



玉米赤霉烯酮对鸡胚成纤维细胞的毒性作用

张凯照^{1,2,3}, 胡 会¹, 许泽锴¹, 王诗倩¹, 崔红杰^{1,2,3}, 黄小红^{1,2,3*}

(1. 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院),福州 350002;

2. 福建农林大学,中西兽医结合与动物保健福建省高校重点实验室,福州 350002;

3. 福建农林大学,福建省兽医中药与动物保健重点实验室,福州 350002)

摘要:旨在探究玉米赤霉烯酮(ZEA)对鸡胚成纤维细胞(DF-1)的毒性作用机制,采用 MTT 法检测细胞活力变化,比色法检测乳酸脱氢酶(LDH)活力,ELISA 法检测 Caspase-3 含量,Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡,荧光显微镜观察细胞活性氧(ROS)水平,线粒体膜电位变化,RT-qPCR 法检测内质网应激(ERs)和细胞凋亡相关基因的 mRNA 转录水平。结果显示,12.5~50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 显著抑制 DF-1 细胞增殖($P < 0.01$),且呈时间和剂量依赖性关系。25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理细胞 24 h 后,上清液中 LDH 和 Caspase-3 含量显著升高($P < 0.01$);细胞中 ROS 水平和细胞凋亡数量极显著升高($P < 0.01$);线粒体膜电位极显著降低($P < 0.01$)。凋亡相关基因 Caspase-3、Bax mRNA 转录水平极显著上调($P < 0.01$),Bcl-2 mRNA 转录水平极显著下调($P < 0.01$);ERs 相关基因 GRP78、ATF6、ATF4、CHOP、PERK mRNA 转录水平极显著上调($P < 0.01$)。综上表明,ZEA 能通过内质网应激途径导致细胞凋亡并对鸡胚成纤维细胞发挥毒性作用。研究结果为深入研究 ZEA 对鸡细胞的毒性作用和解毒手段奠定基础,对相关禽类疾病治疗具有意义。

关键词:玉米赤霉烯酮;鸡胚成纤维细胞;细胞毒性;内质网应激;细胞凋亡

中图分类号:S859.82

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2022)05-1615-11

Toxicity of Zearalenone on Chicken Embryo Fibroblasts

ZHANG Kaizhao^{1,2,3}, HU Hui¹, XU Zekai¹, WANG Shiqian¹,

CUI Hongjie^{1,2,3}, HUANG Xiaohong^{1,2,3*}

(1. College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. University Key Laboratory for Integrated Chinese Traditional and Western Veterinary Medicine and Animal Healthcare in Fujian Province, Fuzhou 350002, China;

3. Fujian Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine and Animal Health, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the mechanism of the toxic effects of zearalenone (ZEA) on chicken embryo fibroblasts (DF-1). The cell viability, lactate dehydrogenase activity, Caspase-3 levels, cell apoptosis, cellular reactive oxygen species levels, mitochondrial membrane potential change and expression of endoplasmic reticulum stress (ERs) and apoptosis-related genes were detected by MTT, colorimetric assay, ELISA, Annexin V-FITC/PI staining, fluorescence microscopy and RT-qPCR, respectively. The results showed that 12.5-50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

收稿日期:2021-09-08

基金项目:福建省中青年教育科研项目(JAT200108);科技创新专项基金项目(CXZX2020066A)

作者简介:张凯照(1990-),男,福建龙岩人,讲师,博士,主要从事基础兽医学研究,E-mail: zzk12320092006@163.com

*通信作者:黄小红,主要从事基础兽医学研究,E-mail: 984158392@qq.com

ZEA significantly inhibited the proliferation of DF-1 cells ($P < 0.01$) in a time- and dose-dependent manner. Herein $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA treated cells for 24 h resulted in a significant increase in LDH and Caspase-3 levels in the supernatant ($P < 0.01$); the levels of ROS and the number of apoptotic cells in the cells were highly significant ($P < 0.01$); the mitochondrial membrane potential was significantly reduced ($P < 0.01$). The mRNA expression levels of apoptosis-related genes *Caspase-3* and *Bax* were highly significantly up-regulated ($P < 0.01$) and that of *Bcl-2* was highly significantly down-regulated ($P < 0.01$); the mRNA expression levels of ERs-related genes *GRP78*, *ATF6*, *ATF4*, *CHOP* and *PERK* were highly significantly up-regulated ($P < 0.01$). The results indicated that ZEA could exert toxic effects on chicken embryonic fibroblasts through endoplasmic reticulum stress leading to apoptosis. The results of the study provide a basis for further research on the toxic effects of ZEA on chicken cells and the means of detoxification, and have implications for the treatment of related avian diseases.

Key words: zearalenone; chicken embryo fibroblasts; cytotoxicity; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

* **Corresponding author:** HUANG Xiaohong, E-mail: 984158392@qq.com

霉菌毒素是丝状真菌的有毒次生代谢物,常见于农作物、谷物和食品污染,其中,玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEA)的污染问题尤为严重^[1]。Lee等^[2]综合2006—2016年霉菌毒素调查报道发现,世界范围内谷物原料中ZEA的污染率及平均污染水平为46%和 $3.049 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,其中,非洲、亚洲和北美污染最严重。我国学者在2018年检测了从19个省市收集的422份饲料样品,发现饲料中ZEA的检出率高达95%,超标率为7.9%,远高于国家饲料卫生标准(GB13078—2017)的限量要求^[3]。ZEA又称F-2毒素,在动物体内可以被转化为还原性代谢产物,如 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇等^[4]。ZEA及其代谢物具有类雌激素作用,并能扰乱动物的内分泌功能^[5]。摄入霉菌毒素可以引起动物的生产性能下降,引发急性或慢性的中毒反应,进而威胁动物和人类健康,并给畜禽养殖业造成巨大的损失^[6]。

ZEA除了具有雌激素活性外,还通过多种损伤机制发挥毒性作用,包括氧化应激、内质网应激、线粒体损伤、细胞周期阻滞、炎症反应、细胞凋亡和坏死等。ZEA能降低草鱼幼鱼的生长性能,损害草鱼肠道结构完整性,使草鱼肠道细胞发生凋亡和坏死,产生肠道毒性^[7]。采用腹腔注射的方式给小鼠注射 $50 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量的ZEA,可观察到肝坏死、肝细胞变性和肾上皮细胞肿胀变性;组织细胞的氧化损伤是目前普遍接受的ZEA引起

肝肾损伤机制之一^[8]。体内外研究表明,ZEA对免疫应答也有显著影响,有免疫刺激或免疫抑制作用^[9]。李欣虹等^[10]研究发现,ZEA能诱导鸡脾淋巴细胞发生细胞凋亡和细胞坏死,抑制细胞增殖。此外,ZEA对多种类型细胞具有时间和剂量依赖性的负效应,如ZEA及其衍生物会对大鼠支持细胞和小鼠卵巢颗粒细胞产生毒性作用^[11-12]; $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ZEA能抑制猪小肠上皮细胞增殖,并在24 h内降低所有浓度(ZEA浓度 $< 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的细胞活力^[13]; Wang等^[14]研究发现,不同剂量的ZEA能通过线粒体途径诱导大鼠原代睾丸间质细胞凋亡。

虽然目前ZEA对禽类的毒性作用已有报道,但关于ZEA对禽类的毒性作用机制研究仍不完善。利用内分泌细胞和生殖细胞来评估ZEA的毒理学效应,但成纤维细胞的潜在影响一直被忽视,成纤维细胞在组织发育、维持和修复方面具有重要作用^[15]。鸡胚成纤维细胞(DF-1)是一种稳定的、无肿瘤基因、自发无限增殖的细胞系,被广泛用于动物病毒研究、疫苗研制、癌症研究等诸多领域。因此,本试验选用DF-1作为供试细胞,探究ZEA对DF-1细胞的毒性作用,旨在进一步探讨ZEA的毒性作用机制与禽类疾病的确切关系,为正确指导农业生产、畜牧养殖和防控霉菌毒素中毒提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清、DMEM 细胞培养基、PBS 和青霉素-链霉素溶液等均购自美国 Hyclone 公司;二甲亚砜(DMSO)和玉米赤霉烯酮(ZEA)均购自美国 Sigma 公司;甲基噻唑蓝 MTT 购自北京索莱宝科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司;LDH 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Caspase-3、ROS、线粒体膜电位检测试剂盒均购自上海茁彩生物科技有限公司;TRIzol 试剂购自美国 Ambion 有限公司;反转录试剂盒和荧光定量试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。鸡胚成纤维细胞 DF-1(ATCC; CRL-12203)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 ZEA 对 DF-1 细胞活力的影响

DF-1 细胞按 4.5×10^3 个·孔⁻¹ 接种至 96 孔板中,置于 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育,当细胞生长至 70%~80% 时,弃培养基,加入含不同浓度 ZEA (ZEA 终浓度分别为 12.5、25.0 和 50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的培养基。以不加 ZEA 的细胞作为对照组,继续培养 6、12、24、48 h 后,采用 MTT 法检测细胞活力。每个浓度设 6 个复孔,试验重复 3 次,试验结果以平均值表示。根据以下公式计算细胞的存活率:细胞存活率=(处理组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100。

1.3 ZEA 对 DF-1 细胞形态的影响

DF-1 细胞按 7×10^4 个·孔⁻¹ 接种至 6 孔板中,置于 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育,当细胞生长至 70%~80% 时,弃培养基,加入含不同浓度 ZEA (ZEA 终浓度分别为 12.5、25.0 和 50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的培养基。以不加 ZEA 的细胞作为对照组,继续培养 24 h 后,在倒置显微镜下观察拍照。

1.4 ZEA 对 DF-1 细胞上清液中 LDH 的影响

DF-1 细胞按 7×10^4 个·孔⁻¹ 接种至 6 孔板中,置于 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育,当细胞生长至 70%~80% 时,弃培养基,加入 ZEA 终浓度为 25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的培养基。以不加 ZEA 的细胞作为对照组,各设置 6 个复孔,继续培养 24 h 后收集

细胞上清液,按照 LDH 检测试剂盒说明书步骤操作检测上清液中 LDH 的活性。试验重复 3 次。

1.5 ZEA 对 DF-1 细胞上清液中 Caspase-3 含量的影响

细胞接种和药物处理方法同“1.4”,继续培养 24 h 后收集细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书测定上清液中 Caspase-3 的含量。

1.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 ZEA 对 DF-1 细胞凋亡的影响

细胞接板和药物处理方法同“1.4”,继续培养 24 h 后,按照细胞凋亡检测试剂盒说明书步骤操作,准备好细胞样品,流式细胞仪检测。

1.7 ZEA 对 DF-1 细胞中活性氧水平的影响

细胞接种和药物处理方法同“1.4”,加入含 DCFH-DA 荧光染料的培养液,37 °C 避光孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次后用荧光倒置显微镜观察并拍照。

1.8 ZEA 对 DF-1 细胞线粒体膜电位的影响

细胞接种和药物处理方法同“1.4”,继续培养 24 h 后,加入含 JC-1 荧光染料的培养液,37 °C 避光孵育 20 min,用 JC-1 Buffer (1×) 洗涤 2 次,用荧光倒置显微镜观察并拍照。

1.9 ZEA 处理对 DF-1 细胞凋亡相关基因转录水平的影响

细胞接种和药物处理方法同“1.4”,继续培养 24 h 后,3 000 r·min⁻¹ 4 °C 离心 10 min 收集细胞,使用 TRIzol 法提取总 RNA,并反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板,进行 RT-qPCR 反应。检测细胞凋亡(*Bcl-2*、*Caspase-3*、*Bax*)和内质网应激相关基因(*ATF4*、*ATF6*、*GRP78*、*CHOP*、*IRE1*、*PERK*)的 mRNA 转录水平。具体引物序列见表 1,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以 β -actin 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算分析结果。

1.10 数据分析

采用 SPSS25.0 对试验数据进行单因素方差分析,试验结果均以“平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)”表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。采用 Grapher16.5 软件作图。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列信息

Table 1 RT-qPCR primer sequences information

基因 Genes	引物序列(5'→3') Primer sequences	产物大小/bp Product size	基因登录号 Accession number
<i>Bcl-2</i>	F:CGCTGGTGGACAACATTG R:CAGGCTCAGGATGGTCTT	167	NM 205339. 2
<i>Caspase-3</i>	F:TGGCCCTCTTGAAGTAAAG R:TCCACTGTCTGCTTCAATACC	139	NM 204725. 1
<i>Bax</i>	F:TTCCTCACAGGCATCAAC R:CACTTCTTCTCCTTCTTCTTG	134	NM 040693909. 1
<i>βactin</i>	F:CCCATGCCATCCTCCGTCTG R:CCTCGGGCACCTGAACCTCTC	265	NM 205518
<i>ATF6</i>	F:AGTCCAATAACCAGCATCAG R:CATCACCTCATAGTCCTTCC	335	NM 015290399. 3
<i>GRP78</i>	F:CCTGGTGTGCTTGATGT R:AGATGATTGTCTTGGTGAG	195	NM 205491. 1
<i>ATF4</i>	F:AGAACCTCCACTCATACCT R:CCTTCCAGAACATCCACTT	177	NM 204880. 2
<i>CHOP</i>	F:GCTGGATGAGACTGAATGCAGAG R:CACGCTTCCGCTTTGTCTCTG	149	XM_040693765. 1
<i>PERK</i>	F:TGGAAGATGTTGTGATGGT R:ATGGCGAAGAATGCTGTA	296	NM_001006477. 1
<i>IRE1</i>	F:CGCCCAAAGCATCAAACCATTCTG R:CACTCTGTTGGCATCGTCATCTCC	107	NM_001285499. 1

2 结果

2.1 ZEA 对 DF-1 细胞形态和活力的影响

ZEA 对 DF-1 细胞形态的影响结果见图 1。与对照组相比, ZEA 浓度越高, 细胞形态越差、皱缩、欠规则、呈圆形或卵圆形、折光性差、贴壁细胞减少, 死亡细胞增多。细胞活力检测结果见图 2。与对照组相比, 随着 ZEA 浓度增加、作用时间增长, ZEA 对 DF-1 细胞活力的抑制作用增强, 呈时间和剂量依赖性关系, $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理 DF-1 细胞 24 h 后细胞活力约为 50%, 因此试验选取 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理 DF-1 细胞 24 h 进行后续试验。

2.2 ZEA 对 DF-1 细胞乳酸脱氢酶(LDH)的影响

由图 3 可知, 与对照组相比, $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理组 LDH 活性极显著升高($P < 0.01$), 约为

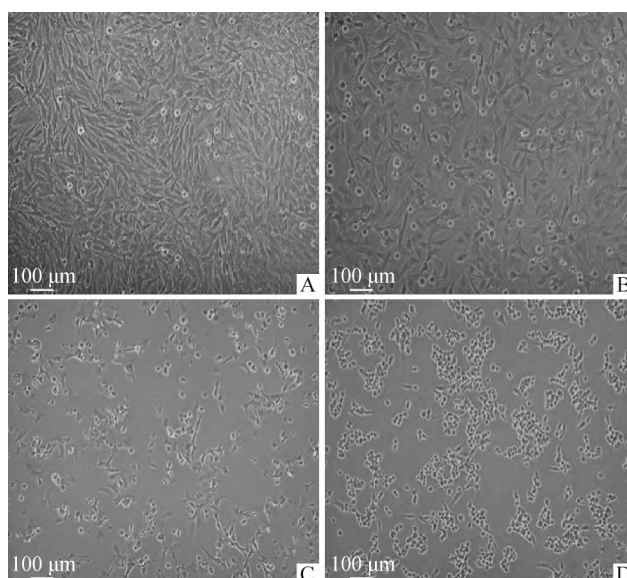
正常细胞的 6 倍。表明 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 作用于 DF-1 细胞后会产生细胞毒性, 从而导致细胞凋亡。

2.3 ZEA 对 DF-1 细胞上清液中 Caspase-3 含量的影响

由图 4 可知, 与对照组相比, $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理 DF-1 细胞 24 h 后, 细胞上清液中 Caspase-3 含量极显著升高($P < 0.01$), 约为正常细胞的 2 倍。表明 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 作用于 DF-1 细胞后会发生细胞凋亡。

2.4 ZEA 对 DF-1 细胞凋亡的影响

由图 5 可知, Q1 表示坏死细胞, Q2 表示晚期凋亡细胞, Q3 表示早期凋亡细胞, Q4 表示活细胞。与对照组相比, $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理组的早凋(Q3)和晚凋(Q2)细胞数显著增加, 表明 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 作用于 DF-1 细胞后会发生细胞凋亡。

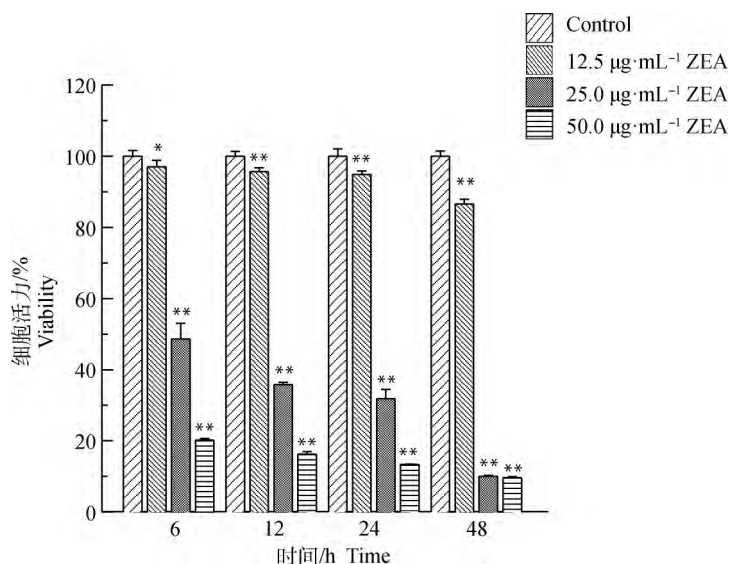


A. 对照组; B. $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理组; C. $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理组; D. $50.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理组。扫描文章首页 OSID 码可查看彩图

A. Control group; B. $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA group; C. $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA group; D. $50.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA group. The color pictures can be found by scanning the OSID code on the front page of the article

图 1 不同浓度 ZEA 处理 24 h 对 DF-1 细胞形态的影响 (标尺 = $100 \mu\text{m}$)

Fig. 1 Observation of cell growth after treatment with ZEA in different concentrations for 24 h (Scale bar = $100 \mu\text{m}$)



与对照组相比, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。下同

Compared with control, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. The same as below

图 2 ZEA 对 DF-1 细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of DF-1 cell viability in stimulation of ZEA with different concentrations at various time

2.5 ZEA 对 DF-1 细胞活性氧水平的影响

由图 6A 可知,与对照组相比, $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理组绿色荧光强度明显增强,细胞核呈浓缩、致密浓染。由图 6B 可知,与对照组相比较, $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理后的 DF-1 细胞 ROS 水平极显著增加 ($P < 0.01$),约为正常细胞的 20 倍,对细胞产生毒害作用。

2.6 ZEA 对 DF-1 细胞线粒体膜电位的影响

由图 7 可知,与对照组相比, $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理组红色荧光明显减弱,绿色荧光明显增强。由图 8 可知,与对照组相比较, $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理后的 DF-1 细胞线粒体膜电位极显著降低 ($P < 0.01$),约为正常细胞的 $1/7$,说明 ZEA 能造成 DF-1 细胞线粒体损伤。

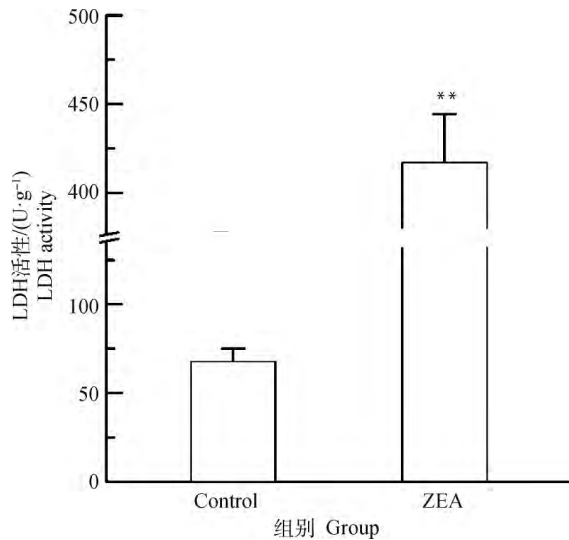


图3 ZEA对DF-1细胞上清液中LDH活性的影响
Fig. 3 Effect of ZEA on lactate dehydrogenase release in supernatant of DF-1 cells

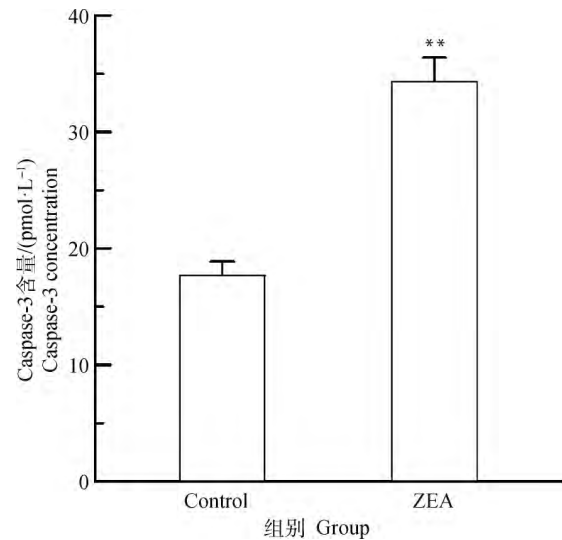


图4 ZEA对DF-1细胞上清液中Caspase-3含量的影响
Fig. 4 Effect of ZEA on Caspase-3 content in supernatant of DF-1 cells

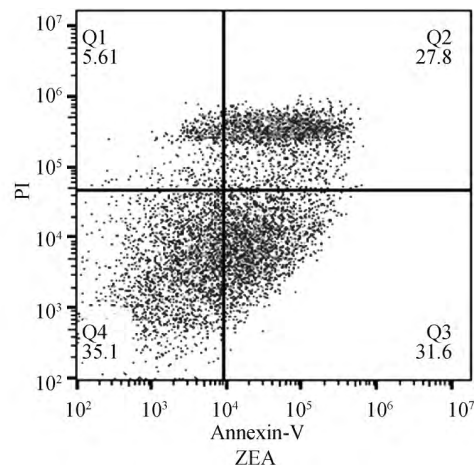
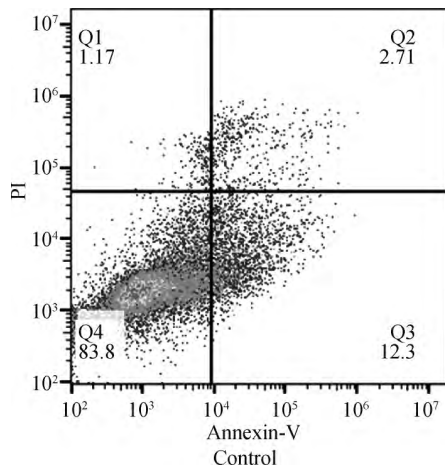
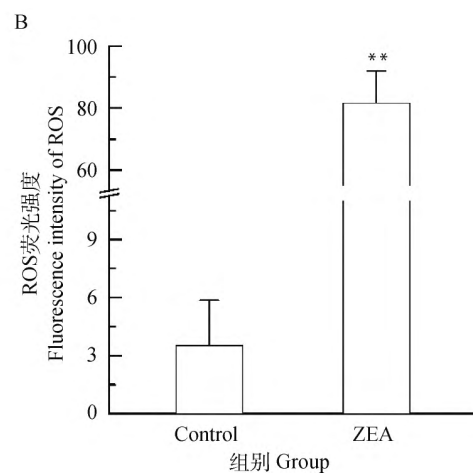
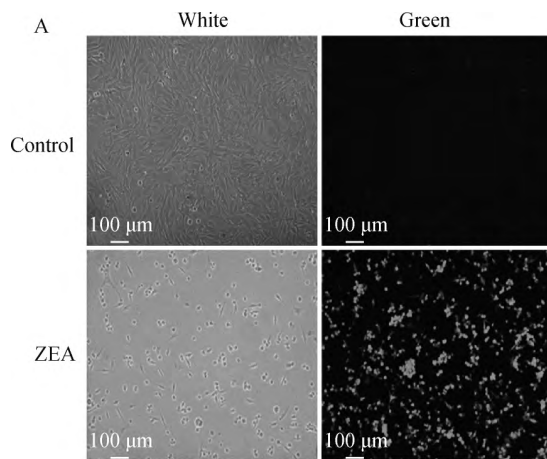


图5 ZEA对DF-1细胞凋亡的影响(扫描文章首页OSID码可查看彩图)
Fig. 5 Effect of ZEA on the apoptosis of DF-1 cells (The color pictures can be found by scanning the OSID code on the front page of the article)



A. 细胞内ROS水平变化的荧光染色结果(标尺=100 μm,扫描文章首页OSID码可查看彩图); B. ROS荧光强度分析
A. The detection of intracellular ROS variation by fluorescence (Scale bar=100 μm, the color pictures can be found by scanning the OSID code on the front page of the article); B. ROS fluorescence intensity analysis

图6 ZEA对DF-1细胞活性氧水平的影响
Fig. 6 Effect of ZEA on reactive oxygen species level of DF-1 cells

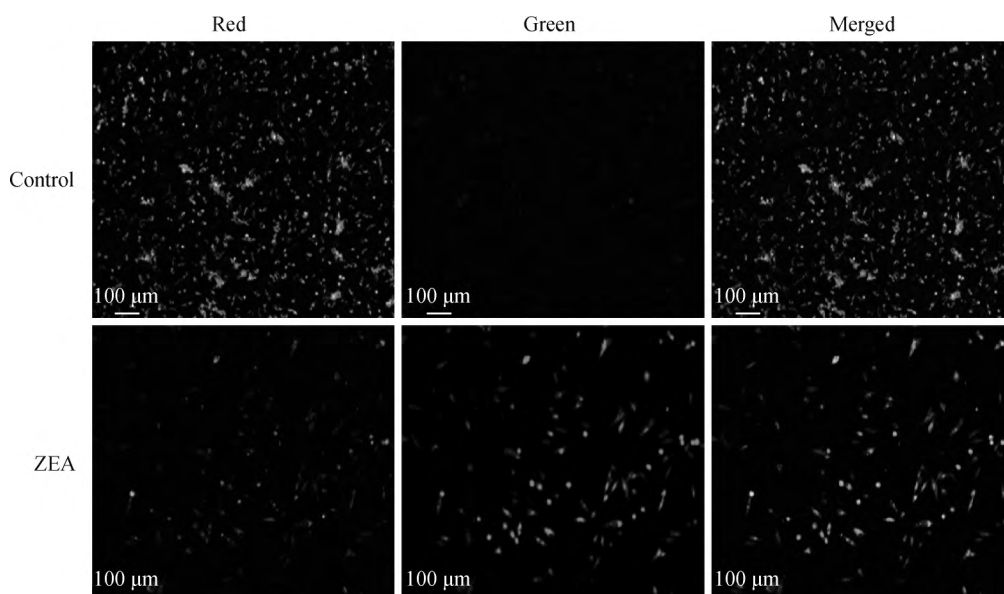


图7 线粒体膜电位荧光染色结果(标尺=100 μm ,扫描文章首页 OSID 码可查看彩图)

Fig. 7 The fluorescence staining of mitochondrial membrane potential(Scale bar=100 μm , the color pictures can be found by scanning the OSID code on the front page of the article)

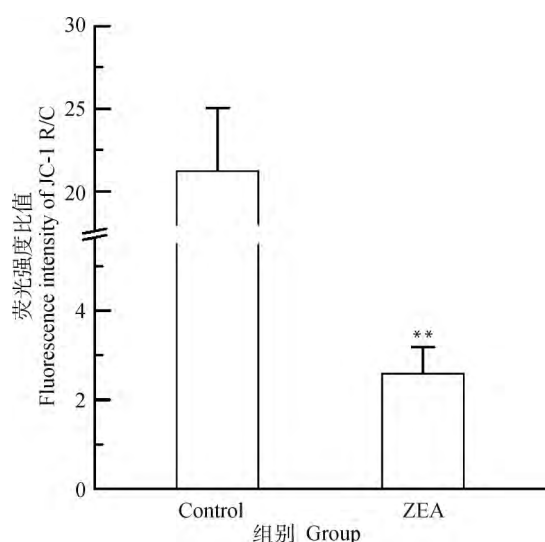


图8 线粒体膜电位红绿荧光强度比值分析

Fig. 8 Ratio analysis of red-green fluorescence intensity of mitochondrial membrane potential

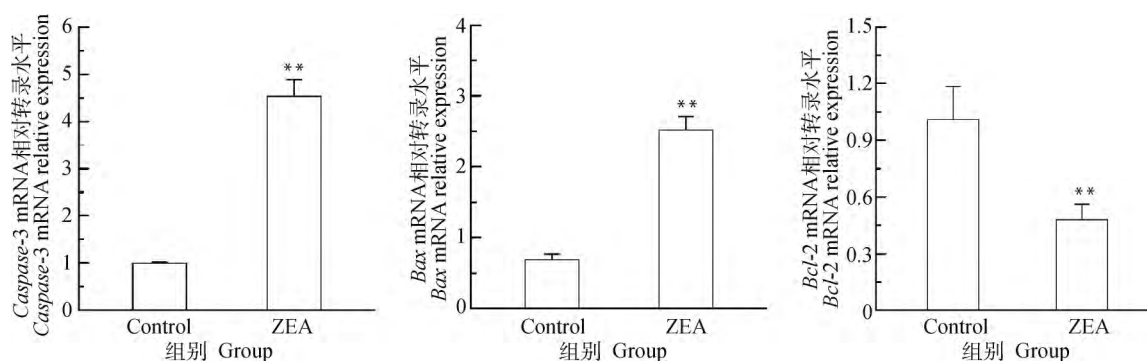


图9 ZEA对DF-1细胞凋亡相关基因mRNA转录水平的影响

Fig. 9 Effect of apoptosis-related gene mRNA expression in DF-1 cells after incubation with ZEA

2.7 DF-1 细胞凋亡相关基因的 mRNA 转录水平

通过 RT-qPCR 检测凋亡相关基因 *Caspase-3*、*Bax*、*Bcl-2* 的转录水平,由图 9 可知,与对照组相比,25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 组的促凋亡基因 *Caspase-3* mRNA 转录水平极显著上调($P < 0.01$)、*Bax* mRNA 转录水平极显著上调($P < 0.01$);抑凋亡基因 *Bcl-2* mRNA 转录水平极显著下调($P < 0.01$)。从 mRNA 转录水平表明 ZEA 能诱导细胞凋亡。

2.8 DF-1 细胞 ERs 相关基因的 mRNA 表达

通过 RT-qPCR 检测 ERs 相关基因 *CHOP*、*GRP78*、*PERK*、*ATF6*、*ATF4*、*IRE1* 的 mRNA 转录水平,由图 10 可知,与对照组相比,25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 组 *CHOP*、*GRP78*、*PERK*、*ATF6*、*ATF4*、*IRE1* mRNA 转录水平极显著上调($P < 0.01$)。从 mRNA 转录水平表明 ZEA 能诱导发生内质网应激。

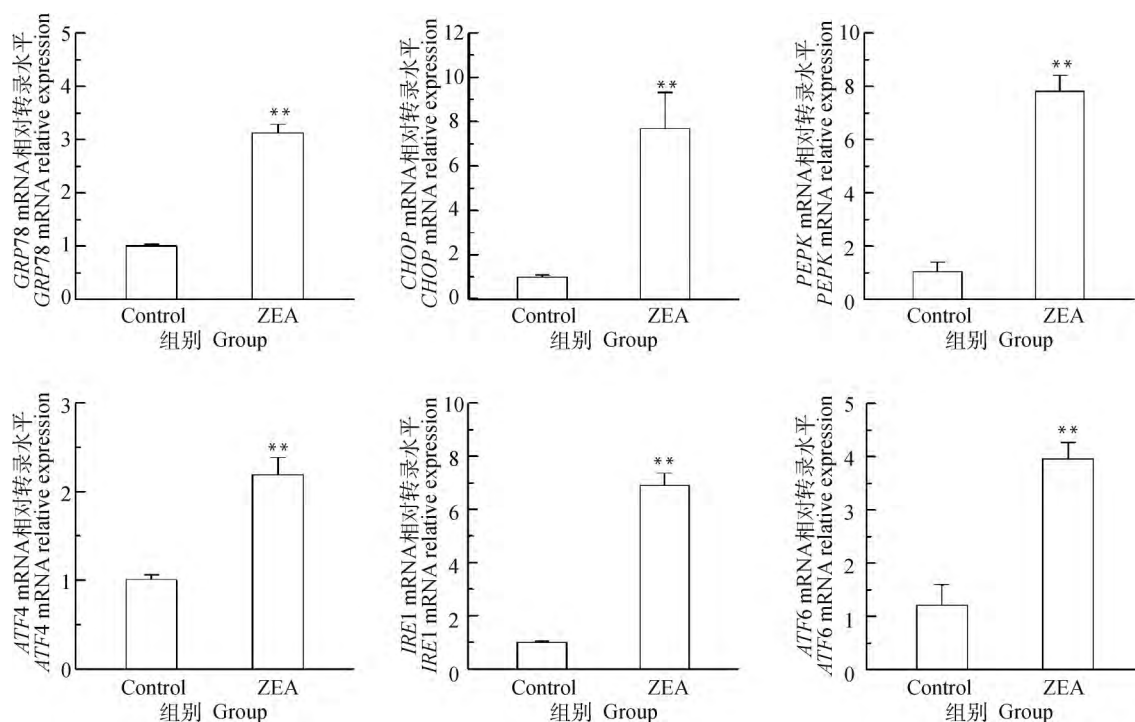


图 10 ZEA 对 DF-1 细胞 ERs 相关基因 mRNA 转录水平的影响

Fig. 10 Effect of endoplasmic reticulum stress-related gene mRNA expression in DF-1 cells after incubation with ZEA

3 讨论

人或畜禽通过饮食将 ZEA 摄入体内,会产生免疫毒性、生殖毒性、肠道毒性、肝肾毒性、细胞毒性、甚至致癌性,严重危害人类和畜禽健康,降低动物生产性能,带来不可估量的经济损失^[16]。成纤维细胞代谢旺盛、增殖能力强,具有合成和分泌蛋白质的功能^[17]。而 DF-1 是一种鸡的典型成纤维细胞模型,常用来研究鸡细胞的功能和变化,因此,本试验以 DF-1 为模型研究 ZEA 的毒性作用机制。

乳酸脱氢酶(LDH)是细胞内一种稳定的酶,LDH 的释放是检测细胞毒性和细胞膜完整性的重要指标,当细胞凋亡时会破坏细胞膜结构从而导致细胞质内的 LDH 释放到培养液中^[18]。本研究通过细胞活力及 LDH 的检测表明 ZEA 对 DF-1 细胞产生毒性作用,并抑制 DF-1 细胞的活力。与此一致,陈新亮^[19]研究发现,ZEA 使 MODE-K 细胞膜发生脂质氧化,细胞破损,使细胞内的 LDH 活性显著升高。

活性氧(ROS)是氧化应激反应中的重要信号分子,ROS 的过度积累可破坏细胞内稳态,导致线粒体功能障碍,直接或间接(或同时)影响内质网稳态和蛋白质折叠^[20]。大量体外研究表明,ZEA 通过

ROS 的产生诱导细胞毒性,导致脂质过氧化、DNA 损伤和细胞凋亡^[21]。线粒体是细胞的发电站,消耗氧气以产生足够的能量来维持正常的细胞过程,其电位变化可以反映出细胞的状态。此外,线粒体膜电位是检测细胞凋亡早期的重要标志,也是检测细胞凋亡早期阶段的方式之一^[22]。张心怡等^[23]研究发现,ZEA 处理小鼠 T 淋巴细胞可以提高细胞内活性氧的水平,同时降低 T 淋巴细胞线粒体膜电位。本研究使用 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZEA 处理 DF-1 细胞 24 h 后,与对照组相比,ZEA 组 ROS 显著升高,线粒体膜电位降低,引起线粒体损伤。与张心怡等^[23]研究结果一致,这一结果也表明 ZEA 对多种类型细胞具有毒性作用。

内质网在蛋白质折叠、蛋白质运输和细胞内 Ca^{2+} 调控中发挥重要作用,内质网生理功能的损伤,如未折叠蛋白的积累、腔内钙稳态的紊乱和氧化应激会引发内质网应激(ERs),进而触发未折叠蛋白反应(UPR)^[24]。UPR 是一种适应性反应,通过激活 3 个近端传感器 IRE1、ATF6 和 PERK 来恢复内质网稳态。但是,如果内质网应激严重或延长,UPR 通过激活下游效应因子,包括 CHOP、JNK、Caspases 和 Bcl-2 家族成员,从而导致细胞凋亡^[25]。王宗捷等^[26]研究发现,ZEA 可以通过 ERs

通路调控山羊 ESCs 细胞的凋亡进程。在 DF-1 细胞中,作者发现 ZEA 处理细胞后,ERs 相关基因 *CHOP*、*GRP78*、*PERK*、*ATF6*、*ATF4*、*IRE1* mRNA 转录水平上调,表明该霉菌毒素诱导的内质网应激足以激活 UPR 的促凋亡通路。*GRP78* 是 ERs 的标志物之一,*GRP78* 上调表明 ERs 增加^[27],而 *ATF6* 是 *GRP78* 的最佳表达伴侣^[28]。有报道称其他霉菌毒素也会引起不同细胞的 ERs,比如木霉菌素、HT-2 毒素等^[29-30]。说明诱导 ERs 可能是霉菌毒素毒性的一个共同特征。

由于 ROS 的增加,线粒体膜电位的降低和 ERs 的发生,试验进一步检测 ZEA 处理后 DF-1 细胞是否发生细胞凋亡。细胞凋亡是 ZEA 造成细胞毒性的重要途径,是细胞程序性死亡的过程,主要分为两类转导途径,1)线粒体或内质网参与的内源性途径,2)死亡受体介导的外源性途径^[31]。本研究通过流式细胞术分析表明,ZEA 处理后 DF-1 细胞凋亡率显著升高。Bcl-2 家族蛋白分为促凋亡和抑凋亡两种,在细胞线粒体凋亡途径中至关重要^[32]。接收到凋亡信号后,Bcl-2 在线粒体外膜通过抑制细胞色素 C 的释放来抑制细胞凋亡,而 Bax 进入线粒体使线粒体膜通透性增加、去极化,释放细胞色素 C,激活线粒体通路,导致细胞凋亡^[33]。抑凋亡基因 *Bcl-2* 和促凋亡基因 *Bax* 的比例能决定细胞是否凋亡^[34]。Caspase-3 蛋白家族在凋亡的启动中十分重要,其中,Caspase-3 是主要的启动子,它活化会使 DNA 断裂、染色质凝聚、最终生成凋亡小体^[35]。本研究用 ZEA 处理 DF-1 细胞后上清中 Caspase-3 含量显著增加,抑凋亡基因 *Bcl-2* 的 mRNA 转录水平下调,*Bax* 和 *Caspase-3* mRNA 转录水平上调,这表明 ZEA 会导致 DF-1 细胞发生细胞凋亡。

4 结 论

ZEA 主要通过内质网应激诱导细胞凋亡和激活细胞凋亡途径对 DF-1 细胞发挥毒性作用。本研究为深入探讨 ZEA 的毒性作用机制、与人畜疾病的确切关系及相关疾病治疗奠定基础。

参考文献 (References):

[1] 闫昭明,陈清华,陈凤鸣.玉米赤霉烯酮毒性研究[J].动物营养学报,2018,30(9):3453-3458.
YAN Z M, CHEN Q H, CHEN F M. Study on toxicity of zearalenone [J]. *Chinese Journal of*

Animal Nutrition, 2018, 30(9):3453-3458. (in Chinese)

- [2] LEE H J, RYU D. Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food products: public health perspectives of their co-occurrence[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(33):7034-7051.
- [3] 黄俊恒,黄广明.2018年19省市饲料及饲料原料霉菌毒素污染状况分析[J].养猪,2019(3):6-8.
HUANG J H, HUANG G M. Analysis on mycotoxin contamination of feed and feed materials in 19 provinces and cities in 2018[J]. *Swine Prod*, 2019(3):6-8. (in Chinese)
- [4] BELHASSEN H, JIMÉNEZ-DÍAZ I, GHALI R, et al. Validation of a UHPLC-MS/MS method for quantification of zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol and zearalanone in human urine[J]. *J Chromatogr B*, 2014, 962:68-74.
- [5] ZHENG W L, FENG N N, WANG Y, et al. Effects of zearalenone and its derivatives on the synthesis and secretion of mammalian sex steroid hormones: a review[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 126:262-276.
- [6] HAQUE A, WANG Y H, SHEN Z Q, et al. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: a review[J]. *Microb Pathog*, 2020, 142:104095.
- [7] WANG Y L, ZHOU X Q, JIANG W D, et al. Effects of dietary zearalenone on oxidative stress, cell apoptosis, and tight junction in the intestine of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Toxins*, 2019, 11(6):333.
- [8] 梁梓森,马勇江,刘长永,等.玉米赤霉烯酮对小鼠肝脏及肾脏的毒性作用[J].中国兽医学报,2010,30(5):673-676.
LIANG Z S, MA Y J, LIU C Y, et al. *In vivo* toxicity of zearalenone on liver and kidney in mice[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30(5):673-676. (in Chinese)
- [9] BULGARU C V, MARIN D E, PISTOL G C, et al. Zearalenone and the immune response[J]. *Toxins*, 2021, 13(4):248.
- [10] 李欣虹,郑若愚,辜彦霏,等.玉米赤霉烯酮对体外培养鸡脾脏淋巴细胞凋亡的影响[J].动物营养学报,2018,30(8):3285-3292.
LI X H, ZHENG R Y, GU Y F, et al. Effects of zearalenone on apoptosis of chicken splenic

- lymphocytes *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(8):3285-3292. (in Chinese)
- [11] CAI G D, SI M X, LI X, et al. Zearalenone induces apoptosis of rat Sertoli cells through Fas-Fas ligand and mitochondrial pathway[J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(4):424-433.
- [12] 裴亚萍, 赵瑾, 孙娜, 等. 咖啡酸对玉米赤霉烯酮诱导小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的保护作用[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(12):3068-3075.
- PEI Y P, ZHAO J, SUN N, et al. The effect of caffeic acid on zearalenone-induced ovarian granulosa cell apoptosis in mice [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(12):3068-3075. (in Chinese)
- [13] WANG X, YU H, FANG H T, et al. Transcriptional profiling of zearalenone-induced inhibition of IPEC-J2 cell proliferation[J]. *Toxicol*, 2019, 172:8-14.
- [14] WANG Y J, ZHENG W L, BIAN X J, et al. Zearalenone induces apoptosis and cytoprotective autophagy in primary Leydig cells[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 226(2):182-191.
- [15] 杨桂然, 王福科, 李彦林. 成纤维细胞的生物学特性及分化潜能[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(13):2114-2119.
- YANG G R, WANG F K, LI Y L. Biological characteristics and differentiation potential of fibroblasts [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2020, 24(13):2114-2119. (in Chinese)
- [16] 许巧. 镰刀菌毒素对动物毒性作用的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(4):61-67.
- XU Q. Research progress on toxicity of fusarium mycotoxins in animals [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2021, 57(4):61-67. (in Chinese)
- [17] LYNCH M D, WATT F M. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(1):26-35.
- [18] FANTIN V R, ST-PIERRE J, LEDER P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance[J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(6):425-434.
- [19] 陈新亮. 原花青素对玉米赤霉烯酮致 MODE-K 细胞氧化损伤及内质网应激凋亡保护作用研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2018.
- CHEN X L. Protective effect of proanthocyanidins on the oxidative damage and apoptosis of endoplasmic reticulum stress of MODE-K cells induced by zearalenone[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [20] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLOTT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(3):909-950.
- [21] HASSEN W, AYED-BOUSSEMA I, OSCOZ A A, et al. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction[J]. *Toxicology*, 2007, 232(3):294-302.
- [22] SINHA K, DAS J, PAL P B, et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(7):1157-1180.
- [23] 张心怡, 吴云平, 蔡国栋, 等. 玉米赤霉烯酮对小鼠 T 淋巴细胞活性氧及线粒体膜电位的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(8):90-94.
- ZHANG X Y, WU Y P, CAI G D, et al. Effects of ZEA on reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in T lymphocytes of mice [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 50(8):90-94. (in Chinese)
- [24] RON D, WALTER P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7):519-529.
- [25] COLEMAN O I, HALLER D. ER stress and the UPR in shaping intestinal tissue homeostasis and immunity[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2825.
- [26] 王宗捷, 张瑞雪, 刘守勤, 等. 玉米赤霉烯酮诱导山羊子宫内层基质细胞凋亡的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(2):535-542.
- WANG Z J, ZHANG R X, LIU S Q, et al. The apoptotic effect of zearalenone on goat endometrial stromal cells [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(2):535-542. (in Chinese)
- [27] PARK S W, OZCAN U. Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease [J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35(3):351-373.
- [28] BAUMEISTER P, LUO S Z, SKARNES W C, et al. Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(11):4529-4540.
- [29] 杨方晓, 李莲, 赵若含, 等. 褪黑素对 HT-2 毒素诱导的牛卵巢颗粒细胞内质网应激与自噬的影响

- [J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(1):143-150.
- YANG F X, LI L, ZHAO R H, et al. Effects of melatonin on endoplasmic reticulum stress and autophagy in bovine ovarian granulosa cells induced by HT-2 toxin [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2020, 43(1):143-150. (in Chinese)
- [30] SU C M, WANG S W, LEE T H, et al. Trichodermin induces cell apoptosis through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in human chondrosarcoma cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(2):335-344.
- [31] GAN Z, JIANG K F, WU H C, et al. Polydatin reduces *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid-induced injury by attenuating reactive oxygen species generation and TLR2-NF κ B signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(11):2796-2808.
- [32] PEÑA-BLANCO A, GARCÍA-SÁEZ A G. Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis [J]. *FEBS J*, 2018, 285(3):416-431.
- [33] NAIM S, KAUFMANN T. The multifaceted roles of the BCL-2 family member BOK [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:574338.
- [34] VARDIYAN R, EZATI D, ANVARI M, et al. Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes *Bcl-2* and *Bax* [J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2020, 47(3):155-160.
- [35] SURESH K, CARINO K, JOHNSTON L, et al. A nonapoptotic endothelial barrier-protective role for caspase-3 [J]. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(6):L1118-L1126.
- (编辑 白永平)