

文章编号: 1000- 0615(2004)06- 0733- 05

• 研究简报 •

## 喹乙醇诱导鲤肝细胞凋亡的研究

汪开毓<sup>1</sup>, 赵德明<sup>2</sup>, 耿毅<sup>1</sup>, 黄小丽<sup>1</sup>, 刘光迅<sup>3</sup>

(1. 四川农业大学水产系, 四川 雅安 625014;

2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094;

3. 四川省水产研究所, 四川 成都 617731)

关键词: 鲤; 细胞凋亡; 喹乙醇; 肝细胞;

中图分类号: S941.91

文献标识码: A

### Study on hepatic cells apoptosis induced by olaquinox in *Cyprinus carpio*

WANG Kai-yu<sup>1</sup>, ZHAO De-ming<sup>2</sup>, GENG Yi<sup>1</sup>, HUANG Xiao-li<sup>1</sup>, LIU Guang-xun<sup>3</sup>

(1. Department of Fisheries, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China;

2. Veterinary Medicine College, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

3. Sichuan Fisheries Research Institute, Chengdu 611731, China)

**Abstract:** Hepatic cells apoptosis induced by olaquinox in common carp, *Cyprinus carpio*, were studied. The test was conducted for 30 days, with dose of 200mg•kg<sup>-1</sup> feed. Terminal deoxynucleotidy transferase mediated dUTP-Biotin nick-end labeling (TUNEL), electronic microscopic and flow cytometry were performed to analyze apoptosis. The result showed that hepatic cells apoptosis were indentified under light microscope with TUNEL staining; chromatin condensation, chromosal clumping and margination, and apoptotic bodies were observed under electronic microscope; and sub-G<sub>1</sub> PEAK (AP peak) in hepatic cells could be detected by flow cytometric method. The apoptotic rate measured by flow cytometry increased with dye-poison time, on the 7th, 14th, 20th, 25th and 30th day, the apoptotic rate was 2.05%, 6.25%, 9.49%, 13.31% and 17.44% respectively.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; apoptosis; olaquinox; hepatic cell

细胞凋亡(apoptosis)是受基因控制的细胞自主的有序死亡。凋亡细胞的形态特征主要表现为细胞核的染色质浓缩,边移,聚集在核膜下,进而核发生裂解,核碎片与细胞碎片有单层膜包裹形成凋亡小体(apoptosis body)<sup>[1]</sup>。目前已发现某些物理因素(辐射、高温等)、细胞因子、病毒感染和化学药物等都可诱导细胞凋亡。喹乙醇作为一种氧化喹恶啉类化合物,具有促进鱼、虾生长的作用,但近年来

的研究发现喹乙醇具有蓄积毒性和诱变毒性,且对鱼类具有较大的危害,当鱼类中毒时表现为典型的“应激性出血症”,甚至发生死亡<sup>[2,3]</sup>。本试验采用电子显微镜观察法、原位末端标记法(TUNEL法)和流式细胞术对鲤经喹乙醇染毒后的肝细胞进行了细胞凋亡的检测,以深入探讨喹乙醇对鱼类的毒性作用机理。

收稿日期: 2003-10-27

资助项目: 四川省学术带头人后备人选资助基金

作者简介: 汪开毓(1955-),男,四川荣经人,教授,博士生导师,主要从事水生动物病理学与药理学的研究。Tel: 0835-2882327, E-

mail: kywang@scau.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验鱼:健康鲤,体重  $60 \pm 5$ g,体长  $12 \pm 1$ cm,购于雅安市鱼种站。

饲料:原料、日粮配方参照鲤的营养标准<sup>[4]</sup>。

主要试剂:喹乙醇由江苏南通醋酸化工厂兽药分厂生产,纯度98%。

### 1.2 方法

**饲养管理** 采用水族箱饲养,24h连续增氧;水源为经曝气去氯处理后的自来水,其pH值为6.8~7.2,水温25~28℃,溶氧8~12mg·L<sup>-1</sup>,其他水质指标符合渔业水质标准。

**实验染毒** 实验鱼80尾,随机分成2组,对照组40尾,实验组以200mg·kg<sup>-1</sup>饲料的喹乙醇剂量拌料连续饲喂进行染毒,分别于染毒后的7d、14d、20d、25d和30d剖杀4尾鱼取肝组织进行细胞凋亡检测。

**电子显微镜观察** 采取剖杀鱼的肝组织,2.5%戊二醛固定,乙醇脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀及柠檬酸铅染色,透射电镜观察。

**原位末端标记法(TUNEL法)** 原位末端标记试剂盒,购于南京建成生物工程研究所,操作参照其说明书进行。

**流式细胞仪(FCM)检测** 取剖杀鱼的肝组织,先机械处理成1mm<sup>3</sup>大小的碎块,用0.5%的Triton-100裂解组织,用70%的冷乙醇固定过夜,PBS液清洗,碘化丙啶(PI)染色液进行染色,4℃,15min以上,染色后的细胞悬液经70μm孔径的滤网过滤,调整细胞浓度到 $1 \times 10^6$ ind·mL<sup>-1</sup>,经美国产ELITE ESP COULTER流式细胞仪检测。

## 2 结果

### 2.1 电子显微镜观察

在染毒后7d肝细胞未见明显异常,在染毒后14d,部分肝细胞染色质浓缩,边移,呈半月状或新月状(图版-1);染毒后20d,肝细胞的染色质在浓缩的基础上发生裂解,呈大小不等的小团块,边移于核膜下(图版-2),内质网扩张;染毒后25d,裂解的染色质团块外包膜性结构,形成凋亡小体(图版-3),线粒体肿胀,内外膜间隙增宽,嵴增粗,内质网扩张,呈囊泡状;在染毒后30d,其凋亡细胞检出率更高,且有的细胞发生坏死表现为细胞膜、核膜不完整,线粒体肿胀,嵴断裂,甚至溶解消失,有的发生固缩。

### 2.2 原位末端标记法检测

根据凋亡细胞的核中有棕褐色颗粒的判定标准进行观察,在染毒后7d即有散在的单个凋亡细胞检出(图版-4),在14d、20d、25d和30d也都有检出,且检出率随时间的延长而升高(图版-5,6,7),对照组在整个实验过程中保持一个相对恒定且低的检出率(图版-8)。

### 2.3 流式细胞仪检测

流式细胞仪分析结果显示,鲤经喹乙醇染毒后,肝细胞DNA直方图出现位于G<sub>1</sub>峰之前的特异的亚G<sub>1</sub>峰(又称Ap峰)(图1~4)。在染毒后7、14、20、25和30d的细胞凋亡率与对照组细胞凋亡率见表1。

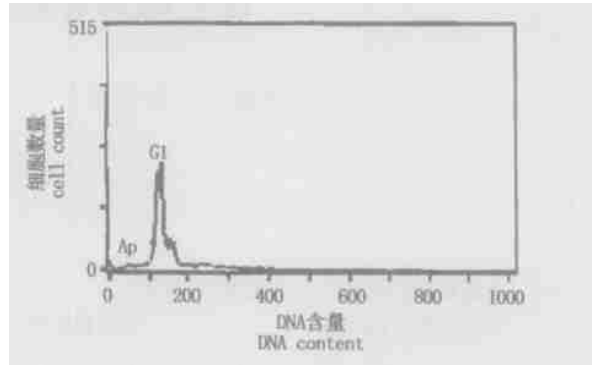


图1 对照组鲤肝细胞凋亡的DNA直方图

Fig.1 Histogram of DNA content and apoptosis in normal hepatic cell

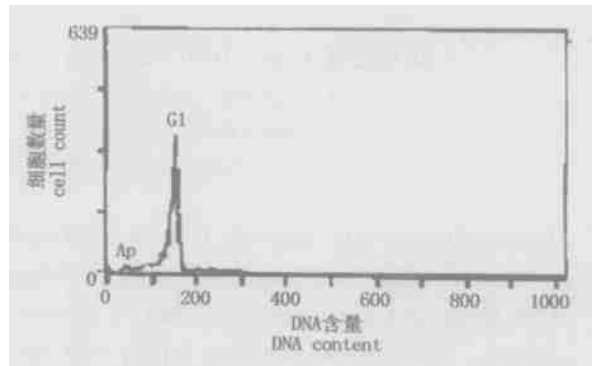


图2 喹乙醇染毒14d鲤肝细胞凋亡的DNA直方图

Fig.2 Histogram of DNA content and apoptosis in hepatic cell induced by olaquinox for 14 days

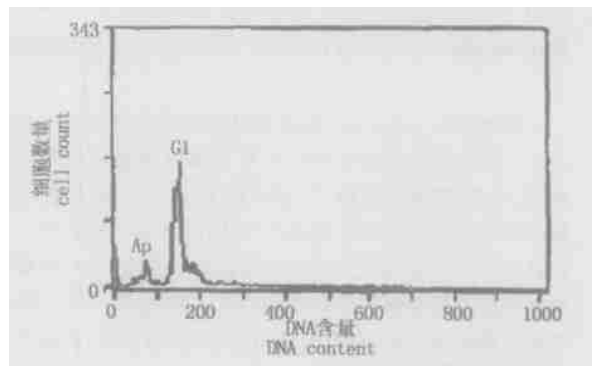


图3 喹乙醇染毒25d鲤肝细胞凋亡的DNA直方图

Fig.3 Histogram of DNA content and apoptosis in hepatic cell induced by olaquinox for 25 days

表 1 喹乙醇诱导鲤鱼肝细胞不同时期的凋亡率

Tab. 1 Apoptotic rate of the carp liver cell induced by olaquinox in different period

	时间(d) time	样本号 sample no.				平均数±标准差 mean±SD
		1	2	3	4	
实验组 experimental group	7	1.84	2.31	1.95	2.11	2.05±0.20 <sup>E</sup>
	14	6.12	7.14	5.28	6.47	6.25±0.77 <sup>D</sup>
	20	9.45	8.67	10.61	9.21	9.49±0.82 <sup>C</sup>
	25	12.42	14.07	13.85	12.90	13.31±0.78 <sup>B</sup>
	30	17.29	18.54	17.27	16.76	17.47±0.76 <sup>A</sup>
对照组 control	7	1.92	1.41	1.37	1.81	1.63±0.28 <sup>E</sup>
	14	1.83	1.54	2.03	1.87	1.82±0.20 <sup>E</sup>
	20	2.18	1.76	1.79	1.86	1.90±0.19 <sup>E</sup>
	25	1.95	1.94	1.52	1.68	1.77±0.21 <sup>E</sup>
	30	1.99	1.83	1.62	1.78	1.81±0.15 <sup>E</sup>

注: 平均数±标准差后, 有相同字母者, 表示组间差异不显著; 不同字母者, 表示组间差异显著; 其中大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Notes: In the same column, after mean±standard deviation, the same letter means the difference is not significant, while if not, it means the difference is significant (the capitalization for  $P < 0.01$ , the lowercase for  $P < 0.05$ ).

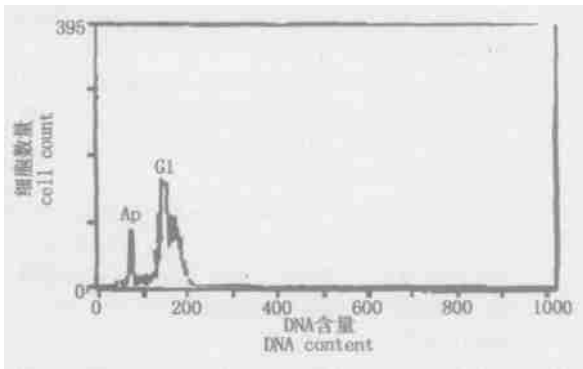


图 4 喹乙醇染毒 30d 鲤肝细胞凋亡的 DNA 直方图

Fig. 4 Histogram of DNA content and apoptosis in hepatic cell induced by olaquinox for 30 days

### 3 讨论与小结

由电子显微镜观察法、原位末端标记法和流式细胞仪检测法的细胞凋亡检测结果, 可看出喹乙醇可诱导鲤肝细胞凋亡, 且其凋亡率随染毒时间的延长而升高。在染毒后 7d 电子显微镜观察法结果未见明显的凋亡现象, 而在染毒后 14d 电镜下才能见到细胞凋亡现象, 但在原位末端标记法和流式细胞仪检测法在染毒后 7d 即可见到, 可见在检测细胞凋亡时, 最好是多种检测方法相结合进行, 特别是流式细胞仪检测法和原位末端标记法的特异性和灵敏性都较高, 可对早期凋亡细胞进行检测。

细胞死亡的方式有两种: 细胞坏死和细胞凋亡。细胞坏死是由于缺氧、机械损伤或接触了特定的毒素后造成的以膜破裂直至溶解, 并伴有炎症的现象。而细胞凋亡是不同于细胞坏死的一种死亡形式, 它是细胞接收死亡信号产生的一种受其自身基因调控的主动自杀过程。细胞凋

亡与细胞坏死在形态特征及生化特征上有明显差异, 凋亡细胞在形态上表现为胞浆浓缩, 核固缩, 裂解, 质膜内陷将细胞分为有膜包裹但内含物不外泄的凋亡小体; 生化特征为 DNA 凝胶电泳表现为梯状带<sup>[1]</sup>。鲤经喹乙醇染毒后, 肝细胞也呈现细胞凋亡的形态特征, 尤其是原位末端标记法检测出现阳性细胞和流式细胞仪检测出现细胞凋亡峰进一步佐证了形态观察的结果。

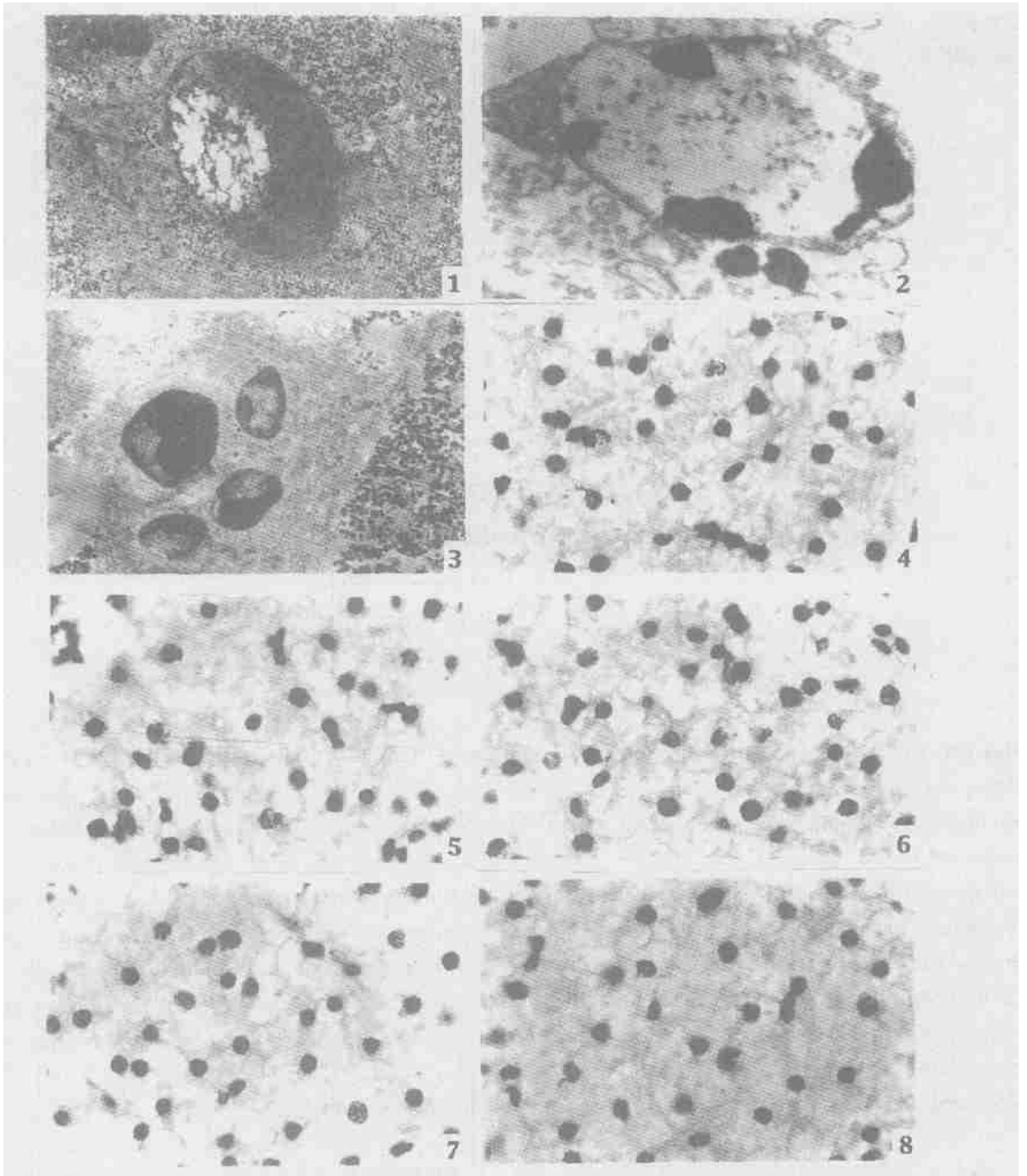
在本研究中不但观察到了细胞凋亡, 而且随染毒时间的延长, 在肝细胞观察到凋亡后于肝组织内发现大量成片的坏死肝细胞, 表现为核膜、胞膜不完整, 甚至消失, 线粒体肿胀, 嵴断裂, 溶解消失, 核降解, 染色质分解等与凋亡细胞明显不同。由于凋亡与坏死的双重作用加速了肝细胞的损伤, 引起鲤严重的肝功能障碍, 甚至死亡。这与张奇亚等报道的中华鳖病毒病病毒感染宿主细胞的病变基本一致<sup>[5]</sup>。最新的观点认为, 细胞内 ATP 水平是决定细胞凋亡还是坏死的主要原因, 只有细胞内维持一定的 ATP 水平时, 细胞才能保持正常的生存状态, 但细胞内 ATP 低于这一水平时, 细胞发生凋亡, 而严重降低时才会发生坏死<sup>[6]</sup>。Richer 认为决定细胞生存还是凋亡的 ADP/ATP 比值为 0.2<sup>[7]</sup>。本实验中坏死细胞线粒体的病变程度较凋亡细胞严重也证实了这一观点。

喹乙醇诱导鲤肝细胞凋亡的途径可能有两方面, 一方面是一种 DNA 损伤反应行为的表现, 因为在细胞内存在一个相当精细的机制感知 DNA 损伤, 其反应表现为修复、细胞周期抑制或凋亡<sup>[8]</sup>, 而喹乙醇具有蓄积毒性和诱变毒性<sup>[9]</sup>, 随染毒时间的延长, 药物在体内蓄积, 导致染色体畸变, 对 DNA 造成损伤, 机体通过凋亡的方式清除 DNA 受损的细胞, 表现为一种 DNA 损伤反应行为。另一方面, 由于喹乙醇可致鲤体内 SOD 酶活性降低<sup>[10]</sup>, SOD 是体内的一种重要的抗氧化酶, 能专一清除体内的活性氧

(ROS)如:  $O_2^{\cdot-}$ 、 $OH^{\cdot}$ 、 $H_2O_2$  等, SOD 活性降低, 必然引起体内 ROS 的升高, 而 ROS 是诱导细胞凋亡的重要因素之一, ROS 的作用靶点是线粒体, ROS 的产生及脂质过氧化导致  $Ca^{2+}$  从线粒体释放, 过多的细胞内  $Ca^{2+}$  又会导致 ROS 形成增多, 同时,  $Ca^{2+}$  的释放引起线粒体膜电位的崩溃, 线粒体功能丧失, 细胞 ATP 水平降低, 而导致凋亡的发生<sup>[11-13]</sup>。

### 参考文献:

- [1] Zhao W H, Shou H C, Yan F L. Apoptosis[M]. Zhengzhou: He Nan Medicine University Press, 1997. [赵卫红, 寿好长, 闫福岭. 细胞凋亡[M]. 郑州: 河南医科大学出版社, 1997.]
- [2] Geng Y, Wang K Y. The olaquinox should be used with care in aquaculture[J]. Water Conservancy and Fisheries, 1999, 19(6): 25- 26. [耿毅, 汪开毓. 喹乙醇在水产养殖上应慎用[J]. 水利渔业, 1999, 19(6): 25- 26.]
- [3] Wang K Y, Geng Y, Ye S G. Studies on pathology and tissue concentration of the chronic olaquinox poisoning in *Cyprinus carpio*[J]. J Fish China, 2003, 27(1): 75- 81. [汪开毓, 耿毅, 叶仕根. 鲤慢性喹乙醇中毒的病理学和组织残留的研究[J]. 水产学报, 2003, 27(1): 75- 81.]
- [4] Zeng H. Nutrient requirements of fish[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1993. 70- 71. [曾虹. 鱼类营养需要[M]. 北京: 中国农业科学出版社, 1993. 70- 71.]
- [5] Zhang Q Y, Li Z Q, Gui J F. Cellular pathological studies on virus infection of soft shelled turtles[J]. Chinese Journal of Virology, 1999, 15(1): 50- 54. [张奇亚, 李正秋, 桂建芳. 中华鳖病毒感染宿主的细胞病理学研究[J]. 病毒学报, 1999, 15(1): 50- 54.]
- [6] Teng X, Sun C P. Apoptosis and free radical[J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 1997, 1(15): 190- 191. [腾霞, 孙存普. 细胞凋亡和自由基[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1997, 1(15): 190- 191.]
- [7] Richer C, Schweizer M, Cossarizza A. Control of apoptosis by the cellular ATP level[J]. Febs Lett, 1996, 378: 107- 110.
- [8] Li X M. Progress of apoptosis[J]. Abroad medicine nuclear medicine fascicule, 1998, 22(3): 264- 268. [李西民. 细胞凋亡的研究进展[J]. 国外医学核医学分册, 1998, 22(3): 264- 268.]
- [9] Cao S Z, Zhang L, Liang J P. Progress of study on the special toxicology of quinoxaline 1, 4-dioxide-type antibacterial and growth-promoting agents[J]. Progress of Animal Medicine, 2001, 22(2): 17- 20. [曹随忠, 张力, 梁剑平, 等. 喹恶琳 1, 4-二氧化物类抗菌促生长剂特殊毒理学研究进展[J]. 动物医学进展, 2001, 22(2): 17- 20.]
- [10] Wang K Y, Geng Y. Studies on haematological changes in common carp by subacute toxicity test of olaquinox[J]. Acta Hydrobiol Sin, 2003, 27(1): 23- 26. [汪开毓, 耿毅. 鲤亚急性喹乙醇中毒的血液生化指标研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(1): 23- 26.]
- [11] Fan T J, Xia L, Han Y R. Mitochondrion and apoptosis[J]. Acta Biochemica et Biophysica Sinica, 2001, 33(1): 7- 12. [樊廷俊, 夏兰, 韩贻仁. 线粒体与细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(1): 7- 12.]
- [12] Zhao Y G, Xu J X. Mitochondrion, Reactive oxygen species and apoptosis[J]. Acta Biochemica et Biophysica Sin, 2001, 28(2): 168- 171. [赵云罡, 徐建兴. 线粒体, 活性氧和细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(2): 168- 171.]
- [13] Yang J, Gao F. Progress of reactive oxygen species and apoptosis[J]. Abroad Medicine Nuclear Tumour Fascicule, 2002, 29(4): 248- 251. [杨洁, 高飞. 活性氧与细胞凋亡的研究进展[J]. 国外医学肿瘤分册, 2002, 29(4): 248- 251.]



图版 Plate

1. 肝细胞染色质浓缩, 边移, 呈半月状,  $\times 15000$ ; 2. 染色质浓缩、裂解、边移于核膜下,  $\times 15000$ ; 3. 肝细胞凋亡小体形成,  $\times 20000$ ; 4. 染毒 7d 肝细胞凋亡,  $\times 1000$ ; 5. 染毒 14d 肝细胞凋亡,  $\times 1000$ ; 6. 染毒 25d 肝细胞凋亡,  $\times 1000$ ; 7. 染毒 30d 肝细胞凋亡,  $\times 1000$ ; 8. 对照组仅有很少的肝细胞凋亡,  $\times 1000$

1. chromatin condensation, margination, like half-moon in hepatic cell,  $\times 15000$ ; 2. condensation, cracking, margination of chromatin in hepatic cell,  $\times 15000$ ; 3. apoptosis bodies appeared in hepatic cell,  $\times 20000$ ; 4. apoptosis of hepatic cell induced by olaquinox for 7 days,  $\times 1000$ ; 5. apoptosis of hepatic cell induced by olaquinox for 14 days,  $\times 1000$ ; 6. apoptosis of hepatic cell induced by olaquinox for 25 days,  $\times 1000$ ; 7. apoptosis of hepatic cell induced by olaquinox for 30 days,  $\times 1000$ ; 8. apoptotic hepatic cell hardly been found in control group,  $\times 1000$