

·研究简报·

用流式细胞术检测噻乙醇诱导的鲤肝细胞凋亡

汪开毓, 耿毅, 黄小丽

(四川农业大学 鱼病研究中心, 四川 雅安 625014)

摘要:采用含 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 噻乙醇的饲料连续饲喂鲤鱼 (*Cyprinus carpio* Linnaeus), 分别于饲喂后的第7天、14天、20天、25天和第30天各剖杀4尾鱼, 取肝组织, 用流式细胞仪检测其细胞凋亡程度。结果显示, 在肝细胞DNA直方图中, 于G1峰之前出现一AP峰, 且AP峰峰值随染毒时间的延长而升高, 肝细胞在不同时期的凋亡率与染毒时间呈正相关。在经噻乙醇染毒第7天, 鲤肝细胞的凋亡率平均值为2.05%, 而对照组为1.70%, 两组间差异不显著 ($P > 0.05$); 在第14天, 可见轻微的AP峰; 在第20天, 凋亡率达到9.49%, 凋亡峰已较明显; 在第25天时的AP峰比第14天时峰值明显升高; 在染毒第30天时, 凋亡率达17.44%, AP峰明显可见, 其肝细胞凋亡率与第7天、第14天和第25天时差异显著。在整个过程中, 对照组的正常G1峰前几乎看不出有AP峰存在。在实验组内, 不同染毒时间, 实验各组的肝细胞凋亡率差异显著, 对照组内差异不显著。

关键词:流式细胞术; 噻乙醇; 细胞凋亡

中图分类号: Q27 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)05-0648-04

细胞凋亡 (Apoptosis) 是1972年由Kree等^[1]首先提出。它是一种不同于细胞坏死的由基因控制的细胞自杀性死亡过程, 为细胞的一种生理性死亡形式, 又称为程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD)。机体通过细胞凋亡的形式维持正常的生长、发育、衰老和死亡。在形态上调亡细胞主要表现为细胞缩小、变形, 细胞核的染色质固缩, 边移, 聚集在核膜下, 进而核发生裂解, 其碎片连同细胞器一起由双层膜性结构包裹以出芽方式排出, 形成膜性结构完整的凋亡小体 (apoptosis body)。目前对细胞凋亡的检测方法较多, 其中流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 是近年来广泛使用的一种先进的细胞多参数分析仪器法, 具快速、准确、灵敏并能同时进行多种因素分析等特点。在凋亡细胞的DNA直方图中, 于正常G1峰前出现一亚峰 (AP峰), AP峰的大小直接体现了凋亡率的多少。由于对凋亡检测具有定性又定量的优点, 因而作为一种便捷的研究手段被广泛地用于细胞凋亡的检测中^[2]。

噻乙醇是一种抗菌促生长剂。研究表明, 噻乙醇具有蓄积毒性和诱变性。噻乙醇是否可诱导细胞凋亡, 目前尚无报道。本实验用噻乙醇对鲤鱼进行染毒, 采用流式细胞术对染毒后的鲤肝细胞进行细胞凋亡的检测, 以探讨噻乙醇对鲤鱼的毒性作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验鱼与日粮

取无噻乙醇接触史的健康鲤鱼 (*Cyprinus carpio* Linnaeus) 60尾, 体重 $(60 \pm 5) \text{ g}$, 体长 $(12 \pm 1) \text{ cm}$, 购于雅安市鱼种站; 日粮配方设计参照《NRC鱼的营养需要》^[3] 和《水产动物营养与饲料学》^[4], 饲料颗粒直径 $2.5 \sim 3.0 \text{ mm}$ 。

1.2 主要试剂与仪器

噻乙醇, 江苏南通醋酸化工厂兽药分厂生产, 纯度98%, 批号971205; 流式细胞仪, 美国ELITE ESP COUNTER。

1.3 方法

1.3.1 饲养管理 采用水族箱饲养, 24 h连续增氧; 水源为经曝气去氯处理后的自来水, 其pH值为6.8~7.2, 水温 $25 \sim 28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 溶氧 $8 \sim 12 \text{ mg/L}$; 其他指标符合渔业水质标准 (GB11607-89)。

1.3.2 实验染毒 实验鱼60尾, 随机分成2组, 对照组20尾, 实验组40尾, 以 200 mg/kg 饲料的噻乙醇剂量并料连续饲喂实验组鱼进行染毒, 分别于染毒后的第7天、14天、20天、25天和第30天剖杀4尾鱼取肝组织进行细胞凋亡检测。

收稿日期: 2004-11-01; 修订日期: 2005-01-25。

基金项目: 四川省学术带头人后备基金 [川人专 (1999)-6]。

作者简介: 汪开毓, 男 (1955-), 教授, 博士, 主要从事水生动物病理学和药理学研究。E-mail: kywang@sicau.edu.cn

1.3.3 流式细胞仪(FCM)检测

(1)取鲤肝组织,切成1 mm²大小的碎块,用0.5%的Triton-100裂解组织,将其消化成单细胞。

(2)将消化的细胞悬液于500~1 000 r/min离心5 min,弃去上清液,PBS洗1次。

(3)离心去PBS,加入70%的冷乙醇固定,4℃,过夜。

(4)离心弃去固定液,用PBS重悬5 min。

(5)400目筛网过滤1次,500~1 000 r/min离心5 min,弃PBS。

(6)用碘化丙啶(PI)染色液进行染色,4℃,避光染色15 min以上,染色后的细胞悬液经70 μm孔径的滤网过滤,调整细胞浓度到1×10⁶/mL,上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2 结果与分析

流式细胞仪分析结果显示,肝细胞DNA直方图(图1)出现G1峰之前的特异的亚G1峰(又称AP峰)。鲤鱼在经

噻乙醇染毒第7天,凋亡率的平均值仅为2.05%,而对照组为1.70%,两组间差异不显著($P>0.05$),因此在DNA直方图上凋亡峰不明显;在第14天,可见轻微的AP峰(图1),此时肝细胞的凋亡率平均值为6.25%,是第7天凋亡率的3倍多;在第20天,凋亡率达到9.49%,凋亡峰已较明显;在第25天,可见正常的G1峰前有一明显的AP峰,比第14天时的AP峰值明显升高(图2),且凋亡率也达13.31%与第7天和第14天时的凋亡率相比呈差异极显著($P<0.01$);在染毒第30天时,凋亡率达17.44%,可见凋亡峰值超过了正常G1峰的1/2,比在第14天时见到的AP峰更为明显(图3),而且此时的肝细胞凋亡率与第7天、第14天和第25天比较,差异极显著,与第7天时的凋亡率相比已上升了近8倍。在整个过程中,对照组的正常G1峰前几乎看不出有AP峰存在(图4),数据分析显示,该组在不同时间检测的肝细胞凋亡差异不显著,凋亡保持平稳。在染毒后第7天、14天、20天、25天和30天的细胞凋亡率与对照组细胞凋亡率见表1。

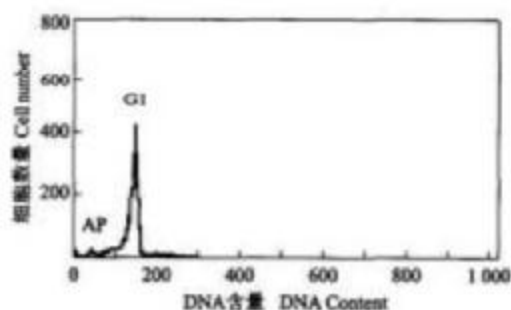


图1 染毒14 d肝细胞凋亡的DNA直方图
Fig.1 Histogram of DNA content and apoptosis induced by olaquinox for 14 d

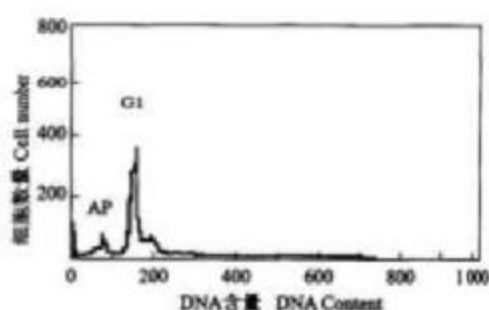


图2 染毒25 d肝细胞凋亡的DNA直方图
Fig.2 Histogram of DNA content and apoptosis in hepatic cell induced by olaquinox for 25 d

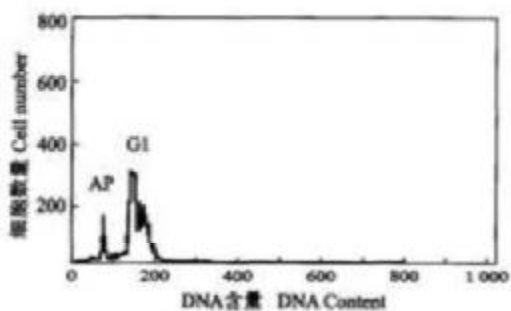


图3 染毒30 d肝细胞凋亡的DNA直方图
Fig.3 Histogram of DNA content and apoptosis in hepatic cell induced by olaquinox for 30 d

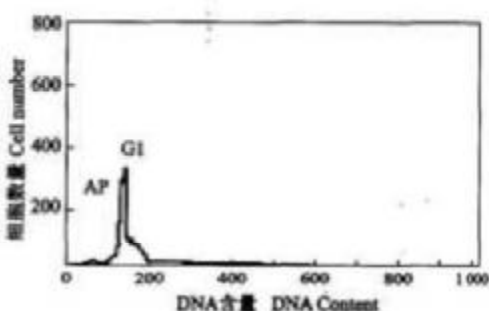


图4 对照组肝细胞凋亡的DNA直方图(对照)
Fig.4 Histogram of DNA content and apoptosis in normal hepatic cell (control)

表1 噻乙醇诱导鲤鱼肝细胞不同时期的凋亡率

Tab.1 Apoptosis rate of carp liver cell induced by olaquindox during different period

组别 Group	时间/d Time	样本号 Sample No.				$\bar{X} \pm SD$
		1	2	3	4	
实验组 Trial	7	1.84	2.31	1.95	2.11	2.05 ± 0.10^B
	14	6.12	7.14	5.28	6.47	6.25 ± 0.39^D
	20	9.45	8.67	10.61	9.21	9.49 ± 0.41^C
	25	12.42	14.07	13.85	12.90	13.31 ± 0.39^B
	30	17.29	18.54	17.27	16.76	17.44 ± 0.39^A
对照组 Control	7	1.92	1.41	1.37	1.81	1.70 ± 0.11^E
	14	1.83	1.54	2.03	1.87	1.82 ± 0.10^E
	20	2.18	1.76	1.79	1.86	1.90 ± 0.10^E
	25	1.95	1.94	1.52	1.68	1.77 ± 0.11^E
	30	1.99	1.83	1.62	1.78	1.81 ± 0.08^E

注:有相同字母者,表示组间差异不显著;无相同字母者,表示组间差异显著;其中大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: The same letter means the difference is not distinct, while if not, it means the difference is distinct (the capitalization for $P < 0.01$, the lowercase for $P < 0.05$).

3 讨论

凋亡细胞 DNA 降解,非常特异,所产生不同长度的 DNA 片段均为 180~200 bp 的整数倍,这正好是缠绕组蛋白多聚体的长度,表明染色质 DNA 恰好是在核小体与核小体的连接部位被切断,产生不同长度的寡聚核小体片段,其 DNA 琼脂糖凝胶电泳呈特征性“梯状(ladder)”条带^[5]。与坏死(necrosis)不同,凋亡细胞在形态上表现为细胞缩小、胞浆浓缩、核固缩、裂解、质膜内陷、包裹一部分断裂 DNA 及一些细胞器后与细胞体脱离,形成胞膜完整的凋亡小体。凋亡细胞所表现的这些特征可通过电子显微镜、琼脂糖凝胶电泳、原位末端标记、流式细胞术等方法来检测。其中流式细胞术(FCM)是利用流式细胞仪和计算机连接,在操作者的指挥下按一定程序可自动完成对细胞标本的分选或分析工作,是近年来用于研究细胞凋亡的常用方法,是近代细胞生物学、分子生物学、分子免疫学和单克隆抗体技术、激光、电子计算机等学科高度发展的综合结晶。FCM 由光源系统、气控单细胞层流系统和光检测系统构成。其原理是通过激光照射单细胞,其瞬产生的散射光和荧光被接受转换成电信号。散射光又包括了前散射光(FLS)和侧散射光(90°CLS)。FLS 可分析细胞直径大小,90°CLS 可分析细胞表面形态、胞内颗粒大小、多少及分布状态^[6]。当细胞用乙醇 TrionX-100 固定后,断裂的 DNA 小片段释放出来,其细胞内只有残留的大片段 DNA,此时凋亡细胞 DNA 含量低于正常细胞的二倍体。用 DNA 结合荧光染料碘化丙啶(PI)染色后,通过 FCM 检测,荧光染料激发出的可测荧光将此转换成电信号送至计算机处理以获得大量的细胞信息,可在正常 G1 峰前出现一“亚 G1 峰”即 AP 峰。AP 峰值的大小即代表了凋亡细胞的多少。

由流式细胞仪检测结果可以看出,在染毒后 7 d,其凋亡率平均值为 2.05%,与对照组的凋亡率(1.70%)接近,差异不显著,故此时的凋亡峰不明显。随着时间的延长,到第 14 天时,实验组的凋亡率平均值已达 6.25%,比第 7 天时增加了 3 倍多,因此在 DNA 直方图上出现了较明显的凋亡峰。随着染毒时间的进一步延长,细胞凋亡出现的频率也逐渐升高,到染毒后第 25 天,凋亡率平均值在第 7 天的基础上增加了 6 倍,达到 13.31%,与第 7、14 和 20 天的凋亡率呈显著差异, DNA 直方图上也出现了明显的凋亡峰。到第 30 天,凋亡率达到各实验组的最高值,即 17.44%,是同时期对照组凋亡率的近 10 倍,与实验组其他时间的凋亡率相比差异极显著,因此在 DNA 直方图上出现一极明显的凋亡峰,与第 14 天相比峰值明显升高。从表 1 可以看出,实验组的凋亡率整体上比对照组高,实验组各组间随着时间的延长凋亡率升高,且各组间差异明显。对照组在整个过程中凋亡率较低,且保持了相对较恒定的水平,组间差异不显著。

噻乙醇(olaquindox)是氧化噻恶啉类药物,为一种化学合成抗菌促生长剂,具有良好的广谱抗菌作用和提高饲料转化率、促进生长的作用,曾被广泛添加于水产饲料中,以促进多种水产养殖动物的生长发育。但近年来研究发现,噻乙醇具有中等至明显的蓄积毒性^[7]、遗传毒性和诱变毒性,可导致体内 SOD 活性下降^[8],引起体内各脏器的变性、坏死^[9],并可导致染色体畸变^[10]。因而噻乙醇可能从以下几个方面诱导肝细胞凋亡:(1)体内存在一相当精细的凋亡检测系统以感知 DNA 的损伤,随着噻乙醇染毒时间的延长,染色体出现畸变,从而被该检测系统识别,机体则通过凋亡的方式来清除畸变细胞,以维持机体细胞正常形态。(2)体内代谢产生的活性氧(ROS)如 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、OH 等可明显诱导细胞凋亡,而 SOD 是存在于正常机体内的抗氧化物质之一,噻乙醇

可使鱼体SOD活性下降,造成体内ROS水平升高,进一步诱导了细胞凋亡的形成。(3)根据本实验结果可以看出,在染毒初期,机体受到的影响不大,而随着染毒时间的延长,凋亡率也逐渐增加。另据报道,当噻乙醇染毒鲤鱼后也可使其肝细胞由最初的轻度颗粒变性到后来的脂肪变性或水泡变性,最终发展到局灶性坏死^[11],因而噻乙醇可能在诱导肝细胞凋亡的同时也引起部分肝细胞的变性、坏死,从而通过细胞凋亡和细胞坏死两种细胞死亡方式实现对肝脏的损伤,而这种损伤又进一步影响到肝脏对噻乙醇的代谢,引起噻乙醇的蓄积增加,从而表现出蓄积毒性和全身组织器官的严重病变。

参考文献:

- [1] Kne J G R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics[J]. *Br J Cancer*, 1972(26):239.
- [2] 马学愚. 流式细胞术及其在动物病理学研究中的应用[J]. *动物医学进展*, 2001, 22(4):1-3.
- [3] 曹虹. 鱼类营养需要(NRC 1993年版)[M]. 北京:中国农业出版社, 1993. 70-71.
- [4] 李爱杰. 水生动物营养与饲料学[M]. 北京:中国农业出版社, 1996. 8-84.
- [5] 张平夏. 细胞程序性死亡与细胞发育[J]. *国外免疫学*, 1998, 16(3):136-140.
- [6] 胡野, 凌志强, 单小云. 细胞凋亡的分子医学[M]. 北京:军事科学出版社, 2002. 497.
- [7] 徐士新. 噻乙醇蓄积毒性实验[J]. *中国兽药杂志*, 1992, 26(2):22-24.
- [8] 汪开毓, 耿毅. 鲤亚急性噻乙醇中毒的血生化指标研究[J]. *水生生物学*, 2003, 27(1):23-26.
- [9] 汪开毓, 耿毅. 鲤鱼急性噻乙醇中毒的病理学研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2002, 33(6):565-569.
- [10] 王树槐. 噻乙醇诱发CHL细胞染色体畸变实验[J]. *中国兽药杂志*, 1993, 27(4):27-29.
- [11] 汪开毓, 耿毅, 叶仕根, 等. 鲤亚噻乙醇慢性中毒的病理学和组织残留[J]. *水产学报*, 2003, 27(1):75-82.

Apoptosis of hepatic cell in common carp poisoned with olaquinox by flow cytometry (FCM)

WANG Kai-yu, GENG Yi, HUANG Xiao-li

(Research Center of Fish Diseases, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The fish was fed with food included 200 mg/kg diet olaquinox. Four fish were dissected each time to observe the apoptosis of the hepatic cell by flow cytometry on 7th day, 14th day, 20th day, 25th day and 30th day after being poisoned. The results showed that olaquinox could induce the apoptosis of the hepatic cell in common carp. The AP peaks before the G1 peaks were shown in DNA graphs. Furthermore, the percentage of the apoptosis increased with the time delayed. At the same time, the percentage of carp hepatic cell apoptosis was got using flow cytometry and it was positive-correlation to the time of being poisoned. The average percentage of hepatic cell apoptosis was 2.05% after the carp was poisoned for 7 days. However, it was 1.70% in the control. The difference was not significant ($P > 0.05$), so the AP peak was not distinct yet. A slight AP peak on the 14th day was got and it was clear on the 20th day, and the percentage of apoptosis reached 9.49%. The AP peak was much higher on the 25th day than on the 14th day. And the percentage of apoptosis reached 17.44% after being poisoned for 30 days, which was significant compared with those on 7th, 14th and 25th days. During the whole period, the AP peak before the G1 peak in the control was not seen. Data analysis showed that the difference of the hepatic cell apoptosis was not distinct in the control. And the difference of hepatic apoptosis percentage was distinct in different time in the trial. However, it was not distinct in the control.

Key words: flow cytometry (FCM); olaquinox; apoptosis