

维生素C对异育银鲫原代肝脏细胞活性及 抗敌百虫氧化胁迫的影响

徐维娜, 刘文斌*, 邵仙萍, 蒋广震, 张薇薇, 王莹, 张春暖

(南京农业大学动物科技学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 用含不同浓度维生素C(0, 50, 100, 200, 400和800 $\mu\text{mol/L}$)的培养液培养异育银鲫原代肝脏细胞, 待细胞融合后, 测定细胞活性、细胞内维生素C含量, 乳酸脱氢酶(LDH)活性。再将用维生素C培养的肝脏细胞经敌百虫胁迫24 h, 测定细胞内总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和丁酰胆碱酯酶(B-ChE)活性以及细胞内细胞色素P450(CYP450)含量。结果表明, 与未添加维生素C组相比, 在100 $\mu\text{mol/L}$ 的维生素C剂量组, 肝脏细胞活性显著高于较其它剂量组($P < 0.05$); 细胞内维生素C的含量随着培养液中维生素C的增加而增加, 且差异显著($P < 0.05$); 在800 $\mu\text{mol/L}$ 维生素C剂量组, 细胞LDH活性显著增加($P < 0.05$), 但是其它剂量组均无显著变化。肝脏细胞经敌百虫胁迫后, 在50、100和200 $\mu\text{mol/L}$ 维生素C剂量组, 细胞T-AOC能力, GST活性, B-ChE活性和CYP450含量显著升高($P < 0.05$), 细胞解毒和抗氧化能力增强; 但是当维生素C的剂量为400和800 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞T-AOC能力和GST活性降低。综上所述, 在体外细胞培养液中添加在50~200 $\mu\text{mol/L}$ 剂量范围的维生素C可以促进原代肝脏细胞生长, 增强细胞解毒能力, 提高细胞的抗氧化水平。

关键词: 异育银鲫; 维生素C; 细胞活性; 氧化应激; 原代肝脏细胞

中图分类号: Q 954.6; S 917.4

文献标志码: A

维生素C又称抗坏血酸(ascorbic acid), 是维持鱼类正常生理功能必不可少的微量营养素^[1-2], 通常要在鱼类饲料中添加维生素C来满足鱼类对其的基本营养需求。除了营养功能, 作为一种抗氧化剂和免疫增强剂^[3-5], 维生素C可促进细胞生长, 提高机体抗氧化胁迫的能力。大量的体外研究试验表明, 维生素C对机体细胞起着积极的保护作用^[6], 提高细胞的抗氧化应激能力。维生素C可防止鱼类精子DNA的氧化损伤, 维持精子细胞的组合^[7], 可以增强小鼠细胞在氯氰菊酯胁迫下的抗氧化应激能力, 提高细胞内谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性^[8]。维生素C可以提高HL60细胞抗砷胁迫能力, 清除细胞内过量的自由基, 增加细胞内谷胱甘肽过氧化酶的活性^[9]。

敌百虫是水产养殖中广泛应用的一种有机磷杀虫剂, 但敌百虫在杀灭寄生虫的同时还能对水体中的鱼类产生广泛的毒副作用^[10-14], 敌百虫可以引起鱼体胆碱酯酶失活^[15-16]。体外试验证明, 当细胞培养液中敌百虫的浓度为0.1 mg/L, 可导致肝脏细胞内线粒体结构损伤, 功能出现障碍, 线粒体膜的通透性改变而使得细胞凋亡因子从线粒体外泄到胞质中而激活半胱天冬酶-3活性而启动凋亡^[17]。目前, 关于维生素C对促进体外培养鱼类细胞生长、抗有机磷氧化胁迫的研究未见报道。本试验以体外培养的异育银鲫原代肝脏细胞为试验材料, 选用维生素C为细胞培养液营养调控物, 通过测定细胞增值水平和细胞抗敌百虫胁迫能力, 从细胞水平来探讨维生素C对鱼类肝脏细胞的促生长和保护作用, 为研究维生素C

收稿日期:2011-06-15 修回日期:2011-09-28

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-20);江苏省科技支撑计划(BE2010394)

通讯作者:刘文斌, E-mail: wbliu@njau.edu.cn

对鱼类肝细胞保护作用及抗有机磷农药毒性方面提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验试剂

敌百虫纯品(Sigma公司);达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)、F-12培养液、胎牛血清、无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 磷酸缓冲盐溶液(PBS)、0.25%胰酶、青链霉素(10 000 IU/mL青霉素钠,10 000 IU/mL链霉素)和台盼蓝试剂均购自GIBCO BRL(Grand Island,美国);25 mL可透气细胞培养瓶、6孔培养板和96孔细胞培养板均购自Corning, Inc(Corning,美国)。

1.2 肝脏细胞原代培养

根据XU等^[17]方法应用组织块培养法。解剖异育银鲫取出若干肝胰脏组织小块(避免将肠道剪破),将其置于含有双抗的PBS溶液中浸泡3~5 min,弃去PBS,再用不含双抗的PBS漂洗2~3次后将组织块剪成 1 mm^3 大小的组织块后接种到25 mL可透气细胞培养瓶中,待组织块固化后加入含15%胎牛血清,100 mg/L双抗的DMEM/F12培养液3 mL进行培养,每3天更换一次培养液。定期观察细胞生长状况^[17]。

待肝脏细胞形成单层后,用0.25%胰蛋白酶在常温下消化5 min,加入含血清的培养液终止消化,得到细胞混合液。然后吸取含细胞混合液于10 mL的离心管中进行离心(1 000 r/min),离心5 min,去上清含酶溶液,加入PBS液制成细胞悬液($1 \times 10^6/\text{mL}$)。取一滴细胞悬液用0.4%台盼蓝染色进行细胞计数并计算细胞存活率[细胞存活率(%) = 活细胞数/细胞总数 $\times 100$],存活率在90%以上可用于试验。应用PAS法染色,肝脏细胞可被染成粉红色,计算细胞数,当细胞80%被染色,则可用于后续的试验^[17]。

1.3 原代细胞维生素C处理试验

将培养好的原代肝脏细胞制成悬液($1 \times 10^6/\text{mL}$)并接种到6孔细胞培养板中,24 h后待细胞进入生长状态,进行试验分组,对照组继续用常规培养液,处理组则加入含有不同浓度维生素C的培养液,维生素C的浓度分别为50、100、200、400和800 $\mu\text{mol/L}$,每个处理组各设6个重复,对照组和处理组血清浓度保持一致,在5% CO_2 培养箱中培养,每3天更换一次培养液。待6孔板中

的细胞80%~90%融合后,分别收集各组细胞用于测定细胞内维生素C含量和乳酸脱氢酶(LDH)的活性。

1.4 细胞活性检测

应用CCK-8(Dojindo Laboratories, Kumamoto,日本)方法来分析肝脏细胞增殖情况^[18]。操作方法如下:将前期培养好的原代肝脏细胞制成悬液[(5~10) $\times 10^4/\text{mL}$]接种到96孔细胞培养板中,在25 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养48 h后,更换培养液,并在含不同维生素C浓度(0、50、100、200、400和800 $\mu\text{mol/L}$)的培养液中培养24 h,每个处理组各设6个重复,然后再在每孔中加入10 μL CCK-8处理液继续孵育4 h后,从培养箱中取出培养板,应用多功能酶标仪(Multiskan SPectrum, Thermo Scientific,美国)检测各孔OD值。

1.5 敌百虫胁迫试验

根据XU等^[17]研究结果,将“1.3”试验中培养好的各组细胞用含0.1 mg/L敌百虫浓度的培养液继续培养24 h,并设无敌百虫和维生素C处理组作为对照组,每个处理组各设6个重复收集细胞用于测定细胞中抗氧化应激指标。

1.6 指标测定

试验结束后收集细胞,制成浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 细胞悬液,用细胞破碎器破碎细胞,检测细胞内维生素C^[19]含量、乳酸脱氢酶(LDH)^[20]的活性,总抗氧化能力(T-AOC)^[17]、谷胱甘肽S-转移酶(GST)活性^[21]、丁酰胆碱酯酶(B-ChE)活性^[22]以及细胞内细胞色素CP450(CYP450)含量^[23]。细胞色素P450含量采用酶联免疫法(ELISA)测定,应用双抗体夹心法,用纯化的理科鱼类(斑马鱼)细胞色素P450抗体(Biodesign公司)包被微孔板,在往包被单抗的微孔中加入待测样品,再与辣根酶过氧化物酶标记的细胞色素P450抗体(CALBIOCHEM公司)结合,形成抗体—抗原—酶标抗体复合物,经显色反应用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度。总抗氧化能力单位定义为在特定条件下温度(25 $^\circ\text{C}$),每分钟每毫克组织蛋白,使反应体系的吸光度值,每增加0.01时,为一个总抗氧化能力单位(U)。肝脏细胞组织中蛋白含量测定采用考马斯亮兰法^[24]。以上指标所用试剂盒除ELISA试剂盒购自R&D systems(美国),其余均购自南京建成生物工程研

究所。

1.7 数据处理

试验数据用平均数 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示,用 SPSS 16.0 统计软件包进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Duncan 氏多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 维生素 C 对原代肝脏细胞活性的影响

与对照组相比,当培养液中维生素 C 剂量为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活性显著升高 ($P < 0.05$);当维生素 C 剂量为 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活性显著降低 ($P < 0.05$);维生素 C 剂量为 50、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活性与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。与 100 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 C 剂量组相比,200、400 和 800 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组的细胞活性显著降低 ($P < 0.05$),细胞活性随着外加维生素 C 浓度的增加而降低 (图 1)。

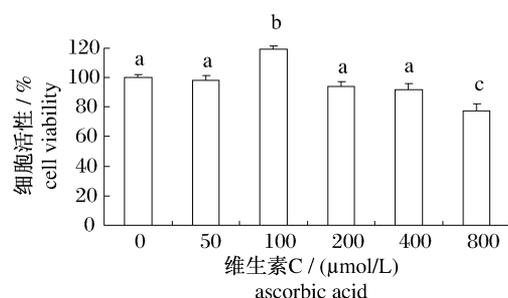


图 1 维生素 C 对肝脏细胞活性的影响 ($n = 6$)

柱形图上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Fig. 1 Effect of ascorbic acid on hepatocytes viability ($n = 6$)

Bars with different small letters mean significant differences ($P < 0.05$), and the same small letters mean no significant differences ($P > 0.05$).

2.2 原代肝脏细胞内维生素 C 含量变化

与未添加维生素 C 组相比,细胞培养液中添加维生素 C 后,各剂量组细胞内维生素 C 的含量显著增高 ($P < 0.05$);当维生素 C 的添加剂量为 200 和 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞内维生素 C 含量显著高于其它各剂量组 ($P < 0.05$) (图 2)。在 400 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组,细胞内维生素 C 的含量虽然高于未添加维生素 C 组但显著低于 200 和 800 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组 ($P < 0.05$),与 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。

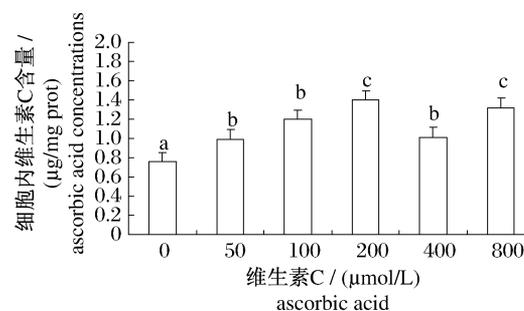


图 2 维生素 C 对肝脏细胞内维生素 C 含量的影响 ($n = 6$)

柱形图上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Fig. 2 Effect of ascorbic acid on intracellular ascorbic acid concentrations ($n = 6$)

Bars with different small letters mean significant differences ($P < 0.05$), and the same small letters mean no significant differences ($P > 0.05$).

2.3 原代肝脏细胞 LDH 活性变化

通过测定各组细胞 LDH 活性来衡量维生素 C 对原代肝脏细胞功能的影响,结果如图 3 所示。与未添加维生素 C 组相比,随着培养液中维生素 C 添加量的增加,细胞 LDH 活性呈现升高的趋势 ($P > 0.05$),且当维生素 C 剂量为 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,LDH 活性升高显著 ($P < 0.05$)。

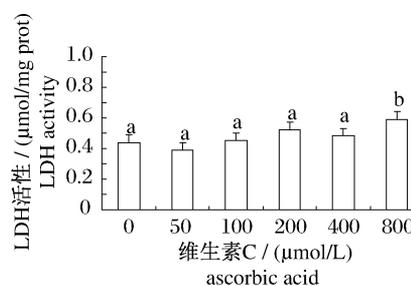


图 3 维生素 C 对肝脏细胞 LDH 活性的影响 ($n = 6$)

柱形图上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Fig. 3 Effect of ascorbic acid on intracellular LDH activities ($n = 6$)

Bars with different small letters mean significant differences ($P < 0.05$), and the same small letters mean no significant differences ($P > 0.05$).

2.4 敌百虫胁迫下原代肝脏细胞 T-AOC 和 GST 活性的变化

通过测定各组肝脏细胞 T-AOC 和 GST 活性来评价原代肝脏细胞的总抗氧化能力,结果如图

4所示。与对照组相比,0、100和200 $\mu\text{mol/L}$ 维生素C剂量组细胞的T-AOC显著增高($P < 0.05$)。与0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量维生素C组相比,当维生素C的添加剂量为100和200 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞经敌百虫胁迫后,其总抗氧化能力增加,差异显著($P < 0.05$)。当维生素C的浓度为400和800 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞的总抗氧化能力显著低于100和200 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组($P < 0.05$) (图4-a)。各组肝脏细胞GST活性的变化趋势与细胞T-AOC的一致,随着维生素C的添加剂量的增加呈现先升高后降低(图4-b)。与对照组相比,0、50、100、200、400和800 $\mu\text{mol/L}$ 维生素C剂量组细胞的GST活性显著增高($P < 0.05$)。与0 $\mu\text{mol/L}$ 维生素C剂量组相比,当维生素C的剂量为100和200 $\mu\text{mol/L}$ 时,GST活性显著增高($P < 0.05$)。当维生素C的浓度为400和800 $\mu\text{mol/L}$ 时,GST活性与0和50 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组相比无显著差异($P > 0.05$)。

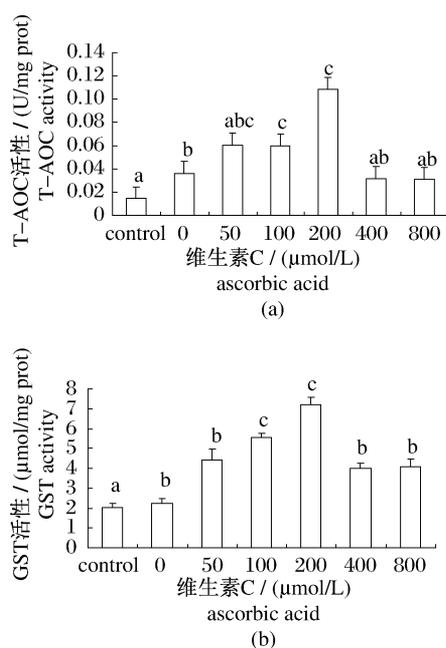


图4 维生素C对肝脏细胞T-AOC(a)和GST(b)活性的影响($n=6$)

柱形图上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

Fig. 4 Effect of ascorbic acid on intracellular T-AOC (a) and GST (b) activities ($n=6$)

Bars with different small letters mean significant differences ($P < 0.05$), and the same small letters mean no significant differences ($P > 0.05$).

2.5 敌百虫胁迫下肝脏细胞B-ChE活性和CYP450含量的变化

通过测定各组细胞B-ChE活性和CYP450含量来衡量细胞的解毒能力,结果如图5所示。与对照组和0 $\mu\text{mol/L}$ 维生素C剂量组相比,当维生素C组添加剂量为50、100、200和400 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞B-ChE活性显著增高($P < 0.05$);当维生素C组添加剂量为800 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞B-ChE活性无显著变化($P > 0.05$),但显著低于其它维生素C剂量组($P < 0.05$) (图5-b)。细胞CYP450含量变化如图5-b所示,与对照组和0 $\mu\text{mol/L}$ 维生素C剂量组相比,维生素C剂量为50 $\mu\text{mol/L}$,细胞CYP450含量无显著差异($P > 0.05$);维生素C剂量为100、200、400和800 $\mu\text{mol/L}$,细胞CYP450含量显著升高($P < 0.05$),且这四个剂量组之间的CYP450含量无显著差异($P > 0.05$)。

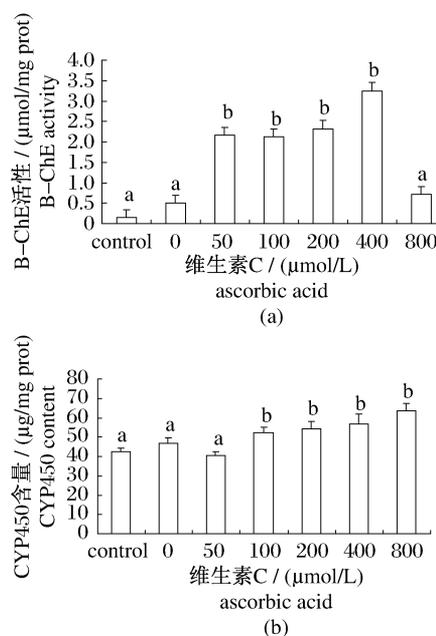


图5 维生素C对肝脏细胞B-ChE(a)活性及CYP450(b)含量的影响($n=6$)

柱形图上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

Fig. 5 Effect of ascorbic acid on intracellular B-ChE (a) activities and CYP450 (b) content ($n=6$)

Bars with different small letters mean significant differences ($P < 0.05$), and the same small letters mean no significant differences ($P > 0.05$).

3 讨论

3.1 维生素 C 对细胞生长的影响作用

细胞培养基是体外细胞生长的最重要的条件之一,不仅可以给细胞提供营养和促使细胞生长增殖的基础物质,还可提供培养细胞生长和繁殖的生存环境。培养液中的养分和氧份量越与体内环境接近,体外细胞的生长状况越好。此外,还会在培养液中额外添加一些营养或促生长因子来促进细胞增殖,使体外培养细胞达到一个更好的状态。目前,国内外众多学者都成功的培养出各种鱼类细胞,但是淡水鱼类肝脏细胞体外培养较少,且多停留在原代培养水平,这多是因为细胞在培养过程中增殖水平下降,活性降低,导致传代困难,因此在体外培养过程中,加入一些营养物质可以促进细胞生长,提高细胞的成活率。在本试验中发现,在培养液中额外添加剂量为 100 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 C,肝脏细胞能有效地吸收培养液中的维生素 C,细胞活性增强。一方面是因为维生素 C 本身是鱼类生长所必需的维生素,本身对细胞的生长具有营养作用;另一方面,维生素 C 可以提高细胞在体外培养环境中的抗胁迫能力,提高细胞的耐受性,增强细胞增值能力。但是本试验也发现当维生素 C 的剂量为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞内维生素 C 含量虽然高于未添加维生素 C 组,但是细胞活性却无显著变化,也许在此浓度下,细胞吸收外源维生素 C 来维持细胞自身营养和增值需求的能力达到了极限。李桂峰等^[25]研究表明饲料中添加维生素 C 对胡子鲶的淋巴细胞活性有明显的增强功能。本试验结果也表明,当维生素 C 的剂量为 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活性显著降低,说明高剂量的维生素 C 抑制了细胞生长。

细胞中 LDH 活性是衡量肝脏细胞功能的重要指标。细胞存活、细胞活性率高低直接依赖于细胞膜,而胞质内 LDH 的外漏水平直接反应细胞膜的损伤程度^[20,26],此外 LDH 与细胞能量代谢密切相关,其活性大小取决于细胞内氧分压高低,细胞内氧分压充足时,活性较低,当细胞出现胁迫导致细胞内缺氧,糖酵解代谢增强,而产生较多的乳酸(LD),而 LD 的积累会对细胞造成损伤,这时 LDH 活性升高以清除多余的 LD,因此,LDH 的升高反应着细胞内的功能,肝脏细胞内 LDH 的活性应维持在一定水平^[27]。在本试验中,维生素

C 的浓度为 50 ~ 400 $\mu\text{mol/L}$ 剂量时,LDH 的活性无显著变化,但是在高剂量 800 $\mu\text{mol/L}$ 组,活性则显著升高,说明细胞内可能出氧胁迫,需要调动糖酵解途径来给细胞提供能量。因此,初步认为培养液中维生素 C 的添加剂量范围应在 50 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$,对肝脏细胞的促生长作用较好。TANNETTA 等^[28]也认为在人滋养母细胞培养液中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的维生素 C 可以显著的提高细胞存活率,降低线粒体损伤。

3.2 维生素 C 抗敌百虫胁迫作用

B-ChE 属于假性胆碱酯酶类^[29]主要存在于肝脏中,能与有机磷毒剂或杀虫剂结合,并能水解许多酯类、肽类及酰胺类化合物,对这些化合物的中毒具有防治作用,也可以用来作为机体受胁迫或损伤的生物标记物^[30],此外有研究表明,B-ChE 还有促进细胞生长的作用^[31]。本研究结果表明,在细胞培养液中添加一定剂量的维生素 C 可以有效地增加 B-ChE 的活性,代谢敌百虫能力增强,降低了敌百虫对细胞造成的毒性,减缓细胞损伤;但是当维生素 C 的剂量为 800 $\mu\text{mol/L}$,该酶活性与无维生素组的活性相同,说明对细胞本身产生了毒性,此结果也与细胞活性变化结果一致。

CYP450 酶系是机体中催化外来物外来物包括如杀虫剂及其他环境有毒物质的主要酶系^[32]。环境外来物质可以与 CYP450 发生氧化、水解反应,形成的产物再和体内内源物质(如 SOD)的活性基团结合形成稳定的复合物,而改变了原环境物质的结构使其原有的生物学功能降低或丧失,将毒物安全排出体外,起到解毒作用^[33]。以 CYP450 酶系作为毒物毒性的生物学标志物已广泛应用于毒理学研究^[34-35]。目前有关研究已表明,鱼类 CYP450 在外源性化合物解毒的重要性已非常确定^[23],但是,有关鱼类 CYP450 药理毒理学上的研究报道较少,特别是体外研究。本试验通过 ELISA 的方法测定了敌百虫胁迫下肝脏细胞的 CYP450 含量,结果表明,维生素 C 可以显著提高细胞内的 CYP450 含量,加强细胞代谢敌百虫能力。但在 800 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组细胞 CYP450 含量上升,这与其它指标的变化不一致,具体原因有待进一步试验分析。

前期试验已经证明,敌百虫可以引起肝脏细胞氧化应激产生过量的自由基^[15-17],本试验测定

了维生素 C 对细胞抗氧化能力的影响。结果表明当维生素 C 的剂量为 50 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$, 细胞的抗氧化应激能力增强, 清除自由基能力加强, 减缓了敌百虫对细胞造成的氧化应激。但是当维生素 C 的剂量为 400 和 800 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其抗氧化能力降低, 说明该剂量范围维生素 C 细胞的抗氧化能力已受损, 不能有效清除敌百虫胁迫产生的自由基。这可能是由于维生素 C 的添加剂量已超过了细胞正常的吸收能力, 过多的维生素 C 细胞对细胞反而对细胞造成毒性, 从而加剧了自由基的产生和细胞氧胁迫的增强, 使得细胞总的解毒能力也降低。也有可能是维生素 C 作为一种抗氧化剂, 可以还原自由基, 添加在培养液中的过量的维生素 C 直接与自由基作用, 而减弱了细胞内的抗氧化能力。此外本试验还发现, 400 $\mu\text{mol/L}$ 的维生素 C 添加剂是一个转折点, 在该剂量时正常生理状态的细胞增值、解毒及代谢能力有降低的趋势, 说明该剂量对于体外培养的正常生理状态的肝脏细胞已是一个添加上限。因此, 本研究认为细胞培养液中添加 50 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ 剂量的维生素 C 可以促进肝脏细胞增殖, 增加细胞的抗胁迫能力。

参考文献:

- [1] HALVER J E, ASHLEY L M, SMITH R E. Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout [J]. Transaction of the American Fisheries Society, 1969, 98: 762 - 722.
- [2] MAZIK P M, BRANDT T M, TOMASSO J R. Effects of dietary ascorbic acid on growth, caudal fin development and tolerance of aquaculture related stressors in channel catfish [J]. Progress Fish Culture, 1987, 49: 13 - 16.
- [3] PACKER L. Protective role of vitamin E in biological systems [J]. Clinical Nutrition, 1991, 53: 1050 - 1055.
- [4] WALI T, VERLHAC V, GIRLING P. Influence of dietary ascorbic acid on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 2003, 225: 371 - 386.
- [5] ARU P T, BIDHAN C P. Use of vitamin C as an immunostimulant. Effect on growth, nutritional quality, and immune response of *Labeo rohita* (Ham.) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2008, 34: 251 - 259.
- [6] 李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 等. 维生素 C 对胡子鲶 *Claris fuscus* 细胞活性和血清因子的影响 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2005, 44(5): 75 - 83.
- [7] BALL B A, FAGNAN M S, DOBRINSKI I. Determination of acrosin amidase activity in equine spermatozoa [J]. Theriogenology, 1997, 48 (7): 1191 - 1198.
- [8] PATRICIA G, MARCO V, ELVIRA G. Vitamin C protects against *in vitro* cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes [J]. Toxicology In Vitro, 2005, 18: 13 - 19.
- [9] KATASAVVAS N, CARCAMO J M, STRATIS G, et al. Vitamin C protects HL60 and U266 cell from arsenic toxicity [J]. Blood, 2005, 105: 4004 - 4012.
- [10] GUIMARA A T B, SILVA de ASSIS H C, BOEGER W. The effect of trichlorfon on acetylcholine-sterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 68 (1): 57 - 61.
- [11] KUO C M. Effects of an organophosphorus insecticide, trichlorfon, on hematological parameters of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) [J]. Aquaculture, 2005: 383 - 392.
- [12] HONG X, QU J, CHEN J. Effects of trichlorfon on progesterone production in cultured human granulosa-lutein cells [J]. Toxicology In Vitro, 2007, 16: 1 - 7.
- [13] CHANG C. Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20: 574 - 585.
- [14] YEH S P, SUNG T G, CHANG C C, et al. Effects of an organophosphorus insecticide, trichlorfon, on hematological parameters of the giant freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) [J]. Aquaculture, 2005, 243: 383 - 392.
- [15] 徐维娜, 张鑫, 刘文斌. 敌百虫对异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 毒性及其影响因素的研究 [J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(S): 68 - 71.
- [16] 徐维娜, 谢国骝, 刘文斌, 等. 敌百虫胁迫对异育银鲫鱼体 4 种酶活性变化的影响 [J]. 环境科学学报, 2008, 28(6): 1199 - 1207.
- [17] XU W N, LIU W B, LIU Z P. Trichlorfon-induced apoptosis in hepatocyte primary cultures of *Carassius auratus gibelio* [J]. Chemosphere, 2009, 77: 895 - 901.

- [18] YOSHIMURA K, TANIMOTO A, ABE T. Shiga toxin 1 and 2 induce apoptosis in the amniotic cell line [J]. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 2002, 9(1): 22–26.
- [19] DABROWSKI K, HINTERLEITNER S. Applications of a simultaneous assay of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic sulphate in biological materials [J]. *Analyst*, 1989, 114: 83–87.
- [20] RAMESH M, SIVAKUMARI K, KANAGARAJ M K, *et al.* Toxicity of dye effluent in lactate dehydrogenase activity in *Labeo rohita* [J]. *Indian Journal of Environmental Protection*, 1993, 13: 124–127.
- [21] HABIG W H, PABST M J, JOKOBY W B. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249: 7130–7139.
- [22] ELLMAN G L, COURTNEY K D, ANDRES V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7: 88–90.
- [23] 陈大健. 鲫鱼肝微粒体细胞色素 P450 酶系的初步研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [24] BRADGORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248–254.
- [25] 李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 等. 维生素 C 对胡子鲶 *Claris fuscus* 细胞活性和血清因子的影响 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2005, 5(44): 75–83.
- [26] 高明辉. Vc、Ve 对亚硝酸盐胁迫下异育银鲫血液指标及抗氧化能力的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [27] DAS P C, AYYAPPAN S, JENA J K, *et al.* Effect of sub-lethal nitrite on selected haematological parameters in fingerling *Catla catla* (Hamilton) [J]. *Aquaculture Research*, 2004b, 35(9): 874–880.
- [28] TANNETTA D S, SARGENT I L, LINTON E A. Vitamins C and E inhibit apoptosis of cultured human term placenta trophoblast [J]. *Placenta*, 2008, 29: 680–690.
- [29] CHUIKO G M. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and *in vitro* inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology*, 2000, 127: 233–242.
- [30] MATTES C E, LYNCH T J, SINGH A. Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997, 145(2): 372–380.
- [31] ALBER R, SPORNS O, WEIKERT T. Cholinesterase and peanut agglutinin being related to cell proliferation and axonal growth in embryonic chick limbs [J]. *Anatomy and Embryology*, 1994, 190(5): 429–438.
- [32] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构功能与应用前景 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [33] 朱琳, 钱芸, 刘光良. 细胞色素 P450 酶系及其在毒理学上的应用 [J]. *上海环境科学*, 2001, 20(2): 88–89.
- [34] MILLER D S. Aquatic models for the study of renal transport function and pollutant toxicity [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1987, 71: 59–68.
- [35] KLEINOW K M, MELANCON M J, LECH J J. Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1987, 71: 105–119.

Effect of ascorbic acid on hepatocytes viability and antioxidant capability of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) *in vitro*

XU Wei-na, LIU Wen-bin*, SHAO Xian-ping, JIANG Guang-zhen,
ZHANG Wei-wei, WANG Ying, ZHANG Chun-nuan

(Key Lab of Aquatic Animal Nutrition and Feed Science of Jiangsu Province, College of
Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In the present study, the effect of ascorbic acid on primary cultured hepatocytes viability and antioxidant capability under trichlorfon stress were investigated in *Carassius auratus gibelio*. The hepatocytes were cultured with media containing 0, 50, 100, 200, 400 and 800 $\mu\text{mol/L}$ concentration ascorbic acid. Cell viability, the changes in hepatocytes lactate dehydrogenase (LDH) activity and ascorbic acid concentration were assayed. In addition, cellular intracellular total antioxidant capacity (T-AOC), glutathione-S-ePoxide transferase (GST) and butyrylcholinesterase (B-ChE) activities and cytochrome P450 (CYP450) concentration under trichlorfon stress were determined. The results showed that hepatocyte viability was significantly increased ($P < 0.05$) when cell was cultured with 100 $\mu\text{mol/L}$ concentrations ascorbic acid *in vitro* compared with control. Cellular ascorbic acid concentration was significantly increased with media contained 50, 100, 200, 400 and 800 $\mu\text{mol/L}$ concentration ascorbic acid. There were no significant changes in cellular LDH activity with media containing 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$ concentration ascorbic acid. But LDH activity was markedly ($P < 0.05$) increased when ascorbic acid concentration was 800 $\mu\text{mol/L}$. Under trichlorfon stress, the cellular antioxidant capability was increased significantly ($P < 0.05$) at 50, 100 and 200 $\mu\text{mol/L}$ concentration ascorbic acid treatments. In conclusion, ascorbic acid facilitated hepatocytes viability and function of anti-oxidative stress when cells were cultured with 50 – 200 $\mu\text{mol/L}$ concentrations ascorbic acid.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; ascorbic acid; cell viability; oxidative stress; primary cultures of hepatocytes

Corresponding author: LIU Wen-bin. E-mail: wbliu@njau.edu.cn