S, BAI J, et al. α -lipoic acid protects against microcystin-LR induced hepatotoxicity through regeneration of glutathione via activation of Nrf2[J]. *Environmental Toxicology*, 2020, 35(7):738-746.
- [27] WEI L L, FU J P, HE L, et al. Microcystin-LR-induced autophagy regulates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in grass carp ovary cells *in vitro* [J]. *Toxicology in Vitro*, 2023, 87:105520.
- [28] ZHAN C, LIU W, ZHANG F, et al. Microcystin-LR triggers different endoplasmic reticulum stress pathways in the liver, ovary, and offspring of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 386:121939.
- [29] YOSHIKAWA K, HAYAKAMA K, KATSUMATA N, et al. High-performance liquid chromatographic determination of lipamidase (lipoyl-xhydrolase) activity with a novel substrate, lipoyl-6-aminoquinoline[J]. *Journal of Chromatography B-biomedical Applications*, 1996, 679(1/2):41-47.
- [30] PLEMEL J R, JUZWIK C A, BENSON C A, et al. Over-the-counter anti-oxidant therapies for use in multiple sclerosis: a systematic review[J]. *Multiple Sclerosis*, 2015, 21(12):1485-1495.
- [31] LV C, MAHARJAN S, WANG Q, et al. α -lipoic acid promotes neurological recovery after ischemic stroke by activating the Nrf2/HO-1 pathway to attenuate oxidative damage[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(3):1273-1287.
- [32] ZOU H, LIU X, HAN T, et al. Alpha-lipoic acid protects against cadmium-induced hepatotoxicity via calcium signalling and gap junctional intercellular communication in rat hepatocytes[J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2015, 40(4):469-477.
- [33] JURISIC V, RADENKOVIC S, KONJEVIC G. The actual role of LDH as tumor marker, biochemical and clinical aspects[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015, 867:115-124.
- [34] LOBNERD. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, 96:147-152.
- [35] ZHANG J, DENG H, LIU L, et al. Alpha-lipoic acid protects against hypoxia/reoxygenation-induced injury in human umbilical vein endothelial cells through suppression of apoptosis and autophagy[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(1):180-186.
- [36] NAJAFI K, AHMADI S, RAHPEYMA M, et al. Study of serum malondialdehyde level in opioid and methamphetamine dependent patients [J]. *Acta Medical Iranica*, 2017, 55(10):616-620.
- [37] ZHANG K, ZHANG Q, JIANG H, et al. Impact of aerobic exercise on cognitive impairment and oxidative stress markers in methamphetamine-dependent patients[J]. *Psychiatry Research*, 2018, 266:328-333.
- [38] GOGOI K, MANNA P, DEY T, et al. Circulatory heavy metals (cadmium, lead, mercury, and chromium) inversely correlate with plasma GST activity and GSH level in COPD patients and impair NOX4/Nrf2/GCLC/GST signaling pathway in cultured monocytes[J]. *Toxicology in Vitro*, 2019, 54:269-279.
- [39] ZHANG H, ZHANG J, CHEN Y, et al. Microcystin-RR induces apoptosis in fish lymphocytes by generating reactive oxygen species and causing mitochondrial damage[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2008, 34(4):307-312.
- [40] CHEN L, LI S, GUO X, et al. The role of GSH in microcystin-induced apoptosis in rat liver: involvement of oxidative stress and NF- κ B [J]. *Environmental Toxicology*, 2016, 31(5):552-560.
- [41] PFLUGMACHER S, WIEGAND C, OBEREMM A, et al. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1425(3):527-533.
- [42] SINGH B, BERRY JA, SHOHER A, et al. COX-2 induces IL-11 production in human breast cancer cells[J]. *Journal of Surgical Research*, 2006, 131(2):267-275.
- [43] CABAL-HIERRO L, LAZO P S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors[J]. *Cellular Signalling*, 2012, 24(6):1297-1305.
- [44] SHI J, ZHOU J, ZHANG M. Microcystins induces vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells via activation of NF- κ B [J]. *Mediators of Inflammation*, 2015, 2015:942159.
- [45] COSTA D, COSTA D, SOUSA C, et al. The alpha-lipoic acid improves survival and prevents irinotecan-induced inflammation and intestinal dysmotility in mice[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020, 13(11):361.
- [46] ZHANG Y H, WANG D W, XU S F, et al. Alpha-lipoic acid improves abnormal behavior by mitigation of oxidative stress, inflammation, ferroptosis, and tauopathy in P301S Tau transgenic mice[J]. *Redox Biology*, 2018, 14:535-548.
- [47] SINGH U, JIALAL I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes [J]. *Nutrition Reviews*, 2008, 66(11):646-657.

(责任编辑:李丹)