

贺云,陈艺生,任岚,等. 微囊藻毒素-LR 对小鼠原代肝细胞线粒体功能的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 816-822.

He Y, Chen YS, Ren L, et al. Mitochondrial function in microcystin-LR-induced primary mice hepatocytes [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 816-822.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.014

微囊藻毒素-LR 对小鼠原代肝细胞线粒体功能的影响

贺云¹, 陈艺生², 任岚¹, 尹一杰¹, 胡桂玲¹, 吴云丽^{1*}

(1. 福建医科大学基础医学院, 消化道恶性肿瘤教育部重点实验室, 福建省肿瘤微生物学重点实验室, 福州 350122; 2. 福建省立医院临床医学实验研究中心, 福州 350001)

【摘要】 目的 蓝藻水华引起的微囊藻毒素污染是世界性关注话题之一, 微囊藻毒素 LR (MC-LR) 具有强特异性肝毒性, 但其引起肝损伤的确切机制尚未完全阐明。为解决这一问题, 本研究从细胞分子层面探讨 MC-LR 造成肝细胞线粒体功能改变的分子机制。**方法** 提取小鼠原代肝细胞, 加入梯度剂量的 MC-LR (2.5 ~ 10 nmol/L) 作用 48 h, 以未加毒素处理组为对照, 检测 MC-LR 对线粒体功能的影响 (包括 ATP 水平和线粒体膜电位检测), DNA 损伤 (包括彗星试验和 8-OHdG 水平检测), 并分析 p53 抑制剂 pft- α 作用下线粒体功能损伤情况。**结果** MC-LR 造成肝细胞线粒体功能障碍, DNA 损伤且 p53 蛋白表达水平上调; p53 特异性抑制剂 pft- α 减轻 MC-LR 造成的线粒体损伤。**结论** 在本试验条件下, MC-LR 造成小鼠肝细胞线粒体功能异常的机制与其造成 DNA 损伤诱导 p53 上调有关。

【关键词】 微囊藻毒素-LR; 原代肝细胞; 线粒体功能; DNA 损伤; p53

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0816-07

Mitochondrial function in microcystin-LR-induced primary mice hepatocytes

HE Yun¹, CHEN Yisheng², REN Lan¹, YIN Yijie¹, HU Guiling¹, WU Yunli^{1*}

(1. Key Laboratory of Gastrointestinal Cancer (Fujian Medical University), Ministry of Education, Fujian Key Laboratory of Tumor Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China. 2. Center for Experimental Research in Clinical Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001)

Corresponding author: WU Yunli. E-mail: wuyunli422@163.com

【Abstract】 Objective Microcystin contamination caused by cyanobacteria blooms is a profound global concern. Microcystin-LR (MC-LR) was documented to induce potent hepatotoxicity, but the exact mechanisms have not been fully elucidated. To better understand the mechanisms, we conducted the following investigations. **Methods** Primary mouse hepatocytes were isolated, purified and exposed to a MC-LR concentration range of 2.5 ~ 10 nmol/L for 48 h with DMEM treatment as the negative control. Mitochondrial function (ATP levels and mitochondrial membrane potential), DNA damage (comet assay and 8-OHdG levels) and p53 expression were determined in MC-LR-treated cells and control cells. In

【基金项目】 福建省中青年教育科研项目 (JT180165), 福建医科大学启航基金项目 (2018QH1006), 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划 (2018B027)。

Funded by the Scientific Research Project for Young Teachers of Fujian Province (JT180165), Startup Fund for Scientific Research, Fujian Medical University (2018QH1006), Program for New Century Excellent Talents in Fujian Province University (2018B027)。

【作者简介】 贺云 (1990—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 肿瘤微生物学。Email: hey607@126.com

【通信作者】 吴云丽 (1984—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 乙型肝炎病毒感染发病机制。Email: wuyunli422@163.com

addition, experiments were repeated to assess mitochondrial function after pft- α preconditioning. **Results** MC-LR led to a progressive loss in ATP production and mitochondrial membrane potential in a dose-dependent manner. Furthermore, the comprehensive DNA damage examination and upregulated p53 protein level indicated that MC-LR was associated with DNA damage in primary mouse hepatocytes. However, when p53 was blocked by PFT- α , mitochondrial damage was attenuated after MC-LR treatment. **Conclusions** Together, these data indicate that MCLR-induced DNA damage promoted p53 production, which was associated with mitochondrial dysfunction.

【Keywords】 microcystin-LR; primary mouse hepatocyte; mitochondrial function; DNA damage; p53 gene

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着水体富营养化的加剧,蓝藻水华给生态环境造成极大压力。微囊藻毒素(microcystins, MCs)是蓝藻细菌的次级代谢产物,为单环七肽活性化合物,具有多脏器毒性,如肝毒性、肾毒性、神经毒性、心脏毒性以及肠道菌群改变等,可通过饮水、食物链传递及水上活动等方式进入动物和人体内,对人体及动物健康造成严重威胁^[1-3]。MCs 具百余种异构体,其中分布最广,毒性最强的是微囊藻毒素 LR (Microcystin-LR, MC-LR)^[4],被国际癌症研究机构(International Agency for Research in Cancer, IARC)定义为可致人类癌症的风险因素(II B 类)。肝作为 MC-LR 累积与作用的靶器官,极易受到损害,研究表明 MC-LR 可引起肝细胞病理学改变:肿胀、炎症,产生活性氧自由基并引起不可逆转的 DNA 损伤,与肝细胞坏死、肝癌发生具有密切联系^[5-7]。然而,MC-LR 的肝毒性机制及致癌机制尚不明确,此前很大一部分研究将细胞死亡归因于 MC-LR 引起的氧化应激^[5,8-10],线粒体功能改变在 MC-LR 诱导的氧化应激中发挥关键作用,甚至在诱导肝细胞死亡以及癌症发生发展过程中起重要作用^[10]。至于 MC-LR 如何诱发线粒体功能障碍方面的研究比较欠缺,具体机制尚不明朗。基于以上分析,该课题以小鼠原代肝细胞为模型,从分子水平上评估 MC-LR 造成线粒体功能异常的机制,旨在为 MC-LR 相关肝疾病的诊断和治疗策略提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

9 只 28 日龄 SPF 雄性 C57BL/6 小鼠,体重约为 10 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2017-0005】。饲养于福建医科大学实验动物中心【SYXK(闽)2016-007】。昼夜各半循环照明,相对湿度 40% ~ 70%,温度在 20 ~ 25℃ 之间。采用无菌营养颗粒料饲料,饮用水为高压的纯

净水,自由采食。动物实验通过福建医科大学动物伦理委员会审查(FJMU IACUC 2020-0115)。

1.1.2 主要试剂与仪器

MC-LR(ENZO, ALX-350-012), IV 型胶原酶(sigma, C5138),胎牛血清(PAN, P30-3302),青霉素和链霉素双抗生素溶液(Gibico, 15140-122), ATP 检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司, S0026), MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (Invitrogen, 34152), Reagent Kit for Single Cell Gel Electrophoresis Assay(Trevigen, 4250-050-K), Mouse 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) ELISA Kit(华美生物, CBS-E10527), GAPDH(Cell Signal, 2118), p53(Cell Signal, 2524)。

冷光仪(Berthold, 德国),激光共聚焦显微镜(Leica, 德国),荧光显微镜(Leica, 德国),分子成像仪(ImageQuant LAS 4000 mini, 美国),多功能酶标仪(Bio-Tek, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠原代肝细胞提取

采用改良二步灌注法分离提取原代肝细胞。28 日龄雄性小鼠深度麻醉后,开腹,从下腔静脉进针,剪断肝沿静脉,匀速灌注 20 mL 不含钙离子的 KRB 缓冲液,待血液冲洗干净后,换成 20 mL 含有 0.5% (w/v) IV 型胶原酶的灌注液同法操作。灌注完成后,摘下肝,释放细胞,通过 3 次低温低速离心去除杂质和死细胞。

1.2.2 细胞培养和毒素处理

纯化的原代细胞以合适的密度种植于鼠尾胶原包被的孔板中,使用含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素双抗生素溶液的 DMEM 培养基,放入含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养。贴壁后,加入 0 ~ 10 nmol/L 不同浓度 MC-LR 毒素进行细胞染毒,以未加 MC-LR 的细胞为对照,培养 48 h,进行后续试验检测。p53 抑制剂 pft- α (5 μ mol/L) 使用时间为处理毒素前 1 h。

1.2.3 线粒体功能检测

该实验中细胞内的 ATP 水平是由基于生物发光技术进行的,首先,冰上裂解细胞,4℃ 12 000 rpm 离心 10 min,取上清备用。使用 ATP 检测试剂盒中 ATP 检测工作液将检测板中作用 5 min,以降低本底。加入样品,迅速混匀,立即用冷光仪测定 CPM 值。根据标准曲线计算样品 ATP 浓度。

该研究使用 MitoProbe™ JC-1 Assay Kit,进行线粒体膜电位检测,具体步骤如下:用 PBS 缓冲液清洗细胞,加入终浓度为 10 μg/mL JC-1 染料,置于 37℃ 培养箱中,避光孵育 20 min, PBS 洗涤 2 次,使用激光共聚焦显微镜在 488 nm 激发波长下观察,拍照,并用 LAS AF LITE 软件计算各实验组的荧光强度。

1.2.4 DNA 损伤检测

彗星试验 (comet 试验):使用 Reagent Kit for Single Cell Gel Electrophoresis Assay 检测细胞 DNA 双链完整性。细胞用胰酶消化后,离心收集细胞,混合于低熔点琼脂糖中,转移至载玻片,低温冷却凝固,于 4℃ 预冷的细胞裂解液中裂解过夜。次日取出,用 pH > 13 的碱性电泳液中避光电泳 30 min。电泳结束后,清洗,染色,荧光显微镜观察,拍照。

使用 Mouse 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) ELISA Kit 检测 8-OHdG 生成水平:裂解细胞,取细胞上清,用样品稀释液稀释 20 倍。使用 HRP 标记待测样品,培养箱中孵育 30 min 后,洗板 3 次,显色后,用多功能酶标仪测定 450 nm 处吸光度值。根据

标准曲线计算相应 8-OHdG 浓度。

1.2.5 Western Blot 检测

提取细胞蛋白后,采用 BCA 蛋白定量法进行定量检测。取 30 μg 总蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,蛋白低温转移至 PVDF 膜, GAPDH, p53 抗体孵育过夜,HRP 标记的二抗处理后,洗膜 3 次,使用分子成像仪进行曝光显影,拍照。

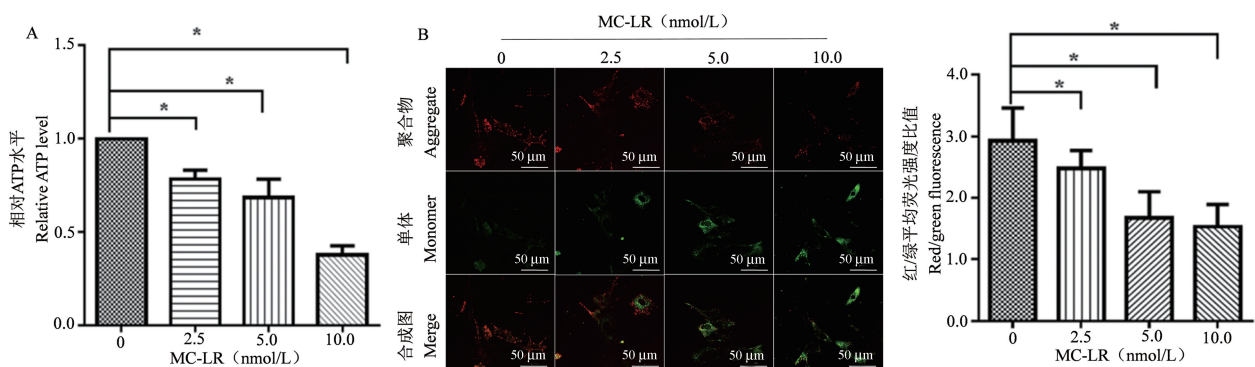
1.3 统计学分析

实验数据采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$),所有实验均重复 3 次,采用 *t* 检验或者方差分析统计实验组与对照组之间的差异,并用 GraphPad Prism 7.0 软件统计作图。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 MC-LR 造成线粒体功能障碍

为了检测线粒体功能,从线粒体膜电位 (MMP, $\Delta\psi_m$) 的变化和细胞能量代谢 (ATP) 变化两个方面进行研究。首先,检测了 ATP 生成水平,结果如图 1 A 所示,与对照组相比,低剂量 2.5 nmol/L MC-LR 处理组就可以使 ATP 水平降低至 0.78 ± 0.05 倍 ($P < 0.05$),随着毒素浓度的增加,ATP 生成量不断减少 (5 nmol/L 组为 0.69 ± 0.10 倍,10 nmol/L 组为 0.38 ± 0.05 倍, $P < 0.05$),这一作用迅速而又明显。接着,检测了线粒体膜电位。敏感的 JC-1 染料以电势依赖性的方式积聚在线粒体内,正常情况下为聚合物状态,产生红色荧光,线粒体处于异常状态,JC-1 则分解为单体,发绿色荧光,线粒体膜电位



注:不同剂量 (2.5 ~ 10 nmol/L) MC-LR 处理小鼠原代肝细胞 48 h; A: ATP 水平与对照组比较, * $P < 0.05$; B: JC-1 染色激光共聚焦拍照,与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 MC-LR 引起肝细胞线粒体损伤

Note. Hepatocytes were treated with 2.5 ~ 10 nmol/L MC-LR for 48 h. A. Comparison of ATP level in cells subjected to the indicated treatments, * $P < 0.05$. B. Representative confocal imaging of cells treated with the indicated treatments. Compared with normal control group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Effect on mitochondrial function of hepatocytes induced by MC-LR

的去极化程度可以通过红/绿荧光强度的比例来衡量。如图 1B 所示, MC-LR 作用 48 h 后, 细胞内红色荧光逐渐减弱, 绿色荧光逐渐增强, 聚合物逐渐解离成单体。通过计算, 空白对照组的膜电位比较高, 红/绿色平均荧光强度比值为 2.93 ± 0.53 , 而毒素处理组比值逐渐降低, 分别为: 2.48 ± 0.29 , 1.67 ± 0.43 , 1.53 ± 0.36 ($P < 0.05$), 影像学图片和计算的数据共同表明线粒体膜电位去极化。综合以上结果, 说明 MC-LR 导致线粒体功能受到损害。

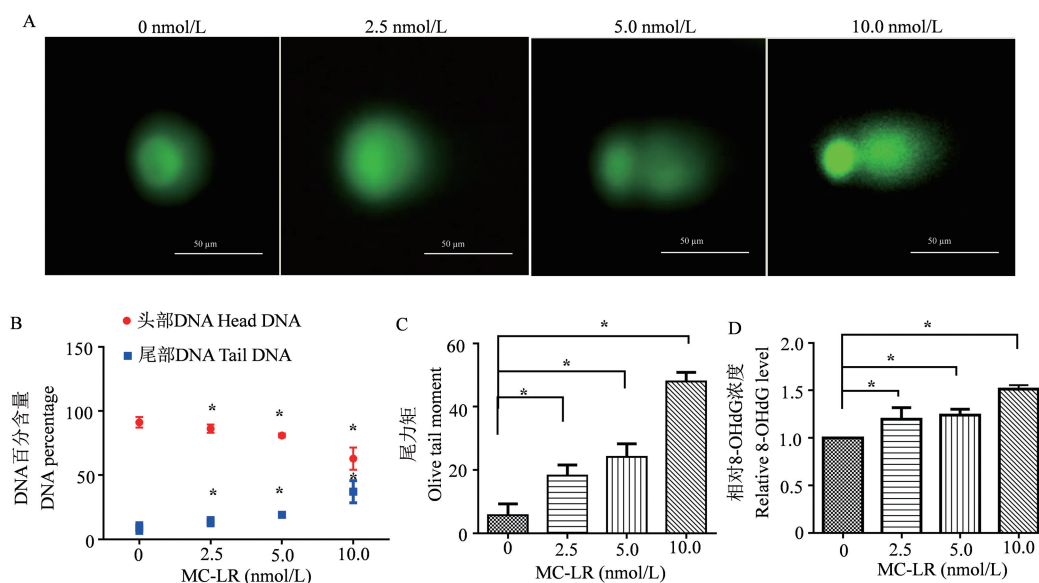
2.2 MC-LR 造成肝细胞 DNA 损伤

采用彗星实验和 8-OHdG 水平检测评价 MC-LR 对肝细胞 DNA 的损伤作用。通过彗星实验影像通过观察 DNA 彗尾形状和迁移模式, 可判断 DNA 双链是否发生断裂, 从单个细胞水平评估细胞的 DNA 损伤。研究中, 如图 2A 所示, 对照组细胞核为圆形, 未出现拖尾, 其头部的荧光强度高, MC-LR 处理后, 单个细胞核拖尾增大, 头部与尾部所占比例发生变化, 且随着处理毒素浓度增加, 拖尾明显变长, 体积变大。分析 DNA 百分比含量 (图 2B), MC-LR 处理后, 细胞核尾部 DNA 百分比的显著增加, 相反的, 头部 DNA 百分比逐步降低。进而该研究检测了

另一个重要指标的尾力矩 (olive tail moment, OTM), 如图 2C, 从单个细胞水平上进行测量, 发现对照组的 OTM 为 5.72 ± 3.56 , 随着毒素浓度增加, OTM 最高增加到 47.96 ± 2.92 (10 nmol/L , $P < 0.05$)。8-OHdG 作为 DNA 损伤的生物学标记^[11], 当细胞发生损伤其浓度急剧升高, 为了检测 DNA 损伤的发生情况, 该研究检测肝细胞的生长培养基中 8-OHdG 的含量。图 2D 实验结果表明, 经过梯度浓度的 MC-LR 处理 48 h 后, 培养基中 8-OHdG 水平变化范围从 1.02 ± 0.03 倍 (2.5 nmol/L 组, $P < 0.05$) 增加到 1.51 ± 0.07 (10 nmol/L 组, $P < 0.05$), 均高于对照组。以上实验结果表明 MC-LR 促使细胞 DNA 双链断裂, 并使 8-OHdG 高表达, 导致 DNA 损伤。

2.3 MC-LR 通过 p53 调控线粒体功能损伤作用

DNA 损伤往往造成 p53 表达增加, 为探索 p53 表达情况, 通过 Western Blot 对细胞内 p53 蛋白进行检测, 结果显示, 5 nmol/L MC-LR 处理组的肝细胞内 p53 蛋白表达量相较于对照组水平上调 (图 3A), 而经过 p53 特异性抑制剂 pft- α 预处理组的 p53 表达量有所恢复。以上结果说明 MC-LR 可促进 p53 表达增加, 这一作用可以被 pft- α 抑制。



注: 不同剂量 ($2.5 \sim 10 \text{ nmol/L}$) MC-LR 处理小鼠原代肝细胞 48 h; A: 彗星实验图; B: 头/尾部 DNA 含量百分比; C: 尾力矩; D: 8-OHdG 浓度; 与对照组相比较, $* P < 0.05$ 。

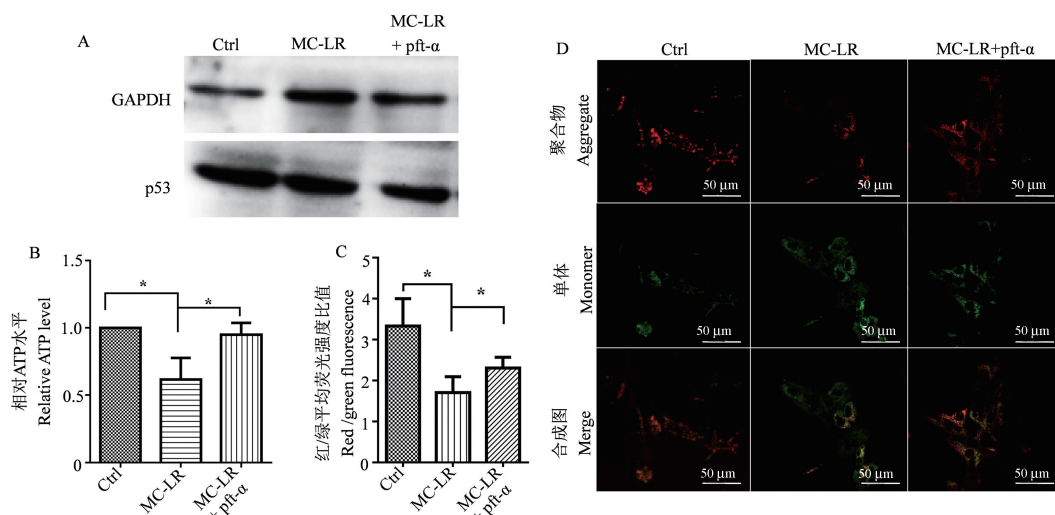
图 2 MC-LR 造成的 DNA 损伤情况

Note. Hepatocytes were treated with $2.5 \sim 10 \text{ nmol/L}$ MC-LR for 48 h. A. Effect of MC-LR on single cell subjected to the indicated treatments. B. Percentage of tail DNA/head DNA. C. Olive tail moment. D. MC-LR treatment resulted in a increase in the 8-OHdG levels. Compared with normal control group, $* P < 0.05$.

Figure 2 Effect of MC-LR on DNA damage

为了进一步验证 p53 对线粒体功能的影响,该课题选取 p53 抑制剂 pft- α 对肝细胞进行预处理,然后使用 5 nmol/L MC-LR 进行染毒处理,48 h 后检测胞内 ATP 水平和 $\Delta\psi_m$ 。研究结果显示(图 3B),MC-LR 处理组胞内 ATP 水平为对照组细胞的 0.62 ± 0.16 倍($P < 0.05$),显著性降低,而 pft- α 预处理组 ATP 水平为对照组的 0.95 ± 0.09 倍($P > 0.05$)相较于对照组未发生明显波动。另外,通过观察激

光共聚焦实验结果图,如图 3D 所示,相较于 MC-LR 处理组,pft- α 预处理组的红色荧光强度增强,绿色荧光减弱。对聚合物呈现的红色荧光和单体呈现的绿色荧光变化情况进行数据分析,发现 pft- α 预处理组红色/绿色平均荧光强度比值明显高于 MC-LR 处理组,但略低于对照组,说明 pft- α 预处理组 $\Delta\psi_m$ 去极化程度低(图 3C)。以上结果表明,DNA 损伤导致 p53 水平上调,从而诱发线粒体功能障碍。



注:pft- α 预处理小鼠原代肝细胞,加毒素 48 h 后;A:p53 蛋白表达;B:pft- α 处理前后的 ATP 水平;C:JC-1 染色,细胞内红/绿平均荧光强度的比值;D:JC-1 染色激光共聚焦拍照;与 MC-LR 处理组相比,* $P < 0.05$ 。

图 3 p53 表达及 pft- α 在线粒体功能损伤中的作用

Note. Primary mice hepatocytes were pre-treated with pft- α , and then treated with tox for 48 h. A. Comparison of p53 expression of cells with the indicated treatments. B. ATP levels of either pft- α -preconditioning or without pft- α on mitochondrial function. C. JC-1 stain, the intracellular red/green fluorescence intensity. D. Representative confocal imaging of cells treated with the indicated treatment. Compared with MC-LR group,* $P < 0.05$.

Figure 3 p53 protein level and the role of pft- α in mitochondrial dysfunction

3 讨论

小鼠原代肝细胞暴露于不同浓度的 MC-LR 毒素中发生了线粒体功能障碍,可能与其诱导的 DNA 损伤,募集 p53 表达增加有关。

蓝藻水华向水体释放过量的次生代谢产物——生物毒素,强烈肝毒性的 MC-LR 毒素通过有机阴离子和胆汁酸的多特异性运输系统进入肝细胞^[12],摄入过量的 MC-LR 造成肝损伤,肝衰竭,严重可诱导肿瘤发生^[13-15],受到广泛的毒理学研究。肝实质性细胞是肝的功能型细胞,也是各种因素所致肝损伤的主要靶细胞。该研究在小鼠原代肝细胞基础上进行的,因为原代肝细胞具有体内的肝细胞相似活性,存在完整的转运载体系统^[16],并且前期研究中发现原代细胞比细胞株对毒素更加敏

感^[5],可以更好地还原 MC-LR 的作用过程,是研究 MC-LR 对肝影响的理想模型。根据前期的研究,MC-LR(0 ~ 100 nmol/L)处理小鼠肝原代肝细胞 48 h 后,肝细胞存活率百分比曲线呈现明显的剂量-效应依赖型,由曲线计算出 MC-LR 对小鼠原代肝细胞的 IC_{50} 值为 26 nmol/L。这些数据表明,小鼠原代肝细胞对 MC-LR 的处理高度敏感,当 MC-LR 的浓度达到一定水平时产生细胞毒性。该研究实验采用低剂量 2.5 ~ 10 nmol/L 作为 MC-LR 的研究浓度。

线粒体作为产生 ATP 的主要基地,满足细胞生长的能量需求,同时参与细胞凋亡、自噬过程,稳定的线粒体膜电位有利于维持细胞正常生理功能^[17-18]。一些蛋白组学的研究发现在 MC-LR 诱导下,线粒体中 NADH 脱氢酶相关蛋白丰度发生变化,进而影响氧化磷酸化进程^[19-20]。另外的报道证

明 MC-LR 能够抑制 ATP 合酶的功能,导致细胞内能量异常进而促使细胞死亡^[21-22]。Majsterek 等^[23]报道,线粒体的形态学改变是 MC-LR 导致细胞死亡的主要原因。肝是人体主要代谢器官,线粒体是物质与能量代谢中心,线粒体功能障碍参与肝细胞癌的发生发展过程^[24-26],因此研究线粒体功能正常与否具有重要意义。MC-LR 进入肝细胞后,线粒体作为易损靶点,迅速受到影响。通过图 1 结果,发现 MC-LR 处理的肝细胞内,ATP 水平呈浓度依赖性快速下降,膜电位检测探针 JC-1 染色结果为红色/绿色平均荧光强度比值下降,与激光共聚焦显微镜图像结果一致,说明线粒体膜电位去极化,以此判断 MC-LR 导致线粒体功能发生障碍。研究报道包括动物体内和体外多种细胞株的试验中,发现 MC-LR 有确切的基因毒性,比如小鼠体内、人外周血淋巴细胞和人正常肝细胞 HL7702 细胞株在内的 DNA 双链发生断裂造成 DNA 损伤^[27-28]。图 2 结果显示,肝细胞经过 MC-LR 处理 48 h 后,损伤标记物 8-OHdG 增多,影像学图片显示细胞核出现明显的拖尾,作为评估 DNA 损伤程度的尾力矩也呈毒素浓度依赖性增加,由此可见 DNA 损伤程度随 MC-LR 浓度增加而增加。这一结果与过去在动物体内以及不同细胞株中的研究结果一致^[29-30]。在机制方面的相关研究中,线粒体功能异常往往被认定为氧化应激损伤造成^[31],而越来越多的证据表明线粒体功能障碍和 DNA 损伤后 p53 积聚亦有相关性^[32-33]。生理情况下,p53 维持低浓度稳定存在于细胞质中,当 DNA 受损时,p53 基因迅速被激活,清除减少,高浓度聚集在胞内,一部分 p53 进入线粒体引发线粒体障碍,触发凋亡^[32,34]。为了揭示 MC-LR 造成线粒体功能障碍的机制,该研究还检测了 p53 表达情况,Western Blot 结果表明 MC-LR 促使肝细胞 DNA 损伤后,募集 p53,而特异性转录抑制剂 pft- α 可减弱其敏感性,仍旧维持在低表达状态。p53 是机体应对 DNA 损伤的天然防护屏障,具有双向调节作用,通过修复损伤的 DNA 使细胞存活,或诱导细胞凋亡消除损伤的细胞维持细胞内稳态,这一选择主要是基于其翻译后修饰调控^[35]。该研究为了探究 p53 在线粒体功能方面的作用,使用 pft- α 预先处理肝细胞,然后用 5 nmol/L MC-LR 染毒,48 h 后检测线粒体功能,结果发现线粒体中 ATP 水平回升, $\Delta\psi_m$ 得以恢复到本底 70% 水平,证明 p53 可调控线粒体功能。

MC-LR 对肝毒性的研究颇多,但是具体的机制仍处于探索阶段。虽然目前发现 MC-LR 可造成 DNA 损伤,促进 p53 基因表达,但鲜有将 p53 与线粒体功能联系起来。该研究着眼于肝细胞线粒体损伤方面,设计实验检测 p53 对线粒体功能的影响,试图从线粒体方面揭示 MC-LR 的毒性作用机制。通过以上实验提示积聚的 p53 参与线粒体功能调控,但也存在一定的不足之处,比如 p53 如何影响线粒体功能,是否与线粒体信号通路产生交集,这些值得进一步深入探讨,也是该课题后续研究方向。

参 考 文 献 (References)

- [1] Lee J, Lee S, Mayta A, et al. Microcystin toxin-mediated tumor promotion and toxicity lead to shifts in mouse gut microbiome [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 206: 111112-111204.
- [2] Park H, Iwami C, Watanabe MF, et al. Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic Microcystis species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994) [J]. *Environ Toxicol*, 2015, 13(1): 61-72.
- [3] Chen L, Chen J, Zhang X, et al. A review of reproductive toxicity of microcystins [J]. *J Hazard Mater*, 2016, 301: 381-399.
- [4] Puddick J, Prinsep MR, Wood SA, et al. High levels of structural diversity observed in microcystins from Microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(11): 5372-5395.
- [5] Wu YL, He Y, Shi JJ, et al. Microcystin-LR promotes necroptosis in primary mouse hepatocytes by overproducing reactive oxygen species [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 377 (2019): 114114-114626.
- [6] Zegura B, Lah TT, Filipic M. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage [J]. *Toxicology*, 2004, 200(1): 59-68.
- [7] Sarkar S, Kimono D, Albadrani M, et al. Environmental microcystin targets the microbiome and increases the risk of intestinal inflammatory pathology via NOX2 in underlying murine model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 8742-8763.
- [8] Nong Q, Komatsu M, Izumo K, et al. Involvement of reactive oxygen species in Microcystin-LR-induced cytogenotoxicity [J]. *Free Radic Res*, 2007, 41(12): 1326-1337.
- [9] Casquilho NV, Moreira-Gomes MD, Magalhães CB, et al. Oxidative imbalance in mice intoxicated by microcystin-LR can be minimized [J]. *Toxicon*, 2018, 144: 75-82.
- [10] Zanchett G, Oliveira-filho EC. Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects [J]. *Toxins (Basel)*, 2013, 5(10): 1896-1917.
- [11] Li X, Zhao Q, Zhou W, et al. The effects of chronic exposure to Microcystin-LR on hepatocyte mitochondrial DNA replication in

- mice [J]. Environ Sci Technol, 2015, 49(7): 4665–4672.
- [12] Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, et al. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 203(3): 257–263.
- [13] Svirčev Z, Drobnac D, Tokodi N, et al. Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms [J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2013, 31(3): 181–200.
- [14] Lin W, Hou J, Guo H, et al. The synergistic effects of waterborne microcystin-LR and nitrite on hepatic pathological damage, lipid peroxidation and antioxidant responses of male zebrafish [J]. Environ Pollut, 2018, 235: 197–206.
- [15] Shuai Y, Lou D, Yin J, et al. Characterization of microcystin-induced dualistic toxic effects on primary rat hepatocytes [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2017, 36(1): 15–27.
- [16] Ulvestad M, Darnell M, Molden E, et al. Evaluation of organic anion-transporting polypeptide 1B1 and CYP3A4 activities in primary human hepatocytes and HepaRG cells cultured in a dynamic three-dimensional bioreactor system [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 343(1): 145–156.
- [17] Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(9): 621–632.
- [18] Ruchko M, Gorodnya O, Ledoux SP, et al. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial dysfunction and apoptosis in oxidant-challenged lung endothelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(3): L530–L535.
- [19] Chen T, Wang Q, Cui J, et al. Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR: a combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy [J]. Mol Cell Proteomics, 2005, 4(7): 958–974.
- [20] Wang M, Wang D, Lin L, et al. Protein profiles in zebrafish (*Danio rerio*) brains exposed to chronic microcystin-LR [J]. Chemosphere, 2010, 81(6): 716–724.
- [21] La-Salette R, Oliveira MM, Palmeira CA, et al. Mitochondria a key role in microcystin-LR kidney intoxication [J]. J Appl Toxicol, 2008, 28(1): 55–62.
- [22] Mikhailov A, Härmälä-Braskén AS, Hellman J, et al. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR [J]. Chem Biol Interact, 2003, 142(3): 223–237.
- [23] Majsterek I, Sicinska P, Tarczynska M, et al. Toxicity of microcystin from cyanobacteria growing in a source of drinking water [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2004, 139(1–3): 175–179.
- [24] Gao WY, Li D, Cai DE, et al. Hepatitis B virus X protein sensitizes HL-7702 cells to oxidative stress-induced apoptosis through modulation of the mitochondrial permeability transition pore [J]. Oncol Rep, 2017, 37(1): 48–56.
- [25] Huang Q, Zhan L, Cao H, et al. Increased mitochondrial fission promotes autophagy and hepatocellular carcinoma cell survival through the ROS-modulated coordinated regulation of the NFκB and TP53 pathways [J]. Autophagy, 2016, 12(6): 999–1014.
- [26] Chávez E, Lozano-rosas MG, Domínguez-lópez M, et al. Functional, metabolic, and dynamic mitochondrial changes in the rat cirrhosis-hepatocellular carcinoma model and the protective effect of IFC-305 [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2017, 361(2): 292–302.
- [27] Zegura B, Gajski G, Straser A, et al. Microcystin-LR induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes [J]. Mutat Res, 2011, 726(2): 116–122.
- [28] Dias E, Louro H, Pinto M, et al. Genotoxicity of microcystin-LR in *in vitro* and *in vivo* experimental models [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 949521–949949.
- [29] Díez-Quijada L, Medrano-Padial C, Llana-Ruiz-Cabello M, et al. Cyindrospermopsin-Microcystin-LR combinations may induce genotoxic and histopathological damage in rats [J]. Toxins (Basel), 2020, 12(6): 348–369.
- [30] Zegura B, Volcic M, Lah TT, et al. Different sensitivities of human colon adenocarcinoma (CaCo-2), astrocytoma (IPDDC-A2) and lymphoblastoid (NCNC) cell lines to microcystin-LR induced reactive oxygen species and DNA damage [J]. Toxicon, 2008, 52(3): 518–525.
- [31] Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources [J]. J Endocrinol, 2017, 233(1): R15–R42.
- [32] Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis [J]. Science, 2000, 288(5468): 1053–1058.
- [33] Takumi S, Komatsu M, Furukawa T, et al. P53 plays an important role in cell fate determination after exposure to microcystin-LR [J]. Environ Health Perspect, 2010, 118(9): 1292–1298.
- [34] Mihara M, Erster S, Zaika A, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria [J]. Mol Cell, 2003, 11(3): 577–590.
- [35] Taira N, Yamaguchi T, Kimura J, et al. Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(2): 717–722.

[收稿日期] 2021-03-31