DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.02.007

微囊藻毒素 -LR 对小鼠肝细胞线粒体功能的影响 *

吴 珍 张 亚 贝云成 沈萍萍△

（南京大学生命科学院 医药生物技术国家重点实验室 江苏 南京 210093）

摘要 目的：探究微囊藻毒素 -LR 对小鼠肝细胞线粒体功能的影响。**方法：**采用 BALB/c 小鼠作为模型动物，随机分为 3 组：A 组，空白对照组，正常饮用水；B 组，添加 5 g/L 微囊藻毒素 -LR 的饮用水；C 组，添加 30 g/L 微囊藻毒素 -LR 的饮用水。分组喂养 3 个月，分离小鼠肝脏、提取线粒体，采用线粒体荧光探针 JC-1 测定线粒体膜电位（MMP），qRT-PCR 检测自噬相关基因 Beclin1 和 Lc3α 的转录水平，Western Blot 检测细胞色素 C 的释放，电镜观察线粒体的形态和内部结构。**结果：**微囊藻毒素 -LR 处理组的小鼠肝细胞线粒体膜电位明显下降，自噬相关基因 Lc3α 的转录水平上升，细胞色素 C 由线粒体释放到胞浆，电镜观察线粒体形态异常、内部结构被破坏。**结论：**微囊藻毒素 -LR 对小鼠肝细胞线粒体有较强的毒性作用，并引发线粒体自噬。

关键词：微囊藻毒素 -LR；线粒体膜电位；线粒体自噬

中图分类号：Q95-3，R965 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2014）02-226-04

Exploring the Effects of MC-LR on Mitochondrial Function in Mouse Liver*

WU Zhen, ZHANG Ya, BEI Yun-cheng, SHEN Ping-ping△

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu, 210093, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of MC-LR on mitochondria isolated from mouse liver. **Methods:** The mice were randomly divided into 3 groups: Group A were fed with tap water, Group B were fed with the water containing 5 μg/L MC-LR, while Group C were fed with water containing 30 μg /L MC-LR for 3 months respectively. Mitochondria were isolated from mouse liver, and mitophagy was detected through mitochondrial membrane potential by using JC-1, which was widely used in apoptosis studies to monitor mitochondrial health. After extracting RNA from the mouse liver, transcriptional levels of autophagy-related genes Beclin1 and Lc3α were measured by qRT-PCR. The release of cytochrome C from mitochondria to plasma was detected by Western Blot. The morphology of mitochondria was observed by electron microscope. **Results:** Compared with the mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), mitochondrial membrane potential declined obviously. The transcriptional level of Lc3α increased correspondingly, while that for Beclin1 was not significant. Cytochrome C was released from mitochondria to the plasma. The abnormality of mitochondria could be detected clearly by electron microscope, and some mitochondria were tending to fall apart. **Conclusions:** Mitophagy could be induced in mouse liver after the treatment of MC-LR, which indicated that MC-LR had severe mitochondrial toxicity in mouse liver.

Key words: Microcystin-LR; Mitochondiral membrane potential; Mitophagy

Chinese Library Classification（CLC）: Q95-3，R965 Document code: A

Article ID:1673-6273（2014）02-226-04

前言

水华是淡水水体中藻类大量繁殖的一种自然生态现象[1]。近年来，随着经济的迅猛发展，生活及工农业生产中含有氮、磷的废污水排入水体，导致富营养化程度加剧[2-3]，蓝藻、绿藻、硅藻等藻类大量繁殖，使水体呈现蓝色或绿色。其中微囊藻水华由于可以产生一种名为微囊藻毒素（microcystins，MCs）的单环 7 肽化合物[4]，对自然环境和人类生存造成的危害最为严重。目前已经发现了 70 多种微囊藻毒素的异构体，微囊藻毒素 -LR 是毒性最强的一种，具有肝毒性、肾毒性[5]、肠毒性[6]、胚胎 - 胎儿毒性[7]，能引起心肌[8]、肾上腺及生殖系统损伤[9]等。

线粒体是一种具有双层膜封闭式结构，为细胞各项生命活动提供能量的细胞器[10]。当外界缺乏营养或者细胞衰老的情况下，线粒体发生去极化，细胞启动自我清除机制，将损伤的线粒体特异性包裹进自噬体中，并与溶酶体融合后进行降解，维持细胞内环境的稳定，这一过程被称作线粒体自噬[11,12]。已有的研究表明，微囊藻毒素 -LR 代谢产物主要聚集于动物肝脏，专一性地抑制某些调控细胞组建和功能的重要分子的活性，包括蛋白磷酸酶 1（PP1）和蛋白磷酸激酶 2A（PP2A）；同时激活蛋白激酶和环加氧酶，导致细胞内多种蛋白质过度磷酸化[13]。但是，微

* 基金项目：江苏省自然科学基金项目（BK2010049）；国家自然科学基金项目（91013015）

作者简介：吴珍（1986-），女，硕士研究生，主要从事细胞凋亡相关研究，电话：18205187781，E-mail: wuzhen.26@163.com

△通讯作者：沈萍萍，E-mail: ppshen@nju.edu.cn

(收稿日期：2013-04-24 接受日期：2013-05-14)

囊藻毒素 -LR 对小鼠肝细胞线粒体功能的影响还未见报道，本研究基于线粒体在生命活动中的重要地位，旨在为进一步探究微囊藻毒素 -LR 细胞器毒性的相关机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠 24 只，6～8 周龄，体重 18～22 g(北京维通利华实验动物技术有限公司)，合格证号：SCXK(京)2012-0001。微囊藻毒素 -LR，纯度 >98.0%(美国 A.G. Scientific)；组织线粒体分离试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、细胞色素 C 抗体、LC3 抗体(以上均购自碧云天生物科技有限公司)；GAPDH 抗体(美国 Bioworld 公司)。生物荧光显微镜(日本尼康公司)；多功能全自动酶标仪(美国 IBM 公司)；半定量 PCR 仪 Mycycler (美国 Bio-Rad Laboratories 公司)；定量 PCR 仪 ABI 7300(美国 Applied Biosystem 公司)；水平凝胶电泳仪(北京六一仪器厂)；CM-l20 型透射电镜(荷兰 Philips 公司)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 动物分组 将 24 只小鼠随机分为 3 组，即空白对照组，低剂量组(5 μg/L)和高剂量组(30 μg/L)，将微囊藻毒素 -LR 分别按照上述比例添加到饮用水中，染毒 3 个月。

1.2.2 线粒体的提取 颈椎脱臼法处死小鼠后迅速打开腹腔，取出肝下缘组织，加入 10 倍体积预冷的线粒体分离试剂 A，冰浴匀浆 10 次，离心(1000× g，5 min，4 ℃)。转移上清至另一离心管中，离心(3500× g，10 min，4℃)，沉淀即为分离得到的线粒体[14]。

1.2.3 利用 JC-1 检测线粒体膜电位的变化 JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位的荧光探针，在线粒体膜电位较高时形成聚合物，产生红色荧光；膜电位较低时为单体形式，发出绿色荧光[15]。阳性对照为线粒体解偶联剂[16](carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone，CCCP)。用超纯水按比例稀释 JC-1，再加入 JC-1 染色缓冲液，混匀后即为 JC-1 染色工作液。阳性对照组的处理：将 CCCP(10 mM)按照 1:1000 的比例加入到样品中，孵育 20 min。酶标仪检测 JC-1 单体时将激发光设置为 490 nm，发射光设置为 530 nm；检测 JC-1 聚合物时，将激发光设置为 525 nm，发射光设置为 590 nm。

1.2.4 qRT-PCR 检测自噬相关基因 Beclin1 和 Lc3α 的转录水平 用 Trizol 一步法提取总 RNA，根据自噬相关基因 Beclin1[17]和 Lc3α[18,19]的序列设计引物，Beclin1 的序列为：5' AGGATGGTGTCTCTCGAAGATT 3'(正义)，5' GATCAGAGTGAAGCTATTAGCACTTTC 3'(反义)；Lc3α 的序列为：5' GACCAGCACCCCAGTAAGAT 3'(正义)，5' TGGGACCAGAAACTTGGTCT 3'(反义)，以 RNA 为模板，反转录成 cDNA，利用 qPCR 测定小鼠肝细胞自噬相关基因的转录水平。

1.2.5 Western Blot 细胞色素 C 的分布情况 取适量线粒体分离试剂和线粒体裂解液备用，加入 PMSF(终浓度为 1 mM)。按照 1.2.2 步骤分离得到线粒体后，将剩余上清离心(12000× g，10 min，4 ℃)，取上清即为去除线粒体的细胞浆蛋白，Bradford 法测定浓度，12% SDS-PAGE 跑胶约 2 h，恒流转膜约 1h。Blocking buffer 包被，37℃，2 h。一抗包被 4℃ 过夜，TBST 洗涤 5 次后，加入 HRP 标记的二抗孵育 1 h，进行 ECL 化学发光显影，结果采用凝胶图像分析仪进行分析。

1.2.6 电镜观察肝细胞线粒体形态和内部结构的影响 颈椎脱臼法处死小鼠后迅速打开腹腔，取出肝下缘组织，置于培养皿中，滴入 2.5%戊二醛磷酸缓冲液(pH=7.3)充分浸润，用双面刀片将组织修成小块(肝组织块制成 1 mm^3 大小)，用滴管吸取样本放入盛有 2.5%戊二醛磷酸缓冲液(pH=7.3)小瓶内，标记后放入 4 ℃ 冰箱中保存。2.5%戊二醛固定后的标本，经 0.1 M 磷酸缓冲液漂洗后，再用 1% OsO_4 固定 1 h。接着用 0.1 M 磷酸缓冲液漂洗，4℃ 冰箱内梯度乙醇脱水，至 90%乙醇和 90%丙酮混合液，90%丙酮，再在 100%丙酮室温下脱水 15 min，重复 3 次。618 环氧树脂包埋。LKB-1 型超薄切片机(瑞典 Leica)切片，切片厚度 50 nm。枸橼酸铅和醋酸双氧铀染色。CM-l20 型透射电镜(Philips 公司)观察并照相[20]。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数± 标准差($\bar{x}$ ± s)表示，采用 Graphpad 进行方差分析和 t 检验。检验水准 α=0.05，P< 0.05 时认为差异有显著性。

2 结果

2.1 微囊藻毒素 -LR 对线粒体膜电位的影响

为了检测微囊藻毒素 -LR 是否能引起线粒体自噬，按照优化后的实验步骤测定小鼠肝细胞线粒体膜电位的变化，同时设置阳性对照组，即 CCCP 处理线粒体 1 min，其中红色荧光与绿色荧光的比值大小，反映了 JC-1 的聚合程度和线粒体膜电位的高低。由下图可知，微囊藻毒素 -LR 处理组的线粒体膜电位显著下降并呈现出剂量依赖性。

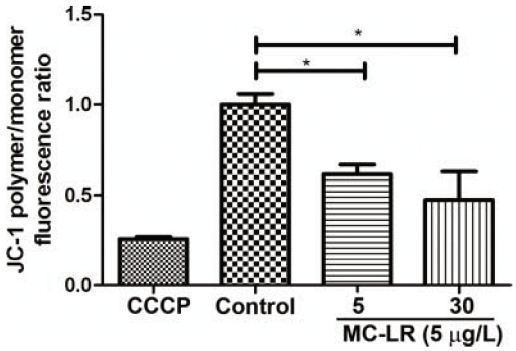

图 1 微囊藻毒素 -LR 对线粒体膜电位的影响

Fig. 1 Effects of MC-LR on MMP ($\bar{x}$± s, n=8)

*P<0.05 vs control group

2.2 微囊藻毒素 -LR 对自噬相关基因 Beclin1 和 Lc3α 转录水平的影响

qRT-PCR 分别检测自噬相关基因 Beclin1 和 Lc3α 的转录水平。结果显示，微囊藻毒素 -LR 在上调 Lc3α 的同时，下调 Beclin1 的转录水平。其中，Lc3α 转录水平的上升与线粒体膜电位的下降存在相关性，即伴随着线粒体膜电位的消失，细胞启动自我保护机制，增加自噬相关基因的转录和翻译，从而清除损伤的线粒体。

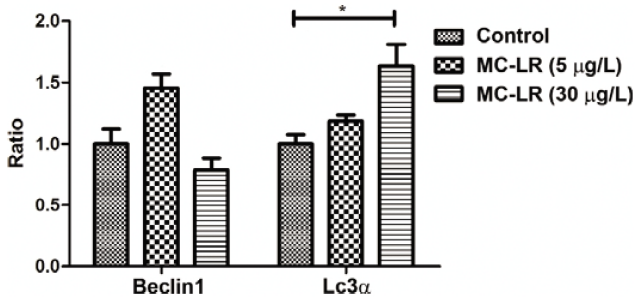

图 2 微囊藻毒素 -LR 对自噬相关基因 Beclin1 和 Lc3α 转录水平的影响

Fig. 2 Effects of MC-LR on the transcriptional level of autophagy-related genes($\bar{x} \pm s$, n=8)

*P<0.05 vs control group

2.3 微囊藻毒素 -LR 对细胞色素 C 分布的影响

线粒体去极化伴随着膜通透性转变孔(mitochondiral permeability transition pore,MPTP)的开放,导致线粒体内的细胞色素 C 释放到胞浆[21]。结果显示,微囊藻毒素 -LR 处理的小鼠,其肝细胞胞浆中细胞色素 C 的含量明显高于空白对照组。

2.4 微囊藻毒素 -LR 对小鼠肝细胞线粒体形态和内部结构的影响

为了进一步证明微囊藻毒素 -LR 对小鼠肝细胞线粒体的损伤,通过电子显微拍照观察线粒体的形态和内部结构。正常小鼠肝细胞线粒体外部膜结构完整,内部嵴排列整齐;低浓度微囊藻毒素 -LR 喂养的小鼠肝细胞线粒体肿胀变形,内部呈絮状结构,并出现空白区域;高浓度微囊藻毒素 -LR 喂养的小鼠肝细胞线粒体内部结构完全丧失,伴随着外膜破裂等现象。

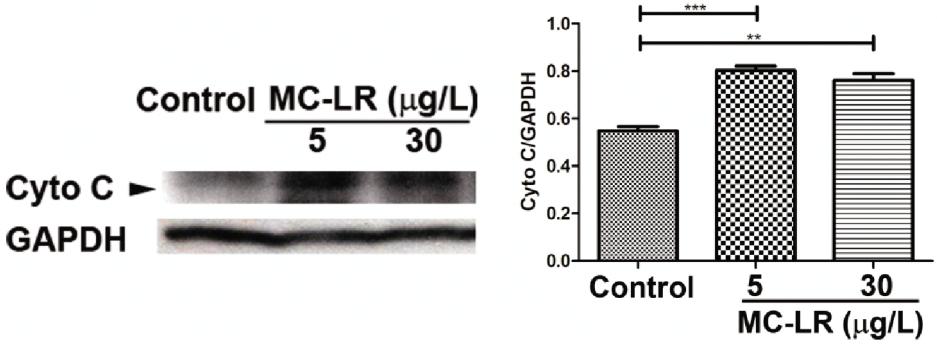

图 3 微囊藻毒素 -LR 对细胞色素 C 分布的影响

Fig.3 Effects of MC-LR on the release of cytochrome C

***P<0.001 vs control group **P<0.01 vs control group

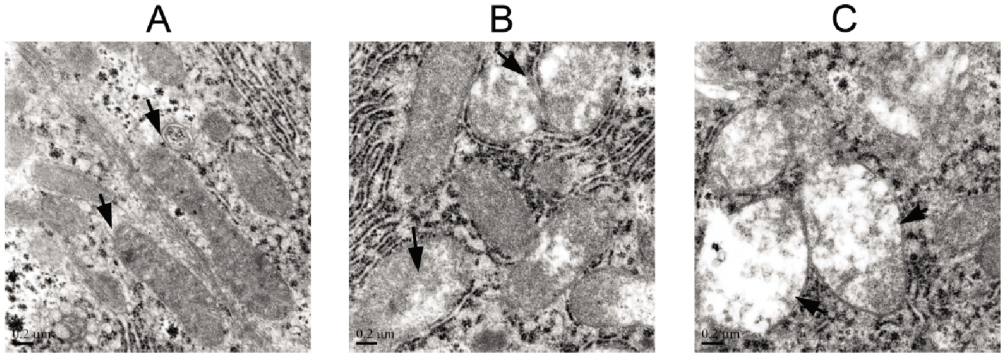

图 4 微囊藻毒素 -LR 对小鼠肝细胞线粒体形态和内部结构的影响

Fig.4 Morphological changes of mitochondria after treatment with MC-LR

A:Control; B: MC-LR (5 μg/L); C:MC-LR (30 μg/L)

3 结果

微囊藻毒素对动物及人类的毒理作用是多方面的,如肝肾毒性、神经毒性和胃肠道组织病理学改变等。其中有关微囊藻毒素肝毒性的报道最多,研究表明,微囊藻毒素能够导致细胞内多种蛋白质磷酸化和去磷酸化调节失衡,诱导中间纤维网络的重排,引起细胞骨架系统的破坏,从而引起肝细胞变性。本实验旨在进一步观察微囊藻毒素 -LR 对单一细胞器功能的影响。

预实验中发现线粒体膜电位随着体外处理时间的延长而逐步消失,为了避免非实验因素造成的线粒体去极化现象,应优化体外实验方法、减少操作时间。例如,将解偶联剂 CCCP 的处理时间从 20 min 减少至 1 min,在不会影响其降低线粒体膜电位功能的同时有效提高了实验的精确性。两种自噬相关基因 Beclin1 和 Lc3α 的变化趋势不同,可以推测微囊藻毒素 -LR 是特异性地上调部分基因的转录水平,激活相关信号通路,从而完成对损伤线粒体的清除。利用 Western blot 检测微囊藻毒素 -LR 对细胞色素 C 分布的影响时,由于样品是从单个小鼠肝脏分离提取得到的蛋白,存在个体差异性,因此细胞色素 C 由线

粒体向胞浆的释放程度不存在严格的微囊藻毒素 -LR 浓度依赖性。

相关研究表明,微囊藻毒素能使肝细胞的细胞周期发生改变,高浓度的微囊藻毒素抑制细胞生长,表现出细胞凋亡的特点[22];低浓度的微囊藻毒素则促进肝细胞不断增殖,导致肝细胞癌变[23]。无论是细胞凋亡还是细胞癌变,线粒体作为"动力工厂",都发挥着重要的作用。因此在进一步研究微囊藻毒素毒性的相关机制时,可以将线粒体自噬这一细胞自我修复功能作为参考。

参 考 文 献(References)

[1] Yan T, Zhou MJ. Environmental and health effects associated with Harmful Algal Bloom and marine algal toxins in China [J]. Biomed Environ Sci, 2004, 17(2): 165-176

[2] Boaru DA, Dragos N, Welker M, et al. Toxic potential of microcystin-containing cyanobacterial extracts from three Romanian freshwaters [J]. Toxicon, 2006, 47(8): 925-932

[3] Dos SVJM, de PAMT, de Oliveira Azevedo SM, et al. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region [J]. Toxicon, 2005, 45(7): 901-909

[4] Kurmayer R, Christiansen G, Gumpenberger M, et al. Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus Planktothrix[J]. Microbiology, 2005, 151(Pt 5): 1525-1533

[5] Jayaraj R, Lakshmana Rao PV. Protein phosphorylation profile and adduct formation in liver and kidney of microcystin-LR-treated mice [J]. Toxicon, 2006, 48(3): 272-277

[6] Botha N, van de Venter M, Downing TG, et al. The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice[J]. Toxicon, 2004, 43(3): 251-254

[7] Liu Y, Song L, Li X, et al. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, Misguruns mizolepis Gunthe[J]. Toxicon, 2002, 40(4): 395-399

[8] Suput D, Zorc-Pleskovic R, Petrovic D, et al. Cardiotoxic injury caused by chronic administration of microcystin-YR [J]. Folia Biol (Praha), 2010, 56(1): 14-18

[9] Wang X, Ying F, Chen Y, et al. Microcystin (-LR) affects hormones level of male mice by damaging hypothalamic-pituitary system [J]. Toxicon, 2012, 59(2): 205-214

[10] Kubli DA, Gustafsson AB. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control[J]. Circ Res, 2012, 111(9): 1208-1221

[11] Bhatia-Kissova I, Camougrand N. Mitophagy: a process that adapts to the cell physiology[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(1): 30-33

[12] Ding WX, Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis[J]. Biol Chem, 2012, 393(7): 547-564

[13] Sun Y, Zheng Q, Sun YT, et al. Microcystin-LR induces protein phosphatase 2A alteration in a human liver cell line[J]. Environ Toxicol, 2013 Feb 22. doi: 10.1002/tox.21854

[14] Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts [J]. Nat Protoc, 2007, 2(2): 287-295

[15] Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, et al. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye [J]. Methods Enzymol, 1995, 260: 406-417

[16] Kwon KY, Viollet B, Yoo OJ. CCCP induces autophagy in an AMPK-independent manner[J]. Biochem Biophys Res Commun,2011, 416(3-4): 343-348

[17] Chu CT, Zhu J, Dagda R. Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death[J]. Autophagy, 2007, 3(6): 663-666

[18] Kawajiri S, Saiki S, Sato S, et al. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy[J]. FEBS Lett, 2010, 584(6): 1073-1079

[19] Kim I, Lemasters JJ. Mitochondrial degradation by autophagy (mitophagy) in GFP-LC3 transgenic hepatocytes during nutrient deprivation[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2011, 300(2): C308-317

[20] Ding WX, Li M, Biazik JM, et al. Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure[J]. J Biol Chem, 2012, 287(50): 42373-42378

[21] Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy[J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 462(2): 245-253

[22] Huang P, Zheng Q, Xu LH. The apoptotic effect of oral administration of microcystin-RR on mice liver[J]. Environ Toxicol, 2011, 26(5): 443-452

[23] Zhou L, Yu H, Chen K. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer[J]. Biomed Environ Sci, 2002, 15(2): 166-171