

DOI: 10.12264/JFSC2023-0359

高糖培养对花鲈肝细胞能量代谢与线粒体功能的影响

任惠娟, 柯轶雄, 鲁康乐, 李学山, 王玲, 宋凯, 张春晓

集美大学水产学院, 海水养殖生物育种全国重点实验室, 福建 厦门 361021

摘要: 为探究花鲈(*Lateolabrax maculatus*)肝细胞在高糖负荷下的代谢特征, 本研究在正常糖(5 mmol/L, 对照组)与高糖(40 mmol/L, 高糖组)条件下培养花鲈肝脏细胞系, 在培养 48 h 后, 收集细胞及细胞培养基上清液测定相关指标。结果表明, 与对照组相比, 高糖组细胞糖原含量显著升高($P<0.05$), 且细胞己糖激酶、柠檬酸合酶、 α -酮戊二酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶的活性显著提高($P<0.05$), 表明高糖负荷增强了肝细胞糖酵解和三羧酸循环。此外, 高糖培养提高了上清液中谷丙转氨酶与谷草转氨酶的活性($P<0.05$), 表明高糖培养诱导肝细胞损伤。高糖负荷下, 细胞活性氧(ROS)含量显著升高, ATP 含量显著降低($P<0.05$), 并且在透射电镜下可观察到线粒体肿胀与嵴损伤, 表明高糖诱导线粒体损伤。对线粒体自噬和合成相关基因表达分析发现, 高糖培养显著上调了线粒体自噬相关基因 *pink*、*atg5*、*mull* 的表达, 并下调线粒体生成相关基因 *nrf-1*、*pgc-1 α* 、*pgc-1 β* 的表达($P<0.05$)。线粒体基因组测序表明, 高糖培养肝细胞的线粒体 D-Loop 区基因发生了突变。综上所述, 花鲈肝细胞通过增强糖酵解与三羧酸循环, 促进线粒体自噬, 抑制线粒体生成, 诱导线粒体 DNA 突变以应对高糖带来的不良影响。

关键词: 花鲈; 离体肝细胞; 高糖负荷; 线粒体功能; 糖代谢

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)05-0513-11

糖类在自然界广泛存在, 是价格低廉的能量来源, 在配合饲料中常大量使用。在水产配合饲料中, 适当提高饲料糖类含量可减少蛋白质的分解供能, 不仅节约蛋白质, 降低饲料成本, 还减少了氨氮排放。然而, 鱼类对糖类的利用与耐受力较差。大多数鱼类在摄食高糖饲料后均会出现持续高血糖症状^[1], 长期摄食高糖饲料还会导致鱼体出现代谢紊乱、肝损伤^[2]、免疫低下^[3]等现象。因此, 鱼类糖代谢的调控成为多年来的研究热点之一。己糖激酶是糖酵解关键限速酶^[4], 研究表明, 鱼类己糖激酶的活性对饲料糖水平并不敏感, 提高饲料糖水平后己糖激酶活性变化不大^[5]。同时, 鱼类的糖异生调节能力较差, 即使在摄入高糖饲料的情况下糖异生酶依然保持较高活性^[6]。因此, 鱼类糖利用能力低的原因可能与糖代谢酶活性的

调控有关。还有研究发现, 鱼类在摄入过多糖类后容易出现脂肪与糖原的蓄积, 并诱导线粒体损伤与肝脏受损, 进一步损害鱼体健康^[7-9]。

目前, 关于鱼类对糖代谢的研究主要采用传统的养殖实验^[1,3,9-10], 虽然可很好地显示鱼体的真实生理状态, 但容易受以下因素干扰; (1) 配制不同糖水平饲料, 不可避免要使用纤维素等填充剂, 引入额外变量^[11]; (2) 养殖实验结果会受到水环境因素的影响^[12], 不同水温对糖代谢酶的活性有较大的影响^[13]。花鲈是(*Lateolabrax maculatus*)我国重要的海水经济鱼类, 具有较高的经济价值。作为一种肉食性鱼类, 对其进行高糖投喂会导致肝糖原增加、脂质沉积、肝损伤等糖代谢紊乱的现象^[14-15], 因此花鲈是研究鱼类糖代谢的良好对象。为了进一步明确养殖鱼类应对高糖负荷

收稿日期: 2024-02-24; 修订日期: 2024-03-22.

基金项目: 福建省杰出青年科学基金项目(2023J06035).

作者简介: 任惠娟(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: 778236570@qq.com

通信作者: 鲁康乐, 副教授, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: lukangle@jmu.edu.cn

的代谢特征,本研究以花鲈离体肝细胞为对象,探讨在高糖负荷下肝细胞的能量代谢与线粒体状态的变化,以期为海水鱼糖代谢调控研究提供更多理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及培养方法

本研究使用的细胞为花鲈肝细胞系,为前期采用组织块迁出法并进行多次传代培养而得,冻存于本实验室。使用含 20%胎牛血清、1%青链霉素及 DMEM/F12 培养基于 28 °C, 5% CO₂ 条件下培养。在实验处理前,将细胞培养至 70%~80% 融合,然后使用葡萄糖浓度为 0、2.5、5、7.5、10、20、30、40、50、60、80、100 mmol/L 的培养液培养细胞,并于 6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 对细胞活性进行检测,以筛选高糖培养的适宜条件。

从上一部筛选得出适宜的方法后,正式试验设置 2 个处理,即对照组和高糖组,每组分别设置 3 个重复试验。对照组用普通 DMEM/F12 培养基培养细胞,高糖组用含有高浓度葡萄糖的 DMEM/F12 培养基培养细胞,培养 48 h。细胞培养处理结束后,收集瓶中培养基上清,用磷酸盐缓冲液清洗细胞 2 次后,采用胰蛋白酶消化法收集细胞,并再次用磷酸盐缓冲液清洗 2 次。

1.2 指标测定

1.2.1 细胞生化分析 葡萄糖含量采用 Zhang 等^[16]的操作方法进行测定;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)采用 Dong 等^[17]的操作方法进行检测。

肝糖原含量的检测,采用南京建成糖原试剂盒测定。详细步骤:将收集好的细胞样品于 200 μ L 磷酸盐缓冲液重悬,然后在冰浴条件下超声破碎,每 50 μ L 样品加入 150 μ L 碱溶液,沸水浴 20 min 后,流水冷却,即为肝糖原检测液。设空白管、标准管和测定管,分别加入 1 mL 双蒸水、1 mL 标准管、0.9 mL 双蒸水+0.1 mL 肝糖原检测液,每管中加入 2 mL 显色液,混匀后沸水浴 5 min,取出后冷却混匀,于 620 nm 波长,1 cm 光径,空白管调零,测各管 OD 值。

三磷酸腺苷(ATP)含量的测定采用上海碧云天生物技术有限公司增强型 ATP 检测试剂盒。详细步骤:在收集好的细胞中加入 200 μ L 裂解液,用移液枪反复吹打充分以裂解细胞。裂解后 4 °C 12000 $\times$ g 离心 5 min,取上清,用于后续的测定。按照每个样品需 100 μ L ATP 检测工作液的比例配制适当量的 ATP 检测工作液。把待用试剂在冰浴上溶解。取适量的 ATP 检测试剂,按照 1:4 的比例稀释,配制成 ATP 检测工作液,在全黑底酶标板中以每孔 100 μ L 的量加入检测孔,室温放置 5 min 以消耗掉本底的 ATP,然后迅速加入 20 μ L 待测样品,通过多功能酶标仪(Varioskan LUX, Thermo Scientific)进行化学发光检测,将 RLU 值代入标准曲线读数,计算样品 ATP 浓度。

1.2.2 细胞代谢酶活性检测 己糖激酶(HK)、柠檬酸合酶(CS)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)、 α -酮戊二酸脱氢酶(α -KGDHC)、苹果酸脱氢酶(MDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)活性均采用 Ma^[12]等的操作方法。

1.2.3 细胞抗氧化分析 活性氧(ROS)含量的测定方法如下:收集细胞后,用磷酸盐缓冲溶液洗涤 2 次,按照 1:1000 加入用无血清培养基稀释的 DCFH-DA 探针,37 °C 孵育 20 min,无血清培养液洗涤 3 次后,于流式细胞仪(CytoFLEX, Beckman Coulter)进行定量分析。

进一步采用 Dong 等^[17]的操作方法,对花鲈肝细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性与丙二醛(MDA)含量进行测定。

1.2.4 线粒体形态观察 待培养后,收集细胞于 1.5 mL 离心管中,500 $\times$ g 离心 1 min,弃上清。在细胞沉淀中加入 500 μ L 清理液,500 μ L 詹纳斯绿 B 染色液,充分混匀,冰槽避光孵育 20 min,即刻移取 10 μ L 置于载玻片上,封片后于光学显微镜(DM5000B, leica)下观察。

电镜样品制备:收集细胞后,常温避光固定 5 min,细胞刮刀斜着 45°快速铲下,1500 r/min 离心 3 min,弃沉淀,然后加入 2.5%戊二醛固定液,室温避光固定 30 min 后 4 °C 保存。随后在 OsO₄ 溶液中固定(浓度 1%,时间 2 h),环氧树脂包埋,使用超薄切片机制成 60 nm 厚的超薄切片、染色

(乙酸铀和柠檬酸铅), 在透射电子显微镜下观察。

1.2.5 荧光定量 PCR 细胞总 RNA 的提取采用 trizol 法进行, 具体操作步骤参考试剂盒说明书。总 RNA 提取后, 通过微量分光光度计在 260/280 nm 处测定 RNA 浓度和纯度, 然后通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的完整性, 通过 RQ1 RNase-Free DNase 处理 RNA 样品, 以避免基因组 DNA 污染。

使用诺唯赞试剂盒进行 cDNA 的合成, 具体

操作步骤参考试剂盒说明书。使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR, 所用仪器为荧光定量 PCR 仪(QuantStudio Flex, Thermo Scientific), 参考试剂盒说明书进行程序设定。使用 Primer5.0 软件进行引物序列设计, 引物合成由上海生工生物工程有限公司进行。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量, 内参基因为 β -actin。所用引物均经过扩增效率验证, 其中目的基因及 β -actin 内参基因均进行 3 次重复, 本实验所用引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量的引物序列
Tab. 1 Sequences of the primers for real-time PCR

基因名称 target gene	正义序列(5'-3') forward sequence (5'-3')	反义序列(5'-3') reversed sequence (5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature
<i>drp1</i>	CTCGCCAACAGAAACGGAAC	TGGCACTTTGGTCTTCGACA	60
<i>tfam1</i>	GGTCAGACATTTCACTGGGTTG	GCGGCTCTAATGCGTGAAT	60
<i>mfn1b</i>	GTCAACGCTATGCTGAGGGA	TCATCAGAGCCCTCCGTCTT	60
<i>mfn2</i>	TTCCAACGACCCAACACCAA	GTAGGCCCCCAACTGTTCAA	60
<i>Mul1</i>	GCTGCCGTGATACGAGTCAT	ACGTTGGACAAGGACTGGAC	60
<i>atg5</i>	TCAGTCGCTGCCATTAGAGC	TCTCGTCACCTGCGAAAAC	60
<i>pgc-1α</i>	AACCCGACTCTTATCCCTCC	CGTATCAACGCCACAGCAC	60
<i>pgc-1β</i>	GTTCTCCGAACCTCCCAGTG	GCAACACCCCTCCAACATA	60
<i>nrf-1</i>	GCCTTTCCACCTCTGACTG	ACTCTGCTTTCGCTTCC	60
<i>pink1</i>	CTGTGAAAGCCCGGTACACT	TGATGTGGAACCTTTGGGGCA	60
<i>fis1</i>	GTCCCGGGAGTCATCCTTTG	ACAATGAGCTGGTGAAGGGAG	60
β -actin	CAACTGGGATGACATGGAGAAG	TTGGCTTTGGGGTTTCAGG	60

注: *drp1*, 动力蛋白相关蛋白 1; *tfam1* 线粒体转录因子 A; *mfn1b*, 线粒体融合蛋白 1b; *mfn2*, 线粒体融合蛋白 2; *mull*, 线粒体 E3 泛素蛋白连接酶 1; *atg5*, 自噬相关基因 5; *pgc-1 α* , 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子 1 α ; *pgc-1 β* , 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子 1 β ; *nrf-1*, 核呼吸因子 1; *pink1*, PTEN 诱导的激酶 1; *fis1*, 线粒体裂变蛋白 1; β -actin, β -肌动蛋白。

Note: *drp1*, Dynamin-Related Protein 1; *tfam1*, mitochondrial transcription factor A; *mfn1b*, mitofusin1b; *mfn2*, mitofusin2; *mull*, mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1; *atg5*, autophagy related 5; *pgc-1 α* , proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 α ; *pgc-1 β* , proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 β ; *nrf-1*, nuclear respiratory factor 1; *pink1*, PTEN induced putative kinase 1; *fis1*, mitochondrial fission protein 1; β -actin, beta-actin.

1.2.6 线粒体基因组 SNP 分析 收集细胞后, 提取线粒体 DNA。详细步骤: 将细胞在液氮中研磨后, 用 MagPure Bacterial DNA 试剂盒提取线粒体 DNA, 然后用 Qubit dsDNA HS 检测试剂盒检测浓度, 并用 1%琼脂糖凝胶电泳确认 DNA 完整性。进行线粒体 DNA 的测序(由上海生工生物科技有限公司完成), 进一步建立文库, 并分析突变位点。

1.3 数据统计

用 SPSS 23.0 进行方差分析, 使用单因素方差或 *t*-检验进行显著性分析, 数据结果均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 细胞生化

分别使用含葡萄糖浓度为 0、2.5、5、7.5、10、20、30、40、50、60、80、100 mmol/L 的培养液培养细胞 24 h。结果如图 1a 所示, 当葡萄糖浓度为 5 mmol/L 时, 细胞活性最高, 葡萄糖浓度高于 40 mmol/L 后细胞活性开始降低。因此, 后续试验将 5 mmol/L 和 40 mmol/L 的葡萄糖水平分别设为对照组和高糖组。

用 5 mmol/L 和 40 mmol/L 葡萄糖含量培养基

培养细胞 6、12、24、48、72 h。结果如图 1b 所示, 当处理时间为 48 h 时, 细胞活力大于 50% 并小于 70%, 故后续试验处理时间采用 48 h。

5 mmol/L 和 40 mmol/L 葡萄糖含量培养基培

养细胞 48 h 后, 结果如图 2 所示, 高糖组细胞的葡萄糖和糖原含量均显著高于对照组 ($P<0.05$), 上清液谷丙转氨酶、谷草转氨酶活性也显著高于对照组 ($P<0.05$)。

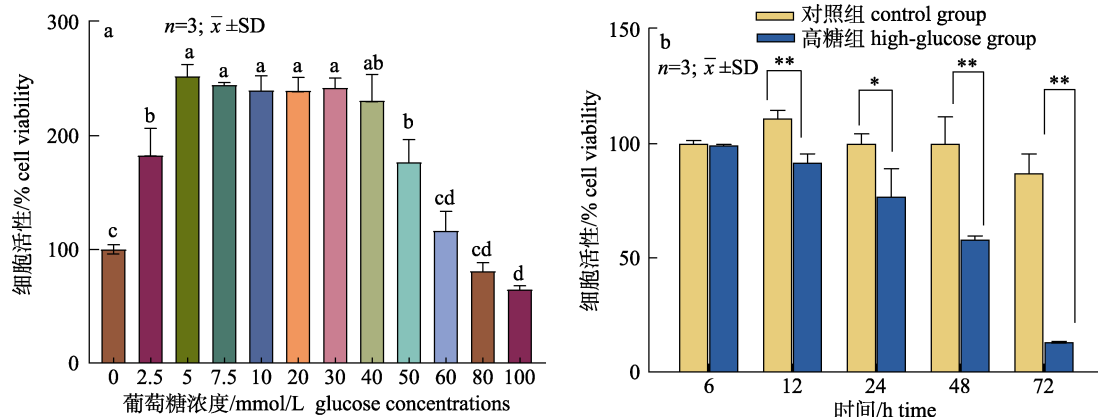


图 1 不同浓度葡萄糖(a)和不同培养时间(b)下花鲈肝细胞的活力

*表示组间差异显著 ($P<0.05$), **表示组间差异极显著 ($P<0.01$).

Fig. 1 Cell viability of *Lateolabrax maculatus* hepatocytes cultured under different concentration of glucose (a) for different time (b)
* indicates significant differences between groups ($P<0.05$); ** indicates extremely significant differences between groups ($P<0.01$).

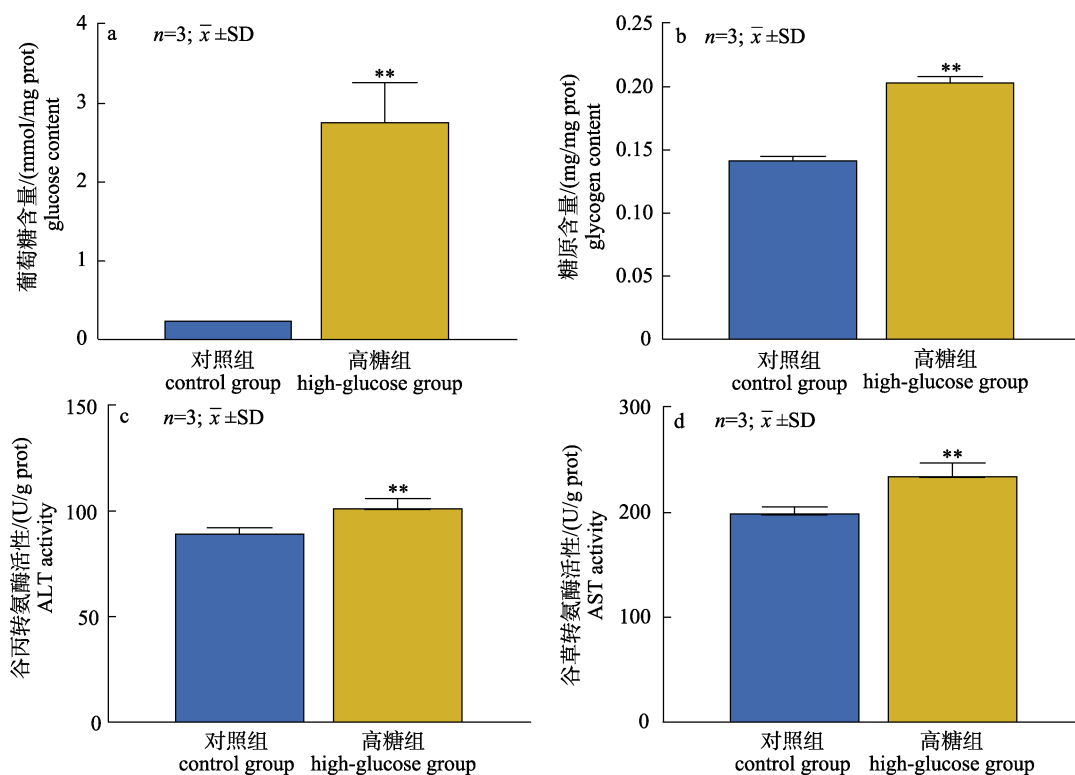


图 2 40 mmol/L 葡萄糖培养花鲈肝细胞 48 h 后细胞中葡萄糖(a)、糖原(b)的含量与
细胞培养上清液谷丙转氨酶(a)、谷草转氨酶(b)的活性

*表示组间差异显著 ($P<0.05$), **表示组间差异极显著 ($P<0.01$).

Fig. 2 Glucose (a) and glycogen (b) concentration in hepatocytes and ALT (c) and AST (d) activities of cell culture supernatant for *Lateolabrax maculatus* after 48 h cultivation in 40 mmol/L glucose
* indicates significant difference between groups ($P<0.05$), ** indicates extremely significant difference between groups ($P<0.01$).

2.2 高糖培养对细胞代谢的影响

三羧酸循环等关键代谢酶的活性, 如图 3 所示。与对照组相比, 高糖组的 HK、CS、IDH、

α -KGDHC、SDH、MDH 活性均显著升高($P<0.05$)。此外, 高糖组细胞内 ATP 的含量显著高于对照组($P<0.05$)。

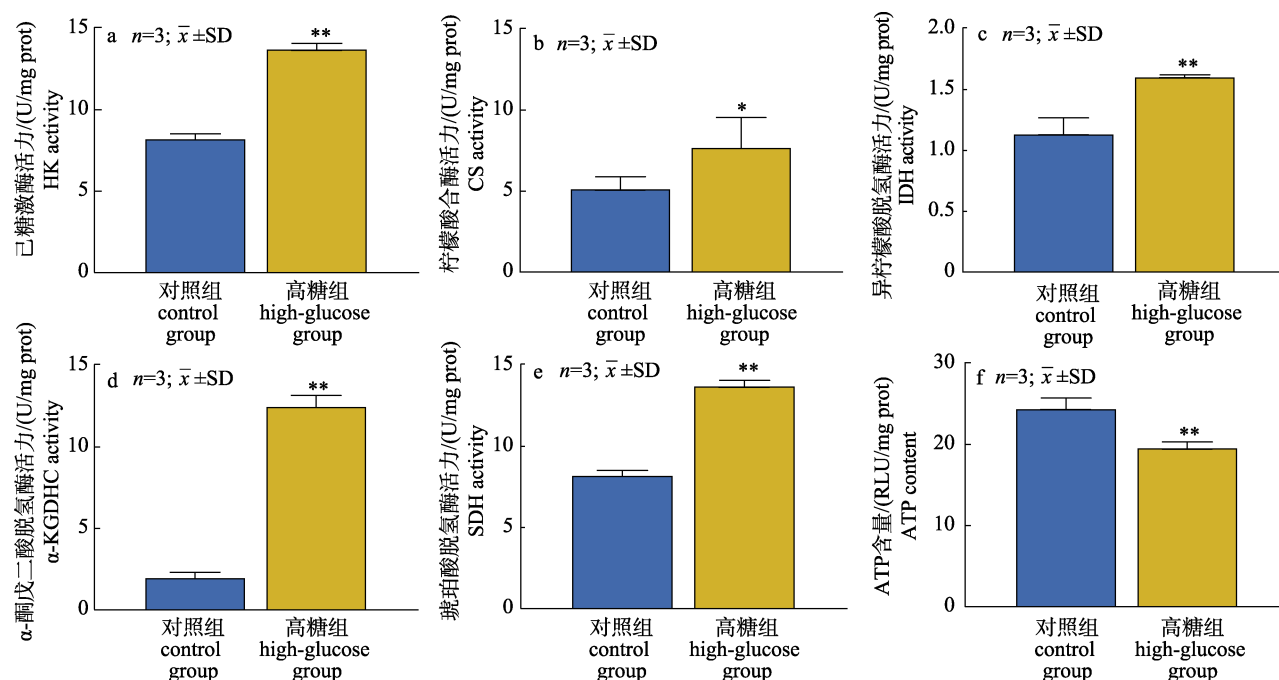


图 3 40 mmol/L 葡萄糖含量培养基培养花鲈肝细胞 48 h 后细胞中代谢酶活性和 ATP 含量

*表示组间差异显著($P<0.05$), **表示组间差异极显著($P<0.01$).

Fig. 3 Activities of cellular metabolizing enzymes and ATP content in hepatocytes of *Lateolabrax maculatus* after 48 h cultivation in 40 mmol/L glucose

* indicates significant difference between groups ($P<0.05$),

** indicates extremely significant difference between groups ($P<0.01$).

2.3 高糖培养对细胞抗氧化的影响

细胞抗氧化相关指标如图 4 所示。与对照组相比, 高糖组丙二醛(MDA)与 ROS 含量均显著上升($P<0.05$), 然而超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性却显著下降($P<0.05$)。

2.4 高糖培养对线粒体形态的影响

线粒体活性染色结果如图 5 显示, 对照组线粒体呈现蓝绿色线状或颗粒小体, 表明线粒体功能完整且活性较强; 高糖组肝细胞线粒体则颜色暗沉, 表明线粒体功能受损且活性较差。细胞超微结构如图 6 显示, 高糖负荷导致肝细胞线粒体结构严重受损, 如嵴损伤、线粒体肿胀、出现自噬泡、空泡化严重。

2.5 高糖培养对线粒体基因表达的影响

线粒体自噬和生物发生基因表达如图 7 所示, 与对照组相比, 高糖培养显著上调了线粒体自噬

相关基因 *pink*、*atg5*、*mull* 的表达, 显著下调了线粒体生物发生基因 *nrf-1*、*pgc-1 α* 、*pgc-1 β* 的表达($P<0.05$)。

2.6 高糖培养对线粒体 DNA 的影响

通过线粒体高通量测序和 SNP 分析, 结果如图 8 所示, 高糖培养下, 与参考序列相比, 线粒体 D-loop 区 16144~16153bp 发生突变, g.16144 T>C, 由对照组的苯丙氨酸(TTT)突变为高糖组的亮氨酸(CTT), 其突变的发生破坏细胞稳态, 影响线粒体功能。

3 讨论

3.1 高糖培养对肝细胞代谢的影响

肝脏是鱼类等动物体内最重要的代谢器官。因此代谢相关研究往往重点关注肝脏^[10]。本研究发现, 当葡萄糖浓度为 5 mmol/L 时细胞活性最高,

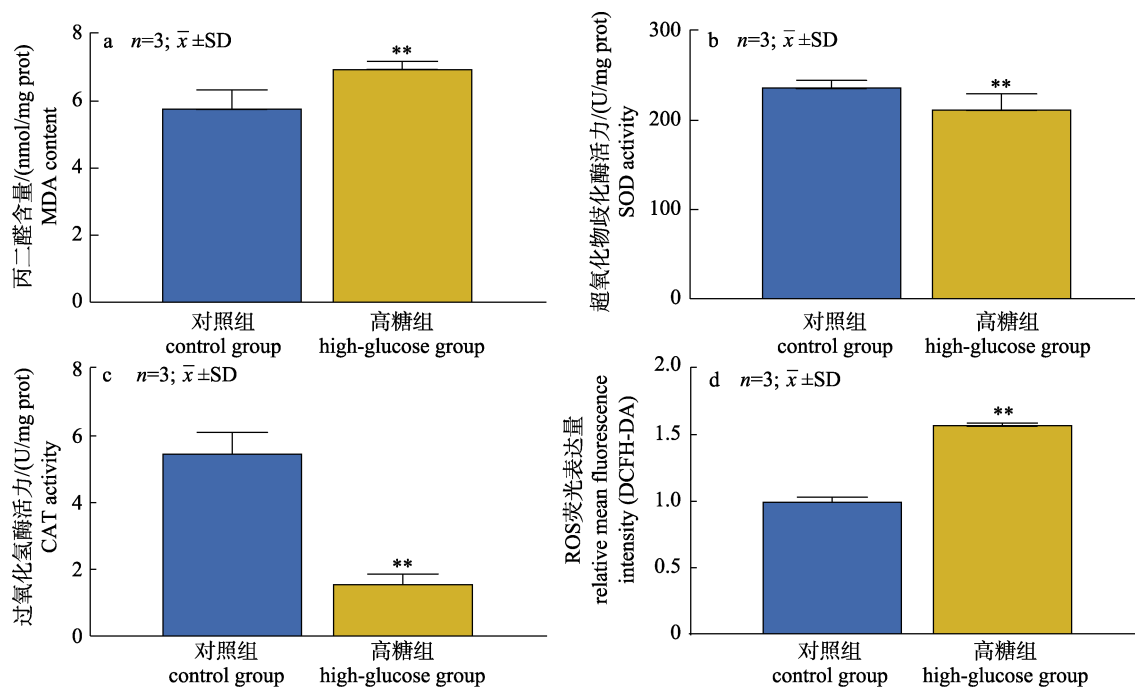


图 4 40 mmol/L 葡萄糖培养花鲈肝细胞 48 h 后细胞中丙二醛含量(a)、超氧化物歧化酶(b)和过氧化氢酶活力(c)、活性氧含量(d)

*表示组间差异显著($P < 0.05$), **表示组间差异极显著($P < 0.01$).

Fig. 4 MDA content (a), SOD activity (b), CAT activity (c), and ROS (d) content in hepatocytes of *Lateolabrax maculatus* after 48 h cultivation in 40 mmol/L glucose

* indicates significant difference between groups ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference between groups ($P < 0.01$).

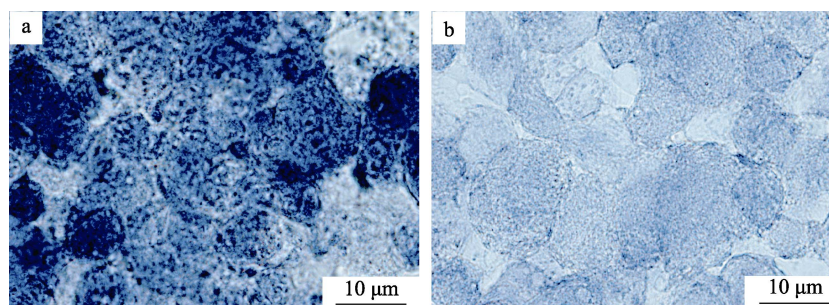


图 5 40 mmol/L 葡萄糖培养基培养花鲈肝细胞 48 h 后线粒体活力染色

a. 对照组; b. 高糖组.

Fig. 5 Mitochondria activity staining for hepatocytes of *Lateolabrax maculatus* after 48 h cultivation in 40 mmol/L glucose
a. Control group, b. High-glucose group.

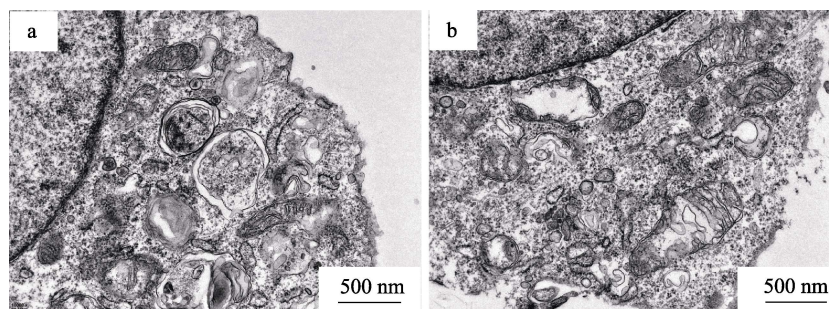


图 6 40 mmol/L 葡萄糖培养基培养花鲈肝细胞 48 h 后细胞超微结构

Fig. 6 Ultrastructural section of hepatocytes for *Lateolabrax maculatus* after 48 h cultivation in 40 mmol/L glucose
a. Control group, b. High-glucose group.

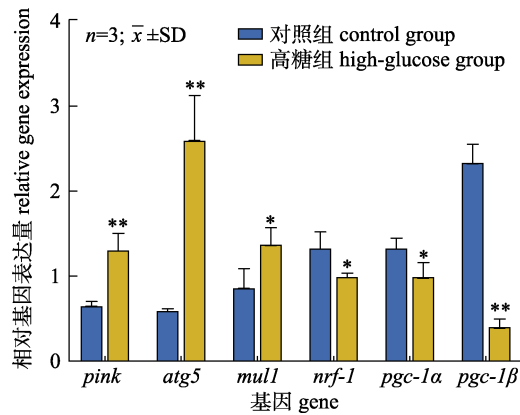


图 7 40 mmol/L 葡萄糖培养基培养花鲈肝细胞 48 h 后线粒体相关基因表达

*表示组间差异显著($P<0.05$), **表示组间差异极显著($P<0.01$).

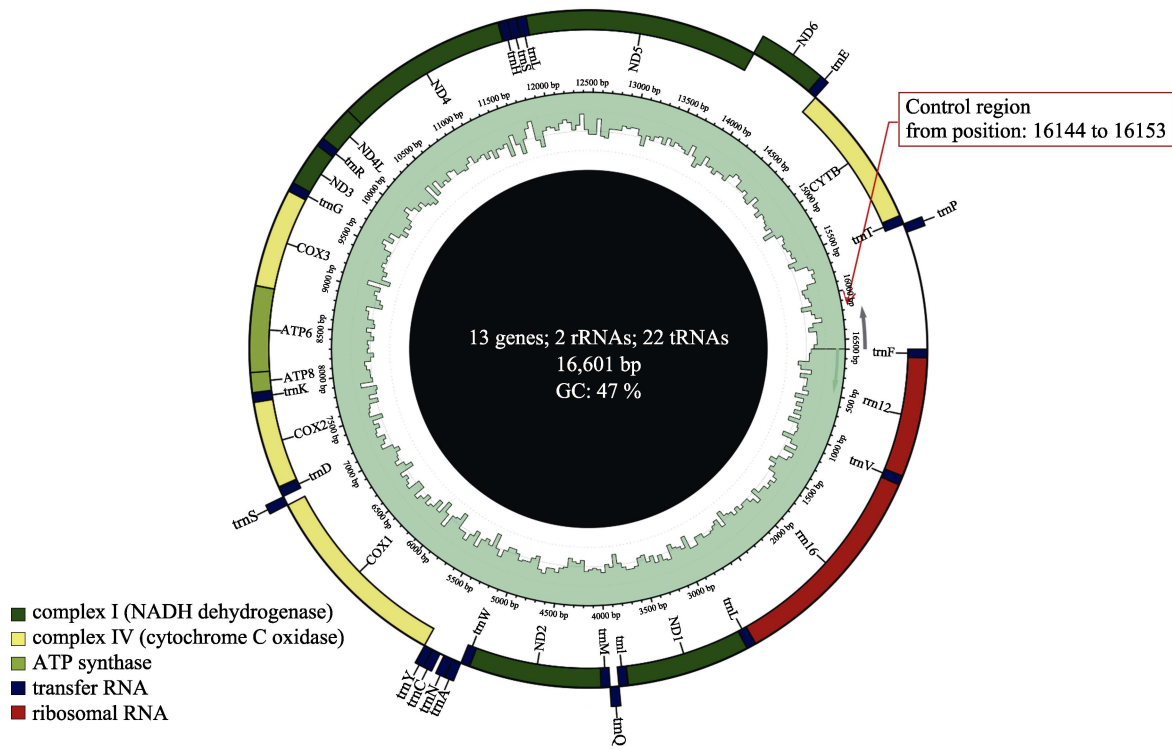
Fig. 7 Mitochondrion-related genes expression in hepatocytes of *Lateolabrax maculatus* after 48 h cultivation in 40 mmol/L glucose
* indicates significant difference between groups ($P<0.05$),
** indicates extremely significant difference between groups ($P<0.01$).

浓度高于 40 mmol/L 后细胞活性开始降低, 据此设定了对照组、高糖组培养基的葡萄糖水平。该结果表明糖对细胞生存的必要性, 也间接说明糖

对鱼类的生长和生存是必需的。

为了维持血糖稳定, 细胞对葡萄糖的吸收能力会随糖的摄入量发生变化^[18]。本研究, 高糖组的葡萄糖和糖原的含量显著上升, 这说明离体肝细胞能摄入培养基的葡萄糖, 且多余的以糖原形式在胞内储存。这与用高糖饲料投喂鱼体得到的结果一致^[10], 说明离体细胞具备与活体细胞相似的糖代谢能力。

肝脏的各类酶是鱼体生理代谢发生的催化基础^[10], 为进一步探究高糖负荷下的糖代谢特征, 对糖酵解和三羧酸循环过程中的关键酶进行活性检测。高糖培养下己糖激酶、柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶活性均显著升高。己糖激酶是糖酵解的关键限速酶, 本研究结果也说明己糖激酶会随糖摄入量的增加而活性上升, 鱼类对糖的利用能力具有后天可塑性。柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶等是三羧酸循环过程的重要酶^[19-20], 它们的活性增加说明更多的糖进入了三羧酸循环。这些酶的活性变化进一步说



明,肝细胞为维持稳态加快了葡萄糖的分解代谢。本研究中高糖处理下细胞内 ATP 含量呈现与上述代谢酶相反的变化趋势。这可能是由于细胞内的 ATP 主要在位于线粒体内膜的线粒体呼吸链中生成,而高糖处理可能损伤了线粒体呼吸链功能,从而抑制 ATP 的合成^[21]。谷丙转氨酶和谷草转氨酶是重要的肝脏胞内酶^[22]。本研究中高糖负荷组的细胞培养基上清液中谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性显著升高,表明肝细胞发生损伤。

抗氧化指标能够反映机体的健康状态, SOD、CAT 是清除细胞自由基的主要抗氧化酶^[23]。MDA 是脂质过氧化物,是氧化应激的生物学标志物之一^[24]。本研究中,高糖负荷下肝细胞 SOD 和 CAT 活性显著下降,且 MDA 含量显著升高,表明细胞发生了氧化应激。ROS 的过度生成是发生氧化应激的诱因^[25]。已有研究表明,过高的游离葡萄糖水平是 ROS 形成的重要刺激因素^[26]。

在细胞中,ROS 的主要产生部位是线粒体呼吸链^[27]。当线粒体呼吸链功能失调时,大量从中泄露的电子会结合氧气等分子产生多种形式的活性氧。本研究中,高糖培养抑制了 ATP 的生成,并且促进了 ROS 的生成,这表明过量的葡萄糖导致线粒体呼吸链功能发生紊乱。

3.2 高糖培养对肝细胞线粒体的影响

作为高度动态的细胞器,线粒体不断地进行清除与再生,以维持其代谢功能的稳定^[28]。在人类上的研究表明,糖尿病的发生发展与线粒体损伤密切相关,一些并发症均与线粒体损伤有关^[29]。而鱼类肝细胞的线粒体数量比哺乳动物更少^[30],线粒体的代谢负担更大,更容易损伤。

PINK1/Parkin 是线粒体自噬的重要通路,PGC-1 α 、PGC-1 β 则是线粒体生成的关键调控因子^[31]。本研究发现,高糖上调了自噬基因的表达,下调了生成基因的表达。这表明,高糖会促进线粒体自噬、抑制再生。这可能会导致细胞内线粒体数量的减少,使之代谢负担加重、更容易发生损伤。

线粒体 DNA 中的 D-Loop 区易受脂质过氧化物和 ROS 的损伤^[32]。本实验对线粒体基因组测序结果显示,高糖组的线粒体 D-Loop 区基因发生突变,即 *g.16144 T>C*;突变可能会改变该区域对

参与促进线粒体 DNA 复制的转录物的亲和力^[33]。因此, D-Loop 突变直接影响线粒体 DNA 的复制、转录和蛋白质翻译,不可避免地影响线粒体的功能稳定性^[34],并对线粒体氧化磷酸化系统造成损害,导致氧化应激加重线粒体的永久损伤^[35-36]。

4 结论

综上所述,花鲈离体肝细胞在应对高糖负荷时会表现与活体相似的生理反应,可作为研究鱼类糖代谢的研究平台。高糖培养会导致肝细胞代谢酶活性的增加,导致肝细胞与线粒体的损伤,这可能与 ROS 积累导致的氧化应激有关。对线粒体相关基因表达进行分析发现,高糖上调了线粒体自噬相关基因的表达、下调了线粒体生成相关基因的表达,这会导致细胞内线粒体数量的降低。此外,高糖负荷下线粒体 D-Loop 区基因发生突变,从而影响线粒体的结构与功能稳定性。

参考文献:

- [1] Kamalam B S, Medale F, Panserat S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies[J]. *Aquaculture*, 2017, 467(1-2): 3-27.
- [2] Doaei S, Gholamalizadeh M, Akbari M E, et al. Dietary carbohydrate promotes cell survival in cancer via the up-regulation of fat mass and obesity-associated gene expression level[J]. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 2019, 26(2): 8-17.
- [3] Lin S M, Shi C M, Mu M M, et al. Effect of high dietary starch levels on growth, hepatic glucose metabolism, oxidative status and immune response of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78(7): 121-126.
- [4] Trejo-Escamilla I, López L M, Gisbert E, et al. Soybean protein concentrate as a protein source for totoaba (*Totoaba macdonaldi*) juveniles: Effect on intermediary metabolism and liver histological organization[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2021, 262: 111062.
- [5] Satiro T M, Carli G C, de Arruda Amorim J P, et al. Dietary β -glucan ameliorates metabolic stress caused by a high dietary carbohydrate level in Nile tilapia[J]. *Aquaculture*, 2024, 579(2): 740186.

- [6] Guo W, Fu L L, Wu Y Y, et al. Effects of dietary starch levels on growth, feed utilization, glucose and lipid metabolism in non-transgenic and transgenic juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Israeli Journal of Aquaculture, 2021, 73(5): 1-15.
- [7] Zhang X S, Jin M, Luo J X, et al. Effects of dietary carbohydrate levels on the growth and glucose metabolism of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. Aquaculture Nutrition, 2022, 2022(1): 7110052.
- [8] Sheng Q F, Xiao X W, Prasad K, et al. Autophagy protects pancreatic beta cell mass and function in the setting of a high-fat and high-glucose diet[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 16348.
- [9] Satpathy B B, Ray A K. Effect of dietary protein and carbohydrate levels on growth, nutrient utilization and body composition in fingerling rohu, *Labeo rohita* (Hamilton)[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2009, 25(6): 728-733.
- [10] Li S L, Li Z Q, Zhang J C, et al. The impacts of dietary carbohydrate levels on growth performance, feed utilization, glycogen accumulation and hepatic glucose metabolism in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)[J]. Aquaculture, 2019, 512: 734351.
- [11] Shi C M, Jiang Y, Zhong Y F, et al. Effects of dietary fiber sources on growth, plasma biochemical indexes, intestinal antioxidant capacity and histology of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(12): 2485-2493. [石朝明, 蒋余, 钟云飞, 等. 饲料纤维源对大口黑鲈生长、血浆生化指标、肠道抗氧化能力和组织学的影响[J]. 水产学报, 2019, 43(12): 2485-2493.]
- [12] Ma H N, Zhou P P, Lu Y, et al. Effects of different lipid and glucose levels on growth performance, hepatic glycolysis and gluconeogenic key enzyme activities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea* Richardson)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(10): 3110-3122. [马红娜, 周飘苹, 陆游, 等. 不同脂肪和葡萄糖水平对大黄鱼生长性能、肝脏糖酵解和糖异生关键酶活性的影响[J]. 动物营养学报, 2016, 28(10): 3110-3122.]
- [13] Topal A, Özdemir S, Arslan H, et al. How does elevated water temperature affect fish brain? (a neurophysiological and experimental study: Assessment of brain derived neurotrophic factor, cFOS, apoptotic genes, heat shock genes, ER-stress genes and oxidative stress genes)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 115(8): 198-204.
- [14] Zhang X R, Zhang Y, Chen P, et al. Spotted seabass, *Lateolabrax maculatus* can utilize the high-starch diet by effectively regulating the energy metabolism[J]. Aquaculture, 2021, 543: 736948.
- [15] Zheng L Z, Wang Z Z, Zhang B, et al. Effects of high dietary carbohydrate levels on growth performance, enzyme activities, expression of genes related to liver glucose metabolism, and the intestinal microbiota of *Lateolabrax maculatus* juveniles[J]. Fishes, 2023, 8(9): 431.
- [16] Zhang W, Liu K, Tan B P, et al. Transcriptome, enzyme activity and histopathology analysis reveal the effects of dietary carbohydrate on glycometabolism in juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. Aquaculture, 2019, 504(7): 39-51.
- [17] Dong Y Z, Li L, Espe M, et al. Hydroxytyrosol attenuates hepatic fat accumulation via activating mitochondrial biogenesis and autophagy through the AMPK pathway[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(35): 9377-9386.
- [18] Zhu J, Pan J, Wang X, et al. Alleviation of the adverse effect of dietary carbohydrate by supplementation of myo-inositol to the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Animals, 2020, 10(11): Article No.2190.
- [19] Administrative Department for Fisheries the Ministry for Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fisheries Statistic Yearbook 2023[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.]
- [20] Ma H J, Mou M M, Pu D C, et al. Effect of dietary starch level on growth, metabolism enzyme and oxidative status of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. Aquaculture, 2019, 498(1): 482-487.
- [21] Zhang Q J, Chen Y S, Xu W B, et al. Effects of dietary carbohydrate level on growth performance, innate immunity, antioxidant ability and hypoxia resistant of brook trout *Salvelinus fontinalis*[J]. Aquaculture Nutrition, 2021, 27(1): 297-311.
- [22] Topić Popović N, Čizmek L, Babić S, et al. Fish liver damage related to the wastewater treatment plant effluents[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2023, 30(17): 48739-48768.
- [23] Zhan Q Y, Han T, Li X Y, et al. Effects of dietary carbohydrate levels on growth, body composition, and gene expression of key enzymes involved in hepatopancreas metabolism in mud crab *Scylla paramamosain*[J]. Aquaculture, 2020, 529(16): 735638.

- [24] Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N. Mitochondrial proteins: From biogenesis to functional networks[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(5): 267-284.
- [25] Chang X L, Wang X F, Feng J C, et al. Impact of chronic exposure to trichlorfon on intestinal barrier, oxidative stress, inflammatory response and intestinal microbiome in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 259(4): 113846.
- [26] Jin M, Pan T T, Cheng X, et al. Effects of supplemental dietary l-carnitine and bile acids on growth performance, antioxidant and immune ability, histopathological changes and inflammatory response in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) fed high-fat diet[J]. *Aquaculture*, 2019, 504(7): 199-209.
- [27] Fan J J, Tang X H, Bai J J, et al. Pyruvate kinase genes in grass carp *Ctenopharyngodon idella*: Molecular characterization, expression patterns, and effects of dietary carbohydrate levels[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(6): 1919-1931.
- [28] Li R X, Liu H Y, Li S Y, et al. Nutritional regulation of gene expression and enzyme activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the hepatic gluconeogenesis pathway in golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *Aquaculture Research*, 2019, 50(2): 634-643.
- [29] Toi P L, Anothaisintawee T, Chaikledkaew U, et al. Preventive role of diet interventions and dietary factors in type 2 diabetes mellitus: An umbrella review[J]. *Nutrients*, 2020, 12(9): Article No.2722.
- [30] Liu J H, Deng K Y, Pan M Z, et al. Dietary carbohydrates influence muscle texture of olive flounder *Paralichthys olivaceus* through impacting mitochondria function and metabolism of glycogen and protein[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): Article No.21811.
- [31] Brinza D, Chen R, Schageman J J, et al. Computational methods for detection of somatic mutations at 0.05% frequency from cfDNA using molecular tagging and high-throughput multiplex next-generation sequencing[J]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2016, 18(6): 995.
- [32] Yadav N, Chandra D. Mitochondrial DNA mutations and breast tumorigenesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1836(2): 336-344.
- [33] Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology?[J]. *Advances in Mitochondrial Medicine*, 2011, 942(12): 93-136.
- [34] de Vitto H, B Mendonca B S, Elseth K M, et al. Mitochondrial mutational status of high nitric oxide adapted cell line BT-20 (BT-20-HNO) as it relates to human primary breast tumors[J]. *Tumor Biology*, 2013, 34(1): 337-347.
- [35] Tipiriseti N R, Govatati S, Pullari P, et al. Mitochondrial control region alterations and breast cancer risk: A study in South Indian population[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85363.
- [36] Imanishi H, Hattori K, Wada R, et al. Mitochondrial DNA mutations regulate metastasis of human breast cancer cells[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(8): e23401.

Effects of high-glucose load on energy metabolism and mitochondrial function of hepatocytes from spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*)

REN Huijuan, KE Yixiong, LU Kangle, LI Xueshan, WANG Ling, SONG Kai, ZHANG Chunxiao

State Key Laboratory of Mariculture Breeding, Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract: This study aimed to investigate the metabolic characteristics of hepatocytes under a high-glucose load in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). The liver cell line of *L. maculatus* was cultured, and two experimental groups were established. The cells from the control group were cultured in a medium containing 5 mmol/L glucose, whereas a medium containing 40 mmol/L glucose was used for the high-glucose group. After 48 h of culture, the cells and supernatants were collected and analyzed. Results showed that the glucose and glycogen contents in the high-glucose group were significantly increased ($P < 0.05$). The activities of hexokinase (HK), citrate synthase (CS), α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDHC), isocitrate dehydrogenase (IDH), and succinate dehydrogenase (SDH) increased significantly ($P < 0.05$). These results indicate that a high-glucose load accelerates glycolysis and the tricarboxylic acid cycle in hepatocytes. In addition, the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the supernatant increased with high-glucose culture ($P < 0.05$), indicating that high-glucose can cause hepatocyte damage. In the high-glucose group, the ATP content of hepatocytes significantly decreased ($P < 0.05$). The content of reactive oxygen species (ROS) and MDA was significantly increased ($P < 0.05$). Furthermore, the high-glucose culture upregulated the expressions of mitochondrial autophagy-related genes (*pink*, *atg5*, and *mull*) and down-regulated the expressions of mitochondrial biogenesis-related genes (*nrf-1*, *pgc-1 α* , and *pgc-1 β*) ($P < 0.05$). Sequencing of the mitochondrial genome showed that mitochondrial D-loop genes were mutated under a high-glucose load treatment. In conclusion, *in vitro* hepatocytes of sea bass showed similar physiological responses to those *in vivo* when they responded to high-glucose loads. Thus, *in vitro* hepatocytes could be used as a research platform to study glucose metabolism in fish. High-glucose cultures can lead to increased metabolic enzyme activity in hepatocytes, damaging hepatocytes and mitochondria. This is related to the oxidative stress caused by ROS accumulation. The high-glucose load upregulated the expression of mitochondrial autophagy-related genes and downregulated the expression of mitochondrial generation-related genes, decreasing the number of mitochondria in the cell. Mutations in the mitochondrial D-loop gene occur under a high-glucose load, affecting the structural stability of the mitochondria.

Key words: *Lateolabrax maculatus*; *in vitro* hepatocyte; high-glucose load; mitochondrial function; glycometabolism

Corresponding author: LU Kangle. E-mail: lukangle@jmu.edu.cn