

低氧对团头鲂心肌细胞凋亡及抗氧化酶活性的影响

吴鑫杰¹ 陈楠¹ 黄春筱¹ 王慧娟¹ 王卫民¹ 王焕岭^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070

摘要 以团头鲂为研究对象,采用HE染色及电镜方法观察低氧对心脏组织结构的影响。结果显示,低氧可导致团头鲂心脏组织结构的变化及线粒体损伤;通过TUNEL及荧光定量PCR检测发现低氧能诱导心肌细胞凋亡并引起抑凋亡基因Bcl-2表达量的变化;基于蔗糖梯度离心法提取心脏线粒体,并分析线粒体中MDA含量及SOD活性的变化,结果显示低氧($DO:(2.5 \pm 0.5) mg/L$)可引起团头鲂心脏线粒体中MDA含量及SOD活性的降低。

关键词 团头鲂; 低氧; Bcl-2; 心脏; 细胞凋亡; 抗氧化酶活性

中图分类号 Q 959.46⁺⁸ **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)03-0108-06

在水产业中,水中的溶氧是鱼类赖以生存的必要条件,是影响产量的主要因素。由于水中的溶氧量相对陆地的氧含量低,并且还受天气、温度、富营养化等因素的影响,因此,鱼类常常会受到低氧的威胁。低氧不仅会影响鱼类胚胎的发育和孵化^[1-2],还会引起成鱼血糖浓度、血液皮质激素和血红蛋白等含量的增加,以及代谢率的降低以适应低氧环境,这样造成鱼类摄食水平受限,消化吸收率降低,进而影响其生长速度及抗逆能力,严重情况下导致鱼类大量死亡^[2-3]。另外,低氧也会干扰鱼类内分泌系统,影响配子形成、配子的数量和质量及受精等过程,造成鱼苗发育迟缓、存活率降低、性别比失调等^[3-4]。

研究显示,低氧可导致细胞内线粒体的呼吸链受阻、ATP的摄取减少、线粒体膜的通透性增加,从而诱导细胞凋亡^[5]。而在细胞凋亡过程中Bcl-2(B cell lymphoma 2)家族起着关键的调控作用,该家族包括促进凋亡的蛋白(如Bax和Bak等)和抑制凋亡的蛋白(如Bcl-2和Bcl-X_L等)^[6]。该家族成员通过与其他蛋白的协同作用,来调节线粒体的结构与功能,进而调节细胞凋亡^[7]。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是我国重要的草食性经济鱼类之一,因其易于饲养、味道鲜

美且营养丰富而深受人们喜爱。但是近年来随着团头鲂生存环境的恶化和种质资源的退化等^[8],在养殖过程中常常出现缺氧浮头的现象。为了解低氧对团头鲂心脏的影响,本研究利用HE染色和电镜技术分析了低氧处理后团头鲂心脏组织结构的变化,并通过TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP nick end labeling)及荧光定量PCR等方法分析了心脏组织的细胞凋亡、Bcl-2的表达以及线粒体中丙二醛(malonaldehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用团头鲂取自湖北省黄冈市百容水产良种有限公司,体质量(30 ± 3)g。将鱼运回实验室后,在暂养池(水温(26 ± 1)℃)中暂养(正常投喂饲料早晚各1次)1周之后用于试验。试验分成4组(25尾/组),分别是常氧组、低溶氧(dissolved oxygen, DO)条件下($(2.5 \pm 0.5) mg/L$)处理2 h组和处理4 h组,以及严重低氧组(即水中持续充氮气,当DO值降低到鱼半数死亡时,采集剩余活鱼用于

后续实验,此时DO为0.5 mg/L)。低氧处理后每组随机取15尾鱼采集心脏组织,并通过以下几种方法保存:用于HE染色和TUNEL实验保存于4%多聚甲醛中,用于电镜的样品用2.5%的戊二醛磷酸缓冲液固定,用于提取线粒体的样品先用预冷的生理盐水快速洗净组织表面残留的血液并快速放入液氮中,然后于-20℃中保存,用于提取RNA的样品放入含1 mL Trizol的离心管中并于-80℃中保存备用。

1.2 引物设计以及荧光定量PCR

从笔者所在实验室构建的团头鲂cDNA文库中筛选出*Bcl-2*基因的部分cDNA序列,并根据*Bcl-2*基因部分序列采用Primer Premier 5.0设计荧光定量PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)的引物,*Bcl-2-L*:5'-GTTGGGATGCCTTGAG-3',*Bcl-2-R*:5'-TTCTGAGCAAAAGGCGAT-3'。

利用Trizol(TaKaRa)试剂盒提取不同处理组中团头鲂心脏组织的总RNA,然后取1 μg总RNA通过反转录试剂盒(PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser,TaKaRa)进行反转录以获得相应的cDNA。以获得的cDNA为模板进行qRT-PCR以分析低氧处理后*Bcl-2*在心脏中的表达变化,其反应体系:SYBR预混液(宝生物公司),上下游引物各0.8 μL,cDNA模板1.0 μL,加水至20 μL;反应条件:预变性94℃3 min;94℃30 s,55℃30 s,72℃20 s共30个循环;72℃5 min。以18S RNA基因作为内参基因,通过标准曲线法分析*Bcl-2*基因的表达变化。

1.3 HE染色

将心脏组织浸没在4%多聚甲醛中固定约24 h后,常规石蜡包埋,切片(厚5 μm)。再经常规脱蜡、染色封片,即二甲苯15 min,二甲苯10 min,无水乙醇5 min,无水乙醇3 min,然后依次95%、90%、80%、70%乙醇各1 min,Harris氏苏木素7 min,自来水洗2 min,1%的盐酸乙醇2~5 s,自来水洗5~7 min,1%水溶性伊红2~4 min,自来水洗1 min,95%乙醇1 min,无水乙醇2 min(2次),二甲苯2 min(2次),切片风干后中性树胶封片,光学显微镜下观察。

1.4 TUNEL检测心脏组织中的细胞凋亡

利用TUNEL方法检测低氧处理后心脏组织的细胞凋亡情况。具体步骤如下:心脏组织经石蜡切片常规脱蜡水化、抗原修复、内源性过氧化物酶的

阻断、标记、信号转化和分析、显色、复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后,通过普通光学显微镜观察。阳性凋亡细胞的细胞核呈棕色,正常非凋亡细胞核被苏木素复染成蓝色,核相对较大,形态大小一致。随机取6个视野(每个视野至少500个细胞),再观察并统计100个细胞中的阳性凋亡细胞数,进而计算出凋亡细胞所占比例,即凋亡指数(apoptosis index,AI)。

1.5 心脏线粒体的提取以及SOD、MDA的检测

取约0.3 g心脏组织块剪碎,加入0.5 mL提取液A(250 mmol/L蔗糖,10 mmol/L TES,1 mmol/L EDTA,64 μmol/L BSA,pH 7.4)匀浆,加1 mL提取液A 12 000 r/min离心10 min,弃上清,用1.5 mL提取液B(250 mmol/L蔗糖,10 mmol/L TES,1 mmol/L EGTA,64 μmol/L BSA,pH 7.4)悬浮,3 000 r/min离心10 min,弃沉淀,吸上清液于另一离心管,12 000 r/min离心10 min,弃上清液,用1 mL提取液B悬浮,再以8 800 r/min离心10 min;弃上清液,加入300 μL提取液C(100 mmol/L KCl,20 mmol/L TES,1 mmol/L EGTA,pH 7.4)悬浮,整个操作过程在0~4℃条件下进行。然后利用SOD和MDA试剂盒(购自南京建成公司)检测心脏线粒体中SOD和MDA活性,其中SOD活性的测定是用黄嘌呤氧化酶法,而MDA含量则基于硫代巴比妥酸法来测定。

1.6 数据分析

利用One-way ANOVA软件分析不同处理间SOD活性、MDA含量以及*Bcl-2*基因表达的差异,其中,P<0.05说明差异有统计学意义。

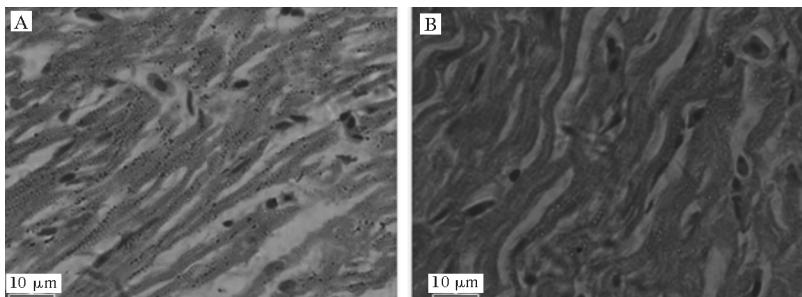
2 结果与分析

2.1 低氧对心脏组织的影响

利用HE染色方法观察低氧对心脏组织的影响,结果显示,常氧条件下,心肌纤维排列较为整齐,无膨胀或者断裂现象。而在严重缺氧(0.5 mg/L)的条件下,心肌纤维肿胀,排列出现紊乱(图1)。

2.2 心脏超显微结构的变化

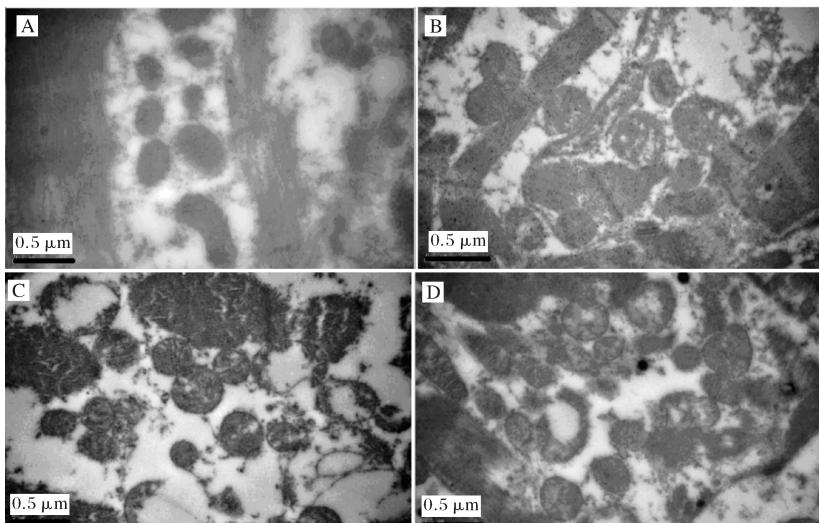
低氧处理后心脏组织的超显微结构如图2所示,在常氧条件下,心脏线粒体的结构完整(没有受到破坏),而当溶氧下降至2.5 mg/L左右时,心脏中线粒体的结构出现不同程度的破坏,线粒体肿胀,结构紊乱。随着溶氧水平的进一步降低达0.5 mg/L时,部分线粒体发生破裂。



A 和 B 分别为常氧和严重低氧(0.5 mg/L)条件下心脏组织的 HE 染色结果, 放大倍数为 1 000 倍。A and B represent HE staining results of heart under normoxia and hypoxia (0.5 mg/L) conditions, respectively, 1 000×.

图 1 低氧处理后团头鲂心脏组织结构的变化

Fig.1 The changes of the heart structure of *M. amblycephala* after hypoxia treatment



A、B、C、D 分别代表常氧组、低氧处理 2 h、低氧处理 4 h 以及严重低氧组, 放大倍数为 20 000 倍。A, B, C and D represent the normoxia group, hypoxia treated for 2 h, hypoxia treated for 4 h, and the severe hypoxia group, respectively, 20 000×.

图 2 低氧处理后团头鲂心脏超显微结构的变化

Fig.2 The ultramicroscopic structure of *M. amblycephala* heart after hypoxia treatment

2.3 细胞凋亡的检测结果

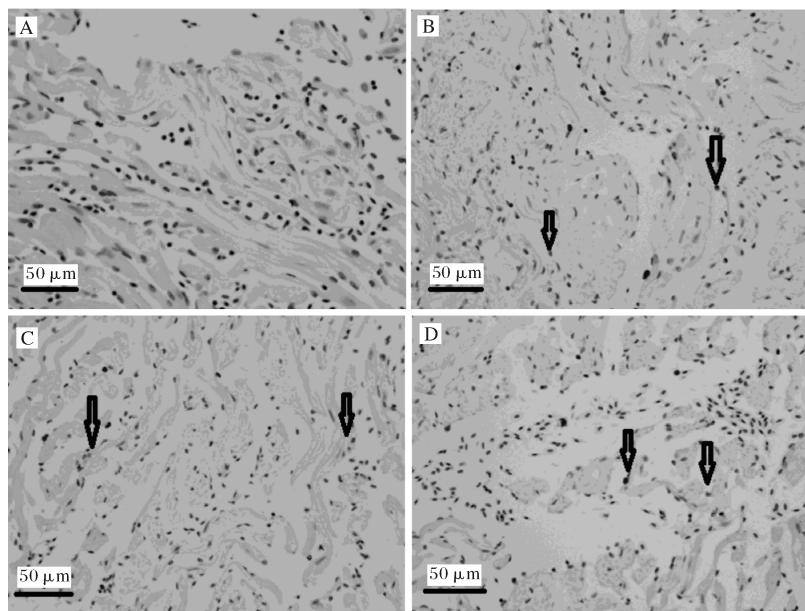
TUNEL 的检测结果显示, 常氧组中团头鲂心肌细胞凋亡的现象较少, 而在低氧组中都有不同程度的细胞凋亡(图 3)。而在常氧、低氧(DO (2.5 ± 0.5) mg/L)处理 2 h 和 4 h、以及严重低氧(DO 0.5 mg/L)的条件下心肌细胞凋亡指数 AI 分别为 1.32 ± 0.26、4.36 ± 0.68、5.56 ± 1.32 和 8.03 ± 0.03。进一步统计分析说明各低氧处理组心肌细胞的凋亡指数都显著高于对照组, 而严重低氧组中其细胞凋亡指数也显著高于其他各组($P < 0.05$), 但低氧处理 2 h 和 4 h 组间差异不显著。说明低氧可显著促进心肌细胞的凋亡, 并且溶氧浓度越低心肌细胞的凋亡程度越严重。

2.4 心脏中 *Bcl-2* 基因的表达变化

qRT-PCR 的结果(图 4)显示, 低氧条件下, *Bcl-2* 的 mRNA 表达量随低氧处理时间的延长而逐渐降低, 但严重低氧会导致该基因的表达量显著上升($P < 0.05$)。

2.5 心脏线粒体中 MDA 和 SOD 的变化

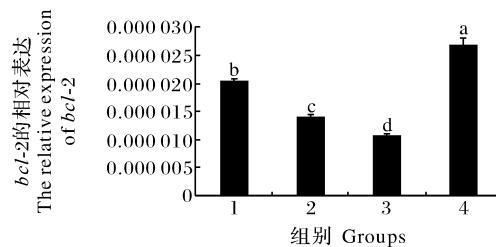
通过蔗糖梯度离心提取心脏组织的线粒体, 然后检测线粒体中 MDA 含量和 SOD 的活性以分析低氧对心脏线粒体中 MDA 和 SOD 的影响, 结果显示(图 5), 低氧((2.5 ± 0.5) mg/L)条件下, SOD 的活性随处理时间的延长而逐渐降低, 但随着溶氧水平的进一步降低及处理时间的延长其活性有所回升。另外, MDA 含量的变化趋势与 SOD 基本一致。



A、B、C、D 分别代表常氧组、低氧处理 2 h、低氧处理 4 h 以及严重低氧组。箭头代表凋亡细胞, 放大倍数为 400 倍。A, B, C and D represent the normoxia group, hypoxia treated for 2 h, hypoxia treated for 4 h, and the severe hypoxia group, respectively. Arrows represent apoptotic cells, 400 \times .

图 3 基于 TUNEL 方法的心脏组织细胞凋亡的结果

Fig.3 Apoptosis of heart based on TUNEL



1、2、3、4 分别代表常氧组、低氧处理 2 h、低氧处理 4 h 以及严重低氧组。下同。1, 2, 3 and 4 represent the normoxia group, hypoxia treated for 2 h, hypoxia treated for 4 h, and the severe hypoxia group, respectively. The same as below.

图 4 低氧处理后心脏中 *Bcl-2* 的表达变化

Fig.4 Expression changes of *Bcl-2* in heart after hypoxia treatment

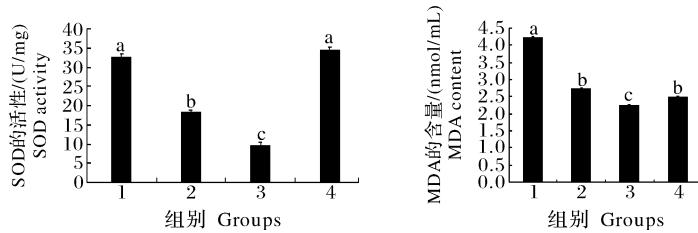


图 5 团头鲂心脏线粒体中 MDA、SOD 的变化

Fig.5 The changes of MDA and SOD in mitochondria of *M. amblycephala* heart

3 讨 论

缺氧是指机体内部组织、细胞得不到充足氧以

维持其正常机能的状况, 进而导致组织的代谢、功能和形态结构发生异常变化。而线粒体是真核生物进行氧化代谢的部位, 机体通过三羧酸循环和呼吸链

氧化磷酸化作用分解糖类、脂肪及蛋白质从而为生命活动提供大部分能量。研究显示,低氧可引起线粒体损伤,即当机体急性或严重缺氧时,细胞中的线粒体受损,蛋白合成受阻,进而使线粒体的数目减少,氧化磷酸化能力下降并产生畸变最后导致细胞凋亡;而在长期慢性低氧条件下,线粒体的数量和密度增加^[9]。心脏是全身组织的供氧中枢,主要进行有氧代谢,对氧的需求量大。因此,笔者利用HE染色及电镜技术来分析低氧对团头鲂心脏组织的影响,结果显示,低氧可导致团头鲂心脏组织结构的变化及线粒体损伤。在一些水中呼吸的鱼类中低氧会导致反射性呼吸过缓及心搏量的升高,而严重低氧可直接抑制心肌细胞^[10]。在欧洲川鲽中低氧也会引起心脏线粒体变小坏死,糖原颗粒沉积以及心肌细胞降解^[11]。

线粒体除了为细胞提供能量外,还参与细胞分化等过程,在细胞生命过程中具有重要的作用和地位^[12-13],可以决定细胞的凋亡和存活^[14-16]。Bcl-2家族蛋白可以控制线粒体中细胞色素C等促凋亡物质的释放,对线粒体所诱导的凋亡通路起着重要的调控作用^[17-18],而该家族成员—抗凋亡蛋白Bcl-2的变化可直接控制线粒体中细胞色素C的释放。在小鼠中低氧会引起Bcl-2以及Bax表达的变化^[7]。基于TUNEL法检测发现低氧可以引起团头鲂心肌细胞的凋亡,并且随低氧处理时间的延长细胞凋亡现象越严重。而Bcl-2基因的mRNA表达量也随低氧处理时间的延长而逐渐降低,但严重低氧(0.5 mg/L)会导致该基因的表达量显著上升。这和鲤中的研究结果类似,即长期严重低氧(DO: 0.5 mg/L 42 d)会引起鲤肝脏中一些抗凋亡基因(Bcl-2, Hsp70, P27)的上调表达^[19]。

低氧会使机体产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),引起脂质过氧化损伤,形成丙二醛等氧化产物,为了降低ROS对机体的损伤,机体通过改变一些抗氧化酶(如SOD, CAT及GSH-Px等)的活性来适应低氧环境。在低氧运动后,人体血清中SOD活性显著升高,但未检测到MDA的显著增加^[20]。而适当强度的游泳运动会使大鼠血清中MDA的值明显降低而SOD值没有明显变化^[21]。在严重缺氧的条件下鲤肝脏、大脑和鳃中SOD的活性上升^[22]。在金鱼鳃中钴会使SOD的活性增加125%,而在心脏中低浓度的钴会抑制SOD的活性,但高浓度时SOD的活性增加208%^[23]。在白鲢肝

脏中低氧可抑制SOD的表达,但在鳃中的结果相反^[24]。而本研究的结果显示,适当低氧可导致心脏线粒体中SOD和MDA的下降,但随着溶氧浓度的进一步降低及处理时间的延长其活性有所回升。这可能是由于在清除体内氧自由基的过程中消耗了部分SOD,而MDA是过氧化产物的标志性物质,所反映的不仅仅是细胞受自由基攻击的严重程度,而且还可以调节各种膜上离子转运机制,例如可导致膜上Ca²⁺的通透性增高,引起细胞内Ca²⁺超载,最终引起细胞内部钙失衡,这是造成细胞坏死和凋亡的重要原因之一。因此,通过降低脂质代谢产物MDA水平,可以缓解细胞凋亡的程度^[25]。

参 考 文 献

- [1] POLLOCK M S, CLARKE L M, DUBÉ M G. The effects of hypoxia on fishes: from ecological relevance to physiological effects[J]. Environ Rev, 2007, 15(1): 1-14.
- [2] PADILLA P A, ROTH M B. Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 7331-7335.
- [3] RICHARDS J G, FARRELL A P, BRAUNER C J, et al. Fish physiology: hypoxia[M]. San Diego: Elsevier, 2009: 79-141.
- [4] REARDON E E, CHAPMAN L J. Fish embryo and juvenile size under hypoxia in the mouth-brooding African cichlid *Pseudocrenilabrus multicolor*[J]. Curr Zool, 2012, 58(3): 401-412.
- [5] MODICA-NAPOLITANO J S, SINGH K K. Mitochondrial dysfunction in cancer[J]. Mitochondrion, 2004, 9(4): 755-762.
- [6] GIMNEZ C A, DANIAL N N. Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins[J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(4): 165-175.
- [7] 杨海平.低氧运动对大鼠骨骼肌细胞凋亡及bcl-2、bax表达的影响[J].中国运动医学杂志,2006,25(6):706-709.
- [8] 高泽霞,王卫民,蒋恩明,等.团头鲂种质资源及遗传改良研究进展[J].华中农业大学学报,2014,33(3):138-144.
- [9] 左清清,姚娜,董坤哲,等.低氧适应的线粒体调控机制研究进展[J].畜牧兽医学报,2013,44(7):993-999.
- [10] FARRELL A P, TRIBUTETO P L. Lutz: a message from the heart—why hypoxic bradycardia in fishes[J]. Exp Biol, 2007, 210: 1715-1725.
- [11] LENNARD R, HUDDART H. The effects of hypoxic stress on the fine structure of the flounder heart (*Platichthys flesus*) [J]. Comp Biochem Physiol Comp Physiol, 1992, 101(4): 723-732.
- [12] THORNTON C, HAGBERG H. Role of mitochondria in apoptotic and necroptotic cell death in the developing brain[J]. Clin Chim Acta, 2015, 451: 35-38 [2015-05-22]. <http://dx.doi.org/>

- 10.1016/j.cca.2015.01.026.
- [13] BURLACU A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins [J]. Cell Mol Med, 2003, 7(3): 249-257.
- [14] 付永锋, 樊廷俊. Bcl-2家族蛋白与细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34(4): 389-394.
- [15] ORRENIUS S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death [J]. Toxicol Lett, 2004, 149(123): 19-23.
- [16] 何云凌, 吴丽颖, 朱玲玲, 等. 线粒体自噬在低氧适应中的作用 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(3): 217-223.
- [17] HAEBERLEIN S L. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death [J]. Neurochem Res, 2004, 29(3): 521-530.
- [18] GROSS A, MCDONNELL J M, KORSMEYER S J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis [J]. Genes Dev, 1999, 13(15): 1899-1911.
- [19] POON W L, HUNG C Y, NAKANO K, et al. An *in vivo* study of common carp (*Cyprinus carpio* L.) liver during prolonged hypoxia [J]. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics, 2007, 2(4): 295-302.
- [20] 鲁政, 胡杨, 田野, 等. 低氧运动对血清 MDA、SOD、GSH 的影响及电解质饮料干预效果的研究 [J]. 北京体育大学学报, 2007, 30(2) : 198-202.
- [21] 顾丽燕, 张一民, 章岚. 不同游泳运动对大鼠血清 MDA、SOD、T-AOC 的影响 [J]. 武汉体育学院学报, 2004, 38(3): 28-31.
- [22] VIG E, GABRIELAK T, LEYKO W, et al. Purification and characterization of Cu, Zn-superoxide dismutase from common carp liver [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1989, 94: 395-397.
- [23] KUBRAK O I, ROVENKO B M, HUSAK V V, et al. Goldfish exposure to cobalt enhances hemoglobin level and triggers tissue-specific elevation of antioxidant defenses in gills, heart and spleen [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2012, 155(2): 325-332.
- [24] ZHANG Z W, LI Z, LIANG H W, et al. Molecular cloning and differential expression patterns of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(2): 473-479.
- [25] 丁娟, 赵薇, 聂黎虹, 等. 槐定碱对急性心肌缺血大鼠血清 MDA、SOD、GSH-PX 及 NO 的影响 [J]. 宁夏医科大学学报, 2009, 31(5): 576-578.

Effects of hypoxia on cardiomyocyte apoptosis and activity of antioxidant enzymes in *Megalobrama amblycephala* heart

WU Xinjie¹ CHEN Nan¹ HUANG Chunxiao¹
WANG Huijuan¹ WANG Weimin¹ WANG Huanling^{1,2}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China;

2. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

Abstract In the present study, effects of hypoxia on cardiomyocyte apoptosis and activity of antioxidant enzymes in the *Megalobrama amblycephala* heart were studied. The results showed that hypoxia caused changes of heart structure and mitochondrial damage by using HE staining and electron microscope observation. Moreover, hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis and the *Bcl-2* mRNA expression changes by using TUNEL and quantitative real-time PCR methods. In addition, the results revealed that moderate hypoxia could result in the decrease of the MDA content and SOD activity of the heart mitochondria extracted by sucrose gradient centrifugation.

Keywords *Megalobrama amblycephala*; hypoxia; *Bcl-2*; heart; apoptosis; antioxidant enzyme activity

(责任编辑:边书京)