

薛画眉,郭宏元,王光光,等. 玉米赤霉烯酮对大鼠睾丸支持细胞凋亡蛋白释放的影响及 NAC 的保护效应[J]. 江苏农业科学,2018,46(5):147-150.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.039

玉米赤霉烯酮对大鼠睾丸支持细胞凋亡蛋白释放的影响及 NAC 的保护效应

薛画眉¹, 郭宏元¹, 王光光¹, 邹 辉¹, 袁 燕¹, 顾建红¹, 刘学忠¹, 刘宗平^{1,2}, 卞建春^{1,2}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009)

摘要:为探讨玉米赤霉烯酮(ZEA)对大鼠睾丸支持细胞凋亡蛋白释放的影响及乙酰半胱氨酸(NAC)的保护效应,用 20 $\mu\text{mol/L}$ ZEA 与 100 $\mu\text{mol/L}$ NAC 单独或联合处理睾丸支持细胞 24 h,用 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测凋亡率,用 Western Blot 法检测调控凋亡蛋白表达量。结果显示,与对照组相比,ZEA 染毒组的线粒体中 Cyt C 与 AIF 表达量显著下降,胞浆中 Cyt C 与 AIF 表达量显著上升。与单独染毒组相比,100 $\mu\text{mol/L}$ NAC 与 20 $\mu\text{mol/L}$ ZEA 联合处理组睾丸支持细胞凋亡率,Bax、cleaved-Caspase-9 和 cleaved-Caspase-3 表达量均极显著降低,Bcl-2 表达量极显著增高。结果表明,caspase 依赖性和 caspase 非依赖性的线粒体途径均参与了 ZEA 致睾丸支持细胞凋亡的发生,NAC 对 ZEA 诱导的睾丸支持细胞凋亡发生起抑制作用。

关键词:玉米赤霉烯酮;乙酰半胱氨酸;睾丸支持细胞;凋亡

中图分类号: S857.17 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)05-0147-04

玉米赤霉烯酮(zearalenone,简称 ZEA)在全世界动物饲料和人类粮食中普遍存在,它主要是由镰刀菌污染而产生的一种非甾体雌激素类霉菌毒素^[1]。据报道,玉米及饲料中 ZEA 的超标能够引起公猪性欲下降,血清中睾酮含量急剧降低,导致睾丸的病理性萎缩,精子发生障碍,甚至出现雌性化等病变^[2]。睾丸支持细胞(sertoli cell,简称 SC)在雄性动物精子发生过程中发挥着不可或缺的作用,精子的发生障碍与睾丸支持细胞受损密切相关。睾丸支持细胞是众多环境污染物作用于雄性生殖系统的靶细胞^[3]。靶向破坏睾丸支持细胞将导致生精细胞快速、大量非生理性死亡^[4]。因此,研究 ZEA 对睾丸支持细胞的损害作用及其机制,对揭示 ZEA 雄性生殖毒性机制具有重要作用。本试验以不同浓度的 ZEA 处理大鼠原代睾丸支持细胞 24 h,观察 ZEA 对睾丸支持细胞线粒体凋亡蛋白 Cyt C、AIF 释放的影响和 NAC 对 ZEA 引起的睾丸支持细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达变化的影响,为揭示 ZEA 的雄性生殖毒性机制及 ZEA 中毒的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

18~21 d 清洁级 Wistar 大鼠(由扬州大学比较医学中心提供)。

收稿日期:2017-06-01

基金项目:江苏省普通高校自然科学基金(编号:08KJD230002);扬州大学大学生学术科技创新基金重点项目(编号:x20160702);江苏高校优势学科建设工程(PAPD)。

作者简介:薛画眉(1996—),女,江苏南通人,研究方向为动物营养代谢病与中毒病研究。E-mail:3064698134@qq.com。

通信作者:卞建春,博士,教授,研究方向为动物营养代谢病与中毒病学。E-mail:jcbian@yzu.edu.cn。

1.2 主要试剂

玉米赤霉烯酮,购自美国 Sigma 公司;胎牛血清(FBS)、DMEM/F-12 培养基等试剂,购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶等试剂,购自美国 Amresco 公司;L-谷氨酰胺、青链霉素等试剂,购自美国 Boston Biomedical 公司;AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒,购自美国 BD 公司;Bax、Bcl-2、Cyt C、AIF、cleaved-Caspase-3、cleaved-Caspase-9 等单克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG,均购自美国 CST 公司;硝酸纤维素膜,购自美国 Pall Corporation 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,购自中国碧云天生物技术研究所;预染蛋白分子量标准和 ECL 化学发光底物检测试剂盒,购自美国 Thermo 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 大鼠原代支持细胞的分离与培养

取 18~21 d Wistar 雄性大鼠,脱颈处死后,无菌操作取出双侧睾丸,置于预冷的无菌磷酸缓冲盐溶液(PBS)中并转移至超净工作台内操作。用预冷的 PBS 将睾丸冲洗 3 遍后,将睾丸置于直径 100 mm 的玻璃平皿中,用眼科镊撕去周围脂肪组织及精索,再用眼科剪和眼科镊小心剥去白膜及内部较大血管,并用眼科镊轻轻将曲细精管拉散,置于 0.25% 胰蛋白酶溶液中,密封后在水浴摇床中于 150 r/min 37℃ 消化 15 min 至组织碎块呈线索状,加入等体积含血清 PBS 溶液终止消化,800 r/min、4℃ 离心 10 min。弃去上清液体,加入 0.5% 胶原酶溶液,密封后在水浴摇床中于 150 r/min 37℃ 消化 15 min,至酶液呈黏液状,加入等量含 10% FBS 的 DMEM/F-12 培养基终止消化,用 100 目的网筛进行过滤,将滤液于 800 r/min、4℃ 离心 10 min。离心后用 DMEM/F-12 培养基重悬,重复清洗 3 次即可,于 5% CO₂ 37℃ 条件下进行培养。对支持细胞的纯化采用低渗处理法^[5],细胞培养 24 d 后,吸去培养基,用 PBS 清洗 1 次后,加入 pH 值为 7.4 的 20 mmol/L Tris-HCl 处理 3 min,吸去处理液,用 PBS 清洗 3 次,加入含

10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F-12 培养基继续培养。

1.4 细胞染毒和线粒体及胞浆中 AIF、Cyt c 蛋白的制备

以不同浓度(0、5、10、20 μmol/L)ZEA 处理睾丸支持细胞 24 h 后,用 0.25% 胰酶消化 5 min,离心收集细胞不少于 1.0×10^7 个(1 200 r/min,5 min,4 ℃),用 4 ℃ 预冷 PBS 将细胞洗涤 2 次。加入 300 μL Mito-Cyto Buffer 重悬细胞,将细胞悬液移入玻璃匀浆器中,研磨 80 次(4 ℃ 冰上操作)。将匀浆液转移至 4 ℃ 预冷的 1.5 mL EP 离心管中,离心(12 000 r/min,10 min,4 ℃),沉淀即为线粒体,上清为胞浆蛋白;将上清收集至 1.5 mL EP 离心管中。沉淀中加入 100 μL 线粒体裂解缓冲液,于冰上裂解 30 min,离心(12 000 r/min,10 min,4 ℃),收集上清,即得线粒体蛋白,用 BCA 法测胞浆蛋白及线粒体蛋白浓度,-80 ℃ 保存备用。

1.5 NAC 对 ZEA 致睾丸支持细胞凋亡的影响

以每孔 1.0×10^5 个细胞的密度接种于六孔板中,添加 NAC(0、20 μmol/L ZEA,100 μmol/L NAC,20 μmol/L ZEA + 100 μmol/L NAC)处理 24 h 后,用 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒检测 SC 细胞凋亡情况。分别设空白组(未加染料)、PI 单染组、FITC 单染组和处理组(PI 和 FITC 双染)。预先将 10 × Binding Buffer 加 DDW 稀释成 1 × Binding Buffer,备用;用 0.25% 胰酶消化 3 min,收集细胞(1 500 r/min,5 min,4 ℃)预冷 1 × PBS 洗涤细胞,离心后加入 100 μL 1 × Binding Buffer 重悬细胞,加入 AnnexinV-FITC 和 PI 各 5 μL 单独或联合作用,37 ℃ 避光反应 15 min,200 目尼龙网过滤,在 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

同样方法添加 NAC 处理 24 h 后(分组同上),收集染毒后的睾丸支持细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,用细胞裂解液冰浴裂解细胞 30 min,超声波细胞破碎仪裂解 30 s,12 000 r/min 离心 10 min 取上清,用 BCA 法进行蛋白定量,-80 ℃ 保存备用,以测定调控凋亡蛋白 Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase-9 和 cleaved-Caspase-3 等的表达量。

1.6 Western Blot 法检测凋亡相关蛋白的表达

用蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测以上保存样品的凋亡相关蛋白 Cyt c 和 AIF 的释放量及 Caspase-3、Caspase-9 的蛋白表达水平,同时检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平。

蛋白样品上样 10 μL/孔,Bench Marker 5 μL,其余孔内加 10 μL 1 × Loading Buffer,浓缩胶 140 V、20 min,分离胶 110 V、100 min,根据 marker 指示,确定停止时间。置于电转液中,转膜 120 V、90 min。用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,TBST 洗 2 次,吸尽液体后,加入稀释好的一抗(表 1),4 ℃ 孵育过夜;隔日回收一抗,用 TBST 洗涤 5 次,每次 5 min,加入稀释好的二抗,室温孵育 2 h,用 TBST 洗涤 5 次。

表 1 一抗稀释比例及所用稀释液

抗体	稀释比例	稀释液
兔抗 Cyt C	1 : 1 000	1% BSA 溶于 TBST
兔抗 AIF	1 : 1 000	1% BSA 溶于 TBST
兔抗 Bax	1 : 1 000	1% BSA 溶于 TBST
兔抗 Bcl-2	1 : 1 000	1% BSA 溶于 TBST
兔抗 Caspase-9	1 : 1 000	1% BSA 溶于 TBST
兔抗 Caspase-3	1 : 1 000	1% BSA 溶于 TBST
HRP 标记山羊抗兔 IgG	1 : 5 000	1% BSA 溶于 TBST

用 ECL 检测液发光显影定影。

1.7 数据处理与统计分析

应用 Image J 软件分析 Western Blot 法所测条带灰度值。试验数据用平均值 ± 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS statistics 19.0 进行统计分析,并采用单因素方差分析(One-way ANOVA)、LSD 及 Dunnett 法进行组间均值进行比较,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 ZEA 对睾丸支持细胞线粒体 AIF 和 Cyt c 释放的影响

用 0、5、10、20 μmol/L ZEA 处理睾丸支持细胞 24 h 后,与对照组相比,随着 ZEA 浓度的增加,胞浆中 AIF 和 Cyt c 的释放量增加,线粒体中 AIF 和 Cyt c 的表达量减少。分析灰度值见图 1。结果显示,与对照组相比,线粒体中 Cyt c 表达量呈现出 5 μmol/L ZEA 处理组显著下降($P<0.05$)和 10、20 μmol/L ZEA 处理组极显著下降($P<0.01$);各染毒组线粒体中 AIF 表达量均极显著下降($P<0.01$);胞浆中 Cyt c 呈现出 10 μmol/L ZEA 处理组显著上升($P<0.05$)和 20 μmol/L ZEA 处理组极显著上升($P<0.01$);10、20 μmol/L ZEA 处理组胞浆中 AIF 表达量呈极显著上升($P<0.01$),呈现“剂量-效应”关系。

2.2 NAC 对 ZEA 致睾丸支持细胞凋亡的影响

用 100 μmol/L NAC 预处理睾丸支持细胞 30 min 后,用 20 μmol/L ZEA 作用睾丸支持细胞 24 h,流式细胞术检测细胞凋亡率。图 2 结果显示,与 20 μmol/L ZEA 处理组相比,NAC 与 ZEA 共处理组 R5 象限凋亡细胞数量明显减少。与 ZEA 单独处理组相比,NAC 与 ZEA 共处理组凋亡率极显著降低($P<0.01$)。

2.3 NAC 对 ZEA 致睾丸支持细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达调控

用 100 μmol/L NAC 预处理睾丸支持细胞 30 min 后,用 20 μmol/L ZEA 作用睾丸支持细胞 24 h,用 Western Blot 法检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达变化情况见图 3。结果显示,与 20 μmol/L ZEA 单独处理组相比,100 μmol/L NAC 与 20 μmol/L ZEA 联合处理组 Bcl-2/Bax 值有极显著升高($P<0.01$)。

2.4 NAC 对 ZEA 致睾丸支持细胞 Caspase-3、Caspase-9 蛋白活化的调控

用 100 μmol/L NAC 预处理睾丸支持细胞 30 min 后,用 20 μmol/L ZEA 作用睾丸支持细胞 24 h,用 Western Blot 法检测 cleaved-Caspase-9、cleaved-Caspase-3 蛋白表达变化情况。图 4 结果显示,与 20 μmol/L ZEA 单独处理组相比,100 μmol/L NAC 与 20 μmol/L ZEA 联合处理组 cleaved-Caspase-9、cleaved-Caspase-3 表达量极显著下降($P<0.01$)。

3 讨论

Cyt c 是由亚铁血红素和多肽组成的一种可溶性色素蛋白,作为线粒体呼吸链中传递电子的载体,与富含不饱和脂肪酸的线粒体内膜外侧的磷脂结合,呈点状分布,在生理条件下限制其自由穿透线粒体外膜。凋亡发生时,线粒体中的细胞色素 C 将被释放到细胞浆中,激活 caspase 级联蛋白,加剧凋亡的进行,释放的细胞色素 C 活化 Caspase-9,进一步激活调

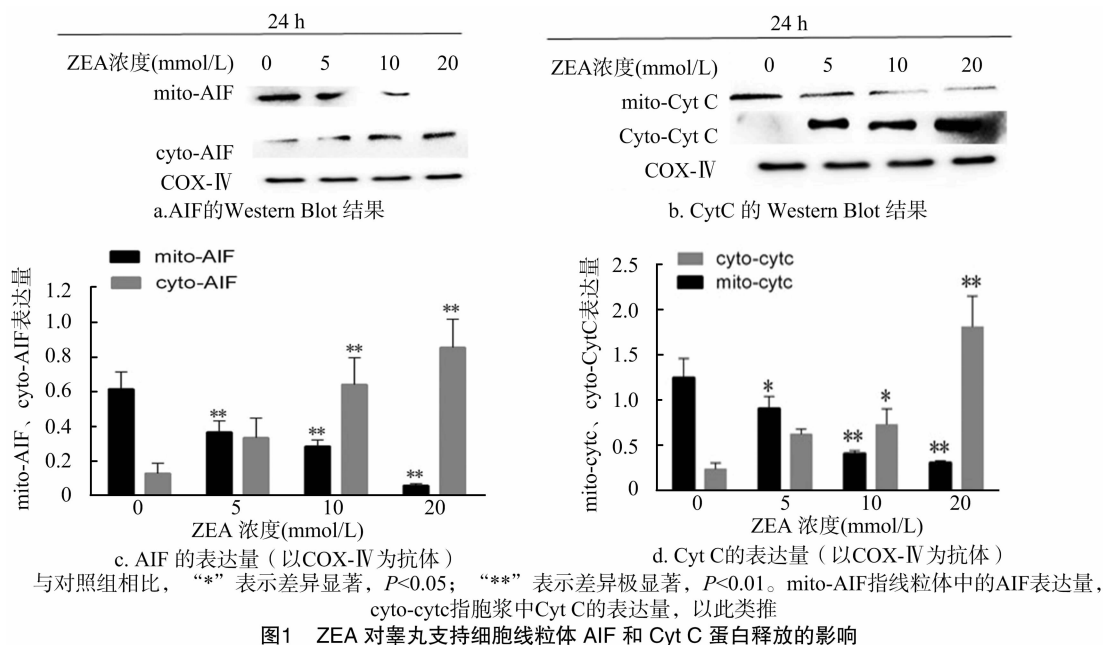


图1 ZEA 对睾丸支持细胞线粒体 AIF 和 Cyt C 蛋白释放的影响

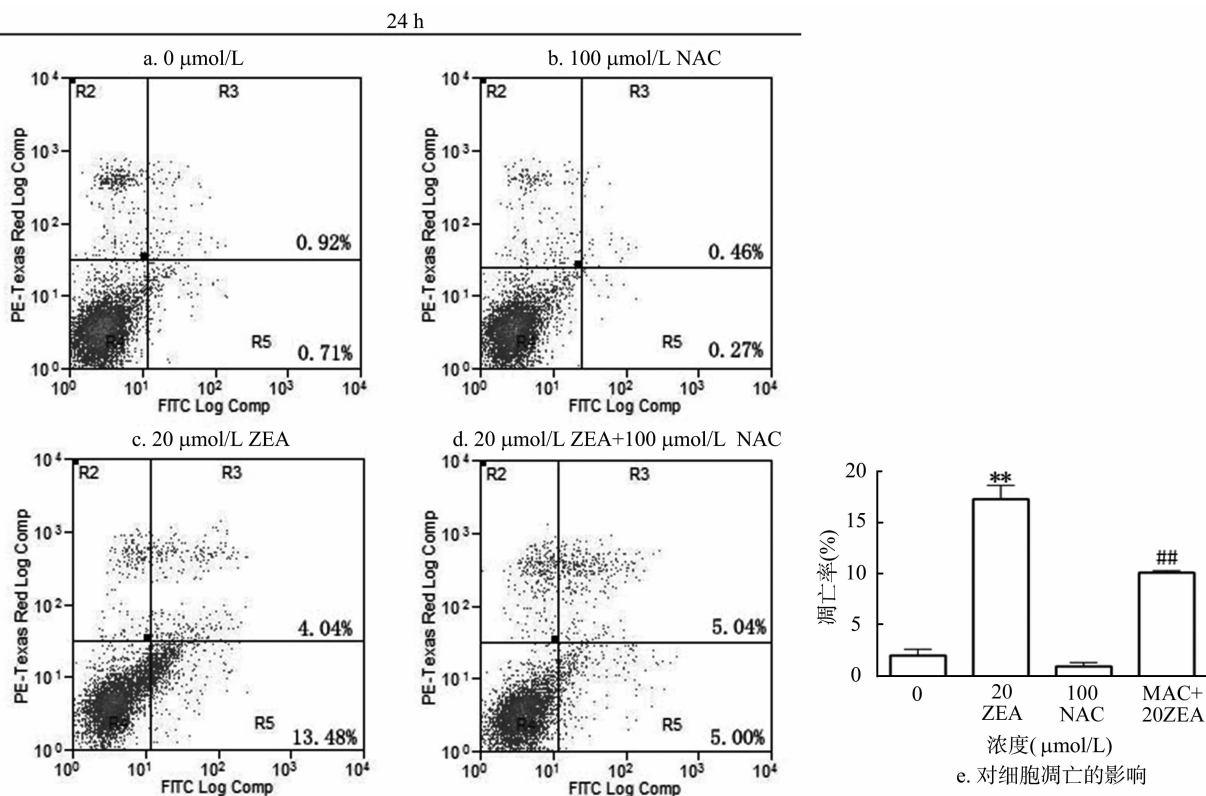
与对照组相比, “*”表示差异显著, $P < 0.05$; “**”表示差异极显著, $P < 0.01$ 。与染毒组相比, “#”表示差异显著, $P < 0.05$; “##”表示差异极显著, $P < 0.01$ 。下同

图2 NAC 对 ZEA 致睾丸支持细胞凋亡的影响

亡家族中的关键性蛋白 Caspase-3。ZEA 诱导人类肝细胞发生 caspase 依赖的线粒体介导的凋亡, 其中活性氧 (reactive oxygen species, 简称 ROS) 的产生在线粒体畸变和 Cyt C 的释放中起着关键作用^[6-7]。本研究发现, ZEA 处理睾丸支持细胞能够导致线粒体中 Cyt C 释放到胞浆中。AIF 在凋亡发生过程中调控线粒体膜的通透性, 位于线粒体外膜内。在线粒体遭到损伤刺激时, 转移至胞浆和细胞核中, 参与凋亡进程。

Yu 等研究证实, ZEA 通过调控 RAW264.7 中 AIF 的释放而介导 caspase 非依赖凋亡的进程, 在 ZEA 诱导山羊间质细胞发生凋亡中 AIF 起到了关键性作用, Cyt C 一般涉及 caspase 依赖的细胞凋亡, 而 AIF 和 End G 在 caspase 非依赖凋亡中发挥着重要作用^[8-10]。本试验中, AIF 随 ZEA 浓度的升高, 在线粒体中的表达量降低, 在相应的胞浆中的表达量递增。说明 caspase 依赖和 caspase 非依赖性凋亡信号通路共同调节

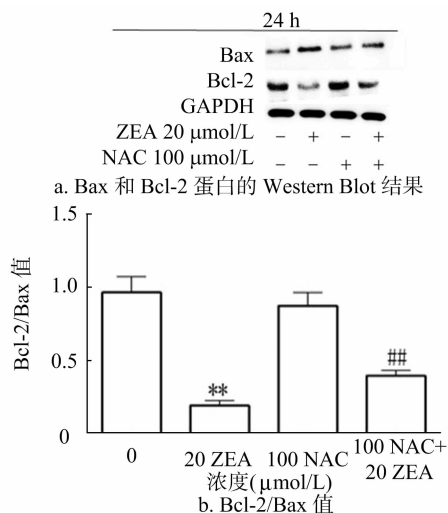


图3 NAC对ZEA致睾丸支持细胞Bax和Bcl-2蛋白表达影响

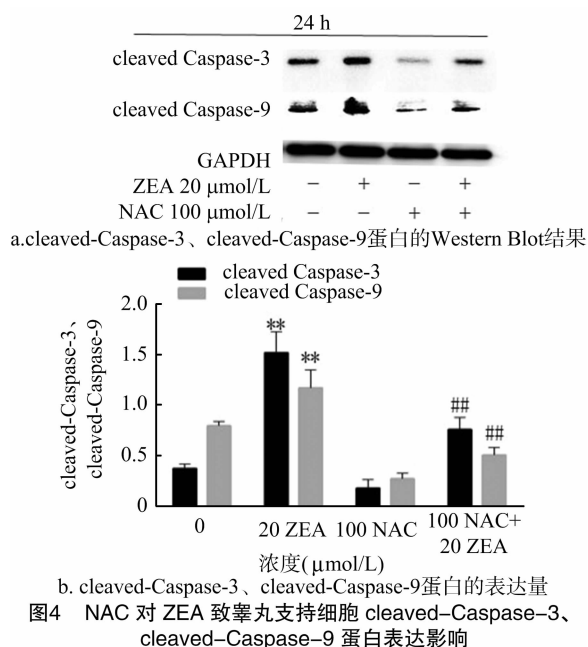


图4 NAC对ZEA致睾丸支持细胞cleaved-Caspase-3、cleaved-Caspase-9蛋白表达影响

ZEA诱导睾丸支持细胞凋亡的发生。

NAC在致神经元死亡的体内和体外模型中均起到保护作用^[11]。GHosh等研究表明,在黑色素瘤细胞中,用ROS特异性清除剂NAC阻断ROS的生成,可抑制ROS诱导的Bax表达量上升和Bcl-2表达量下降^[12]。在败血症和急性肺损伤模型试验中,口服NAC(150 mg/kg)的适当剂量能够降低肺组织中Caspase-3的表达^[13]。本试验结果表明,抗氧化剂NAC能够明显抑制因ZEA暴露引起的睾丸支持细胞凋亡发生;Bcl-2/Bax值升高,cleaved-Caspase-9和cleaved-Caspase-3的蛋白表达量均降低,与相关研究存在一致性^[14]。NAC显著降低睾丸支持细胞因ZEA引起的氧化损伤,线粒体得到了有效保护。Bcl-2基因产物大量存在于活性氧产生的关键场所——线粒体内膜,Bcl-2的上调使线粒体膜免于脂质过氧化的损伤;Bcl-2的表达量回升,可以有效地抑制Bax、cleaved-Caspase-9和cleaved-Caspase-3等

凋亡执行蛋白表达;Bax的下调,使线粒体膜的通透性维持稳态,从而阻断ZEA激活线粒体凋亡通路,延缓ZEA引起的睾丸支持细胞凋亡发生。综上所述,NAC可以对ZEA诱导的睾丸支持细胞的凋亡发生起抑制作用。

参考文献:

- [1] Bennett J W. Mycotoxins[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2003, 16(3):497.
- [2] Efsa E A. Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to ergot as undesirable substance in animal feed[J]. Journal of Indian Botanical Society, 2004, 89(1):1-35.
- [3] 沈洁,韩晓冬. 睾丸支持细胞免疫豁免作用机制及研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2009, 25(7):666-670.
- [4] Venkataramana M, Nayaka S C, Anand T, et al. Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells; the role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 65(1):335-342.
- [5] 韩晓冬,龚朕,屠志刚,等. 大鼠睾丸支持细胞的原代培养与鉴定[J]. 解剖学报, 2005, 36(6):682-684.
- [6] Ayed-Boussema I, Bouaziz C, K, et al. The mycotoxin zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway[J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22(7):1671-1680.
- [7] Bouaziz C, Sharaf E O, Golli E E, et al. Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells[J]. Toxicology, 2008, 254(1/2):19-28.
- [8] Yu J Y, Zheng Z H, Son Y O, et al. Mycotoxin zearalenone induces AIF- and ROS-mediated cell death through p53- and MAPK-dependent signaling pathways in RAW264.7 macrophages[J]. Toxicology in Vitro, 2011, 25(8):1654-1663.
- [9] Yang D Q, Jiang T T, Lin P F, et al. Apoptosis inducing factor gene depletion inhibits zearalenone-induced cell death in a goat Leydig cell line[J]. Reproductive Toxicology, 2017, 67:129-139.
- [10] Kook S H, Son Y O, Chung S W, et al. Caspase-independent death of human osteosarcoma cells by flavonoids is driven by p53-mediated mitochondrial stress and nuclear translocation of AIF and endonuclease G[J]. Apoptosis, 2007, 12(7):1289.
- [11] Karaliya A, Novikova L N, Kingham P J, et al. Neuroprotective effects of N-acetyl-cysteine and acetyl-L-carnitine after spinal cord injury in adult rats[J]. PLoS One, 2012, 7(7):e41086.
- [12] Ghosh S, Bishayee K, Paul A, et al. Homeopathic mother tincture of *Phytolacca decandra* induces apoptosis in skin melanoma cells by activating caspase-mediated signaling via reactive oxygen species elevation[J]. Journal of Integrative Medicine, 2013, 11(2):116-124.
- [13] Ozdülger A, Cinel I, Koksel O, et al. The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model[J]. Shock, 2003, 19(4):337-366.
- [14] Li J, Meng Z Z, Zhang G W, et al. N-acetylcysteine relieves oxidative stress and protects hippocampus of rat from radiation-induced apoptosis by inhibiting caspase-3[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015, 70(4):1-6.