

网络出版时间:2016-06-08 16:21

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.07.005

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160608.1621.010.html>

低氧胁迫对鲢肝和脑细胞凋亡的影响

赵金坤¹, 梁宏伟², 邹桂伟², 王焕岭¹, 李忠²

(1 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070; 2 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223)

【摘要】【目的】通过磷脂结合蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V/PI)流式细胞分析法和原位末端脱氧核苷酸转移酶标记(TUNEL)法检测低氧胁迫下鲢肝、脑细胞的凋亡情况。【方法】将鲢分成对照组和低氧处理组, 对照组正常饲养, 低氧处理组用保鲜膜将水箱上口封住进行低氧处理, 分别在鲢浮头期以及死亡期取其肝、脑组织, 同时取对照组鲢肝、脑组织, 采用 Annexin V/PI 流式细胞分析法和 TUNEL 法检测其细胞凋亡情况。【结果】Annexin V/PI 流式细胞仪分析结果表明, 在鲢肝脏中细胞凋亡率依次是对照组 8.85%、低氧处理组浮头期 22.06%、低氧处理组死亡期 22.91%; 脑中细胞凋亡率依次是对照组 8.18%、低氧处理组浮头期 24.80%、低氧处理组死亡期 24.86%。TUNEL 法检测结果显示, 肝脏中细胞凋亡率是对照组 3.80%、低氧处理组浮头期 36.78%、低氧处理组死亡期 37.27%; 脑中细胞凋亡率依次是对照组 6.74%、低氧处理组浮头期 35.04%、低氧处理组死亡期 35.71%。与正常对照组比较, 低氧胁迫后鲢肝、脑细胞凋亡率极显著增大, 但随着低氧胁迫时间延长细胞凋亡率无明显差异。【结论】低氧胁迫会极显著促进鲢肝和脑细胞发生凋亡, 但鲢肝、脑组织中细胞凋亡率不会随着低氧胁迫时间延长而产生显著差异。

【关键词】 鲢; 细胞凋亡; 低氧胁迫; Annexin V/PI; TUNEL

【中图分类号】 S852

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)07-0034-05

Influence of hypoxic stress on apoptosis of hepatocyte and brain cells of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

ZHAO Jinkun¹, LIANG Hongwei², ZOU Guiwei², WANG Huanling¹, LI Zhong²

(1 College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China; 2 Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan, Hubei 430223, China)

Abstract: 【Objective】The apoptosis of hepatocyte and brain cells of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) under hypoxic stress was investigated by Annexin V/PI with flow cytometry and TUNEL. 【Method】Silver carp individuals were divided into normal control group and hypoxic stress treatment group. The normal control group was normally bred while the hypoxic stress treatment group was treated with hypoxia in water tank, which was sealed with plastic wrap. Samples of liver and brain of silver carp were collected from normal and treatment groups at floating and death stages to analyze the apoptosis of hepatocyte and brain cells using Annexin V/PI with flow cytometry and TUNEL. 【Result】Rates of hepatocyte apoptosis of silver carp were 8.85% for control group, 22.06% at floating stage and 22.91% at death stage. Rates of brain cells apoptosis were 8.18%, 24.80% and 24.86% accordingly. TUNEL measurement showed that rates of hepatocyte apoptosis were 3.80%, 36.78% and 37.27% for control, floating state and death stage, while those of brain cells apoptosis were 6.74%, 35.04% and 35.71%. Compared with the

【收稿日期】 2014-11-30

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31101894); “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD26B02); 现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-49-01)

【作者简介】 赵金坤(1989—), 男(满族), 辽宁本溪人, 在读硕士, 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: zjk1989akun@yeah.net

【通信作者】 李忠(1976—), 男, 山东济南人, 副研究员, 博士, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: Lizhong@yfi.ac.cn

control group, the apoptosis of hepatocyte and brain cells of silver carp was significantly increased under hypoxic stress. However, with the increase of hypoxia time, the number of apoptosis cells did not change significantly. 【Conclusion】 Hypoxia stress significantly promoted the apoptosis of hepatocyte and brain cells of silver carp and the rates were not significantly changed by hypoxia time.

Key words: silver carp; cells apoptosis; hypoxic stress; Annexin V/PI; TUNEL

细胞凋亡又称细胞程序性死亡,是指细胞在一定的生理或病理条件下,遵循自身程序,自己结束生命的过程。细胞凋亡是一个主动、高度有序、由基因控制以及一系列酶参与的过程,在保证多细胞生物健康生存过程中扮演着关键的角色^[1-3]。细胞凋亡概念的提出引起广大研究者的浓厚兴趣,随着细胞凋亡研究的不断深入,各种各样检测细胞凋亡的新技术和新方法相继建立。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,具有灵敏、快速、准确、并且能同时进行多种因素分析等特点。原位末端脱氧核苷酸转移酶标记(TUNEL)是分子生物学与形态学相结合的细胞凋亡检测方法,可对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色,能准确地反映细胞凋亡最典型的生物化学和形态特征^[4]。

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)属鲤科鲢亚科,是我国淡水养殖的主要鱼类之一。鲢对外界刺激应激强烈,耐低氧能力差,易泛塘,低氧胁迫会对其造成严重的影响。因此,研究鲢在低氧条件下的反应机制,对其生理特性及新品种的选育具有重要的指导价值。本研究采用磷脂结合蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V/PI)流式细胞分析法和 TUNEL 法对低氧胁迫下鲢肝、脑细胞的凋亡情况进行了检测,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 供试鲢来自中国水产科学院长江水产研究所窑湾试验场,体质量(63 ± 2) g/尾。

1.1.2 试剂及仪器 AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,购自南京碧波生物科技有限公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒,购自 Roche Applied Science 公司;流式细胞仪,购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 低氧处理 将鲢在循环水养殖系统中驯养,每个水箱($38 \text{ cm} \times 26 \text{ cm} \times 23 \text{ cm}$)投放 5 尾健康鲢,共 6 箱 30 尾鱼。1 周后分为对照组和低氧处理组,

每组 3 箱。试验期间用溶氧仪测定各处理水中溶氧量。对照组鲢正常饲养(溶氧量 6.85 mg/L);低氧处理组用保鲜膜将水箱上口封住,分别于鲢浮头期(低氧处理 6 h,此时溶氧量 0.72 mg/L)、死亡期(低氧处理 8 h,此时溶氧量 0.26 mg/L)时,迅速将试验鱼取出,同时取对照鱼,在超净工作台中解剖取组织,用于流式细胞仪检测的样品,每个处理采集 3 尾鲢的肝脏、脑组织,用含有双抗的 PBS 缓冲液暂时保存;用于 TUNEL 法检测的样品,每个处理采集 3 尾鲢的肝脏、脑组织,用 40 g/L 多聚甲醛固定保存。

1.2.2 单细胞悬液的制备 将用 PBS 保存的肝脏、脑组织分别用手术剪剪成 1 mm^3 的小组织块,用含有双抗的 PBS 缓冲液浸洗 5 次。将上述处理的组织用胰酶(2.5 g/L)消化 30 min。然后将消化好的组织过孔径 $74 \mu\text{m}$ 细胞筛,收集流穿液,加入含体积分数 10% 胎牛血清的 1640 培养基,200 g 离心 3 min,弃上清液,收集底部细胞,重复 3 次。最后用含体积分数 10% 胎牛血清的 1640 培养基悬浮细胞,即得单细胞悬液。

1.2.3 细胞凋亡的 Annexin V/PI 流式细胞仪检测 取 1.2.2 节制备好的单细胞悬液用 PBS 润洗 2 次,1 000 r/min 离心 10 min,去上清,加入体积分数 70% 冷乙醇 4°C 固定 30 min,离心去固定液,细胞用 PBS 重悬 5 min,离心去上清。向细胞沉淀样品中分别加入 $500 \mu\text{L}$ Binding Buffer, $5 \mu\text{L}$ AnnexinV-FITC 和 $5 \mu\text{L}$ PI,混匀,室温避光反应 15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.4 细胞凋亡的 TUNEL 法检测 用常规方法制备鲢肝脏和脑组织的石蜡切片,依次将其放入二甲苯 I、二甲苯 II、无水乙醇 I、无水乙醇 II 及体积分数 95%、90%、80%、70% 的乙醇中脱蜡,然后用蒸馏水浸泡 2 min。向脱蜡后的切片加蛋白酶 K 工作液($10 \sim 20 \mu\text{g/mL}$), $20 \sim 37^\circ\text{C}$ 反应 $15 \sim 30 \text{ min}$,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。向上处理所得切片滴加 $50 \mu\text{L}$ TUNEL 反应混合液, 37°C 避光孵育 60 min,然后用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。用吸水纸擦干玻片后加 $50 \mu\text{L}$ converter-POD 于标本上, 37°C 避光孵育 30 min, PBS 洗涤 4 次,每次 5 min。滴

加 50~100 μ L DAB 显色液,室温显色 0.5~5 min 或者根据显色情况延长显色时间,最后用自来水冲洗终止显色。显色后的切片用 Harris 苏木素复染 0.5~1 min,水洗后用体积分数 1% 盐酸酒精分化,再用 PBS 水洗反蓝,用体积分数 95% 乙醇脱水 5 min,再用无水乙醇脱水 2 次,每次约 3 min;二甲苯透明 2 次,每次 2 min,通风橱中风干后中性树胶封片。在显微镜下观察切片,并采集图像。

1.3 统计学分析

所有数据均以“平均值 $\pm$ 标准差”表示,采用 SPASS 17.0 统计软件进行分析,组间比较用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 Annexin V/PI 流式细胞分析法检测低氧胁迫下鲢肝、脑细胞的凋亡结果

Table 1 Apoptosis of <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> hepatocyte and brain cells under hypoxic stress detected by Annexin V/PI with flow cytometry		%	
组别 Group		肝 Liver	脑 Brain
正常对照组 Normal control group		8.85 $\pm$ 0.24 aA	8.18 $\pm$ 0.45 aA
低氧处理组 Hypoxic stress treatment group	浮头期 Floating stage	22.06 $\pm$ 0.57 bB	24.80 $\pm$ 0.63 bB
	死亡期 Death stage	22.91 $\pm$ 0.49 bB	24.86 $\pm$ 0.21 bB

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。表 2 同。
Note:Different lowercase letters mean significant difference($P<0.05$),different capital letters mean extremely significant difference($P<0.01$). The same for Table 2.

2.2 TUNEL 法检测低氧胁迫对鲢肝、脑细胞凋亡的影响

TUNEL 法染色后,正常对照组的细胞经苏木素复染后细胞核呈蓝黑色;TUNEL 阳性细胞形态学上表现为核固缩,胞体缩小,染色质凝聚,呈棕黄色或黄褐色颗粒,表现出凋亡的特征。本试验显微镜观察结果如图 1 和图 2 所示。

TUNEL 法检测低氧胁迫下鲢肝、脑细胞凋亡率统计结果如表 2 所示。由表 2 可知,对照组、低氧

2 结果与分析

2.1 Annexin V/PI 流式细胞分析法检测低氧胁迫下鲢肝、脑细胞凋亡情况

结果(表 1)显示,对照组和低氧处理组浮头期、死亡期鲢肝脏细胞凋亡率依次是 8.85%,22.06%和 22.91%;脑的细胞凋亡率依次是 8.18%,24.80%和 24.86%;与正常对照组相比,低氧处理组鲢浮头期和死亡期肝、脑细胞凋亡率均极显著增大($P<0.01$),但低氧处理组鲢浮头期和死亡期肝、脑细胞凋亡差异不显著($P>0.05$)。

处理浮头期和死亡期鲢肝脏中细胞凋亡率依次是 3.80%,36.78%和 37.27%,脑中细胞凋亡率依次是 6.74%,35.04%和 35.71%;与正常对照组相比,低氧处理组浮头期和死亡期鲢肝、脑细胞凋亡率均极显著增大($P<0.01$);低氧处理组鲢浮头期和死亡期肝、脑细胞凋亡差异不显著($P>0.05$)。这说明低氧胁迫会极显著促进鲢肝和脑细胞发生凋亡,但鲢肝、脑组织中细胞凋亡率不会随着低氧胁迫时间延长而产生显著差异。

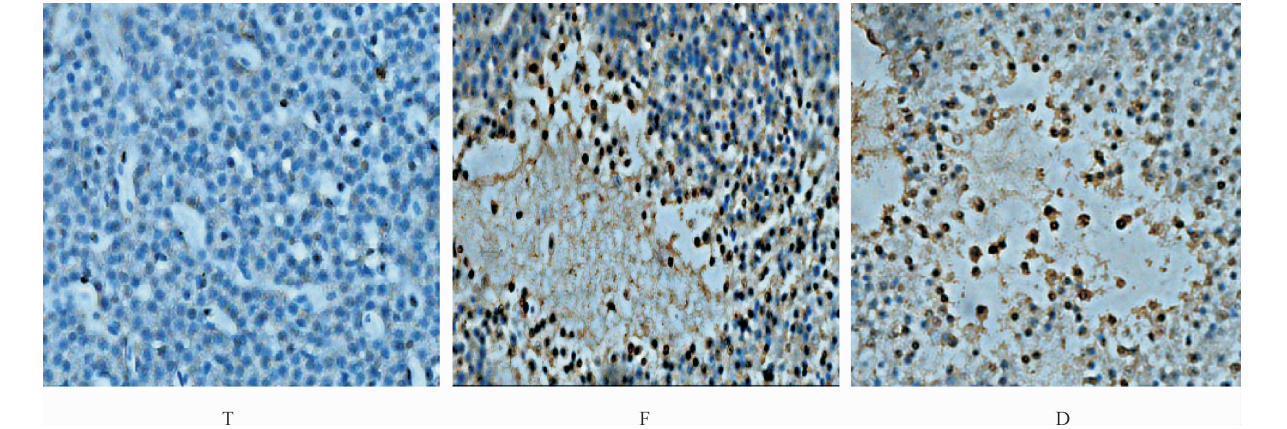


图 1 低氧胁迫下鲢肝细胞凋亡的 TUNEL 法检测结果

T. 正常对照组;F. 浮头期(低氧处理 6 h);D. 死亡期(低氧处理 8 h)

Fig. 1 Apoptosis of *Hypophthalmichthys molitrix* hepatocyte under hypoxic stress detected with TUNEL

T. Normal control group;F. Floating stage(6 h under hypoxic stress);D. Death stage(8 h under hypoxic stress)

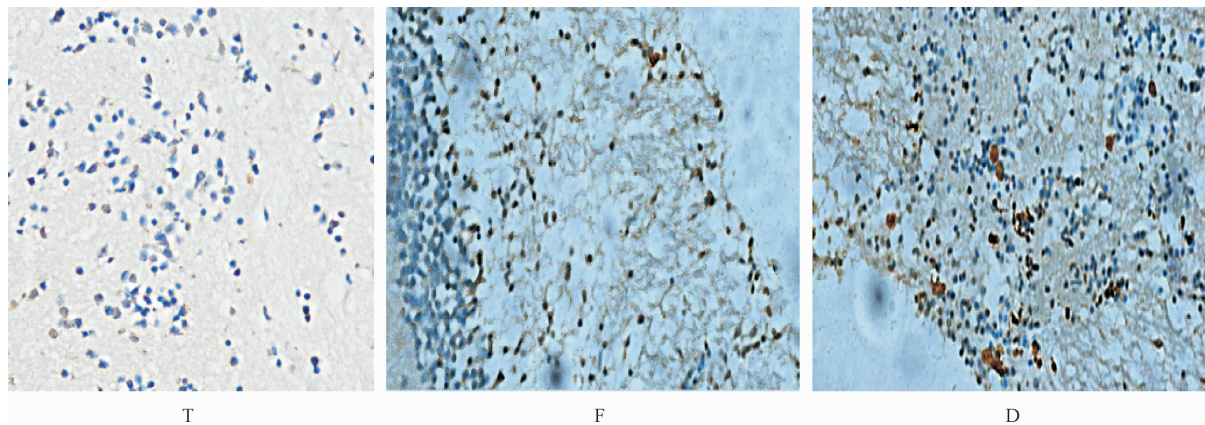


图 2 低氧胁迫下鲢脑细胞凋亡的 TUNEL 法检测结果
T. 正常对照组;F. 浮头期(低氧处理 6 h);D. 死亡期(低氧处理 8 h)

Fig. 2 Apoptosis of *Hypophthalmichthys molitrix* brain cells under hypoxic stress detected with TUNEL
T. Normal control group;F. Floating stage(6 h under hypoxic stress);D. Death stage(8 h under hypoxic stress)

表 2 TUNEL 法检测低氧胁迫下鲢肝、脑细胞的凋亡结果

Table 2 Apoptosis of *Hypophthalmichthys molitrix* hepatocyte and brain cells under hypoxic stress detected with TUNEL

组别 Group		肝 Liver	脑 Brain	%
正常对照组 Normal control group		3.80±0.16 aA	6.74±0.30 aA	
低氧处理组	浮头期 Floating stage	36.78±0.34 bB	35.04±0.40 bB	
Hypoxic stress treatment group	死亡期 Death stage	37.27±0.27 bB	35.71±0.41 bB	

3 讨 论

水体中溶解氧含量降低对鱼类可造成多方面的影响,鱼类在行为上会出现临界游泳速度降低、呼吸摄氧能力下降等^[5],从而影响到鱼类的洄游、觅食等生理活动^[6]。而鱼类的生理生化过程更是涉及到血管形成与氧气运输、细胞凋亡、细胞增殖、基因表达以及细胞结构等^[7]。大量动物试验研究发现,低氧可通过诱导 Rb 的磷酸化和 p27 的表达来降低 cyclin-CDK 复合物的活性,引起细胞周期阻滞,促进细胞凋亡,使 DNA 的合成和细胞数目显著降低^[8-10]。缺氧可引起肝细胞线粒体、生物膜损伤以及肝细胞氧化磷酸化,导致产能减少;缺氧还可引起钙超载触发细胞凋亡。线粒体功能受损还会引起肝脏氧自由基增多导致蛋白质、脂肪、DNA 氧化损伤,从而导致细胞凋亡^[11]。黎一鸣等^[12]在肝动脉缺血对肝细胞凋亡影响的研究中发现,氧自由基在肝动脉缺血诱发的肝组织细胞凋亡中发挥了重要的作用。氧自由基可促进组织中活性氧的产生,从而诱发细胞凋亡。本试验对低氧胁迫后鲢肝脏组织的细胞凋亡情况进行了检测,结果发现,低氧处理至鲢浮头再到死亡,肝细胞凋亡率较正常对照组极显著升高($P < 0.01$),但低氧处理组浮头期和死亡期肝细胞凋亡率

差异不显著,说明低氧可诱导鲢肝细胞的凋亡,但随着低氧处理时间的延长,肝脏组织凋亡细胞数目无显著差异。

中枢神经系统(CNS)对缺氧最为敏感,而且对缺氧的耐受性较差,缺氧可诱导中枢神经系统慢性或急性损伤。在脑缺氧损伤中,不仅存在细胞坏死发生,还存在细胞凋亡现象,细胞凋亡是脑缺氧后迟发性神经元死亡的重要表现形式^[13]。一些动物试验表明,脑缺氧缺血损伤后在细胞死亡过程中存在 2 个不同的阶段,第一阶段是在缺氧缺血损伤期间细胞主要以坏死形式发生,在这一阶段细胞死亡涉及神经胶质和神经元细胞;第二阶段是延迟发生,细胞以凋亡为主,在这一阶段细胞选择性涉及神经元死亡,即迟发性神经元死亡^[14-15]。本试验对低氧胁迫后鲢脑组织的细胞凋亡情况进行了检测,结果发现,低氧处理至鲢浮头再到死亡,脑细胞凋亡率较正常对照组极显著升高($P < 0.01$),但浮头期和死亡期脑细胞凋亡率差异不显著,说明低氧可诱导鲢脑细胞的凋亡,但随着低氧处理时间的延长,脑组织凋亡细胞数目无显著差异。

本试验低氧处理浮头期和死亡期鲢肝、脑细胞凋亡率无显著差异的原因可能是,低氧诱导细胞凋亡存在一个临界值,当氧浓度下降到这一临界值时,

细胞凋亡率的增加不明显^[16]。

[参考文献]

- [1] 刘海峰,孙文汇,高洪,等. 细胞凋亡的特征及其检测方法[J]. 动物医学进展,2008,29(3):106-108.
Liu H F, Sun W H, Gao H, et al. The features and detection methods of cell apoptosis [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(3): 106-108.
- [2] Häcker G. The morphology of apoptosis [J]. Cell and Tissue Research, 2000, 301(1): 5-17.
- [3] Fadok V A, Voelker D R, Campbell P A, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages [J]. The Journal of Immunology, 1992, 148(7): 2207-2216.
- [4] 郭晓红,刘立新. AnnexinV/PI 流式细胞仪分析法和 TUNEL 法检测肝细胞凋亡的对比研究 [J]. 山西医科大学学报, 2008(5): 476-479.
Guo X H, Liu L X. Comparative study on AnnexinV/PI and TUNEL in detecting hepatocyte apoptosis [J]. Journal of Shanxi Medical University, 2008(5): 476-479.
- [5] 赵文文,曹振东,付世建. 溶氧水平对鳊鱼、中华倒刺鲃幼鱼游泳能力的影响 [J]. 水生生物学报, 2013, 37(2): 314-320.
Zhao W W, Cao Z D, Fu S J. The effects of dissolved oxygen level on the swimming performances of juvenile *Parabramis Pekinensis* and *Spinibarbus Sinensis* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(2): 314-320.
- [6] Zeng L Q, Cao Z D, Fu S J, et al. Effect of temperature on swimming performance in juvenile southern catfish *Silurus meridionalis* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2009, 153(2): 125-130.
- [7] 钟雪萍,王丹,张义兵,等. 鲫鱼低氧相关基因差减 cDNA 文库的构建与分析 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(1): 113-118.
Zhong X P, Wang D, Zhang Y B, et al. Construction and analysis of the subtractive cDNA library of crucian carp induced by hypoxia [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(1): 113-118.
- [8] Pillai M S, Sapna S, Shivakumar K. p38 MAPK regulates G1-S transition in hypoxic cardiac fibroblasts [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2011, 43(6): 919-927.
- [9] Goda N, Ryan H E, Khadivi B, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α is essential for cell cycle arrest during hypoxia [J]. Molecular and Cellular Biology, 2003, 23(1): 359-369.
- [10] Seim J, Graff P, Åmellem Ø, et al. Hypoxia-induced irreversible S-phase arrest involves down-regulation of cyclin A [J]. Cell Proliferation, 2003, 36(6): 321-332.
- [11] 荣黎,曾维政,吴晓玲. 高原缺氧与肝脏损伤 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(21): 2171-2178.
Rong L, Zeng W Z, Wu X L. High-altitude hypoxia and liver injury [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009, 17(21): 2171-2178.
- [12] 黎一鸣,徐心,吉鸿,等. 肝动脉缺血对肝细胞凋亡的影响及其机制初探 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2002, 23(4): 393-394.
Li Y M, Xu X, Ji H, et al. Effects of hepatic artery ischemia on hepatocytic apoptosis and its mechanism [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Med Sci), 2002, 23(4): 393-394.
- [13] 张桂林. GM1 对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤细胞凋亡的作用 [D]. 广州:第一军医大学, 2000.
Zhang G L. Roles of GM1 on the brain cell apoptosis after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2000.
- [14] Beilharz E J, Williams C E, Dragunow M, et al. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat; evidence for apoptosis during selective neuronal loss [J]. Molecular Brain Research, 1995, 29(1): 1-14.
- [15] Nitatori T, Sato N, Waguri S, et al. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis [J]. The Journal of Neuroscience, 1995, 15(2): 1001-1011.
- [16] Parrinello S, Samper E, Krtolica A, et al. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts [J]. Nature Cell Biology, 2003, 5(8): 741-747.
- [25] 锡林塔娜,蒙荣,慕宗杰. 内蒙古四子王旗短花针茅荒漠草原群落间关联分析 [J]. 畜牧与饲料科学, 2008, 29(6): 6-9.
Xilintana, Meng R, Mu Z J. Correlation analysis of interspecific relationship of community in *Stipa breviflora* desert steppe in Siziwang Banner in Inner Mongolia [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2008, 29(6): 6-9.
- [26] 吕世杰,刘红梅,吴艳玲,等. 放牧对短花针茅荒漠草原建群种与优势种空间分布关系的影响 [J]. 应用生态学报, 2014, 25(12): 3469-3474.
Lü S J, Liu H M, Wu Y L, et al. Effects of grazing on spatial distribution relationships between constructive and dominant species in *Stipa breviflora* desert steppe [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(12): 3469-3474.

(上接第 33 页)