

# 白藜芦醇对玉米赤霉烯酮毒素致人胚肾 HEK293 细胞毒性的干扰作用

桑亚秋, 张根义, 李文竹

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 玉米赤霉烯酮毒素 (ZEA) 是一种非甾体霉菌毒素, 存在于霉变的谷物中, 具有类雌激素样作用, 能引起生殖机能异常。但是关于 ZEA 的肾脏毒性研究的比较少。白藜芦醇(RSV)是在红酒、葡萄中存在的一种多酚化合物, 具有抗氧化作用。通过不同浓度梯度的 ZEA (3、15、75、150、300  $\mu\text{M}$ )、RSV (0、0.01、0.1、1、10、100  $\mu\text{M}$ ) 和 DL- $\alpha$ -lipoic acid(LA) (0、1、10、100、1000  $\mu\text{M}$ ) 作用于人胚肾 HEK293 细胞 24 h, 细胞活性的测定显示 ZEA 对 HEK293 细胞的  $\text{IC}_{50}$  为 80  $\mu\text{M}$ , 而 RSV (<10  $\mu\text{M}$ ) 和 LA 对细胞无明显损伤。利用 RSV 和 LA 对细胞进行预处理 24 h 之后, 再将 ZEA 作用于细胞 24 h, 通过细胞增殖力、ROS、MDA、SOD、MnSOD 指标的检测, 表明 RSV/LA 能提高细胞的抗氧化性, 减轻 ZEA 产生的细胞毒性和氧化损伤。同时, ZEA 可引起促凋亡基因 *Bax* 的显著表达, 但对于 *SIRT1* 和抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达没有影响, 而 RSV 预处理能显著提升 *SIRT1* 和 *Bcl-2* 的表达, 降低 *Bax* 的表达, 发挥抗凋亡作用。

**关键词:** 玉米赤霉烯酮毒素; 白藜芦醇; 细胞毒性; 凋亡

文章编号: 1673-9078(2016)10-1-8

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.001

## Resveratrol Attenuates the Toxicity of Zearalenone toward Human Embryonic Kidney 293 Cells

SANG Ya-qiu, ZHANG Gen-yi, LI Wen-zhu

(School of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Zearalenone (ZEA), a non-steroidal estrogenic mycotoxin that is widely present in moldy grains, has estrogen-like activity and can cause reproductive dysfunction. However, there have been few studies on the nephrotoxicity of ZEA. Resveratrol (RSV) is a polyphenolic compound present in red wine and grapes that possesses antioxidant activity. Human embryonic kidney (HEK 293) cells were treated with different concentrations of ZEA (3, 15, 75, 150, and 300  $\mu\text{M}$ ), RSV (0, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{M}$ ), and DL- $\alpha$ -lipoic acid (LA) (0, 1, 10, 100, and 1000  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. Cell viability measurements showed that the half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of ZEA against HEK293 cells was 80  $\mu\text{M}$ , while RSV and LA treatment did result in significant damage to the cells. Cells were pretreated with RSV and LA for 24 h, followed by ZEA treatment for 24 h. The cell proliferative ability and levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and manganese form of SOD (MnSOD) were measured, and the results indicated that RSV/LA could enhance the cellular antioxidant activity and reduce the cytotoxicity and oxidative damage caused by ZEA. Additionally, ZEA treatment increased expression of the pro-apoptotic gene *Bax*, but had no impact on the expression of *SIRT1* or the anti-apoptotic gene *Bcl-2*. In contrast, RSV pretreatment significantly increased the expression of both *Bcl-2* and *SIRT1*, reduced the expression of *Bax*, and had an anti-apoptotic effect.

**Key words:** zearalenone; resveratrol; cytotoxicity; apoptosis

玉米赤霉烯酮毒素 (Zearalenone, ZEA) 是一种广泛分布的有镰刀菌属真菌产生的非甾体霉菌毒素, 存在于霉变的谷物如玉米、高粱、小麦等以及动物饲

收稿日期: 2015-11-23

基金项目: 国家农业部公益项目 (201203069)

作者简介: 桑亚秋 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 细胞毒理学

通讯作者: 张根义 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学与营养学、细胞毒理学

料中<sup>[1,2]</sup>, 不仅对人类和动物健康产生了巨大的危害, 还造成了全球范围内的经济损失。

ZEA 具有类雌激素样作用, 多项动物实验表明 ZEA 及其代谢产物能产生类雌激素和合成代谢活性, 其强烈的类雌激素作用使其对动物生殖系统产生损伤, 导致生殖机能异常<sup>[3,4]</sup>。除了生殖发育毒性外, 玉米赤霉烯酮还同时能对肝肾、免疫系统以及内分泌系统等产生毒性损害。ZEA 能引起肝肿瘤、垂体瘤、以

及血液和肾脏毒性<sup>[5,6]</sup>。ZEA 能引起氧化应激, 形成 DNA 加合物、微核、DNA 碎片以及染色体畸变等<sup>[7,8]</sup>而产生遗传毒性

由 ZEA 造成的经济损失和对健康影响无需置疑, 人们已经研究了许多化学、物理和生物方法试图降低玉米赤霉烯酮的毒性, 尽管一些消毒方法有效, 但并不符合所有要求, 特别是有关反应产物的安全性和保护所处理食物和饲料的营养性质的要求。由于上述原因, 营养学方法(例如补充营养素、食物成分或具有抗真菌毒素性质的添加剂等来抵抗真菌毒素产生的毒性)越来越受到人们的关注。

近几年来, 人们越来越多的关注到一些植物及其分离出的有效成分对疾病的预防和治疗效果, 这些植物能够提供大量的抗氧化植物化合物, 例如维生素 C、E, 谷胱甘肽, 多酚化学物(黄酮类化合物)等, 进而保护机体免于氧化应激和细胞损伤。因此, 我们想要知道, 天然植物化合物是否可能对 ZEA 引起的毒性产生拮抗作用进而减轻其损伤。白藜芦醇(Resveratrol, RSV)化学名称为 3,5,4'-三羟基二苯乙烯(3,5,4'-trihydroxystilbene), 是一种非黄酮类多酚化合物, 在葡萄及其相关衍生产品、花生、浆果类、黑巧克力等食物中含量丰富。RSV 具有多种生物活性如抗衰老、抗肿瘤和癌症、防治心血管疾病以及抗氧化、抗菌、免疫调节等<sup>[9,10]</sup>。多种实验表明 RSV 能对多种代谢性疾病产生有利影响, 而其发挥这些有效生物作用的途径主要通过激活 SIRT 或 AMPK。SIRT1 是一种 NAD<sup>+</sup>依赖的脱乙酰酶, 作用于多种靶蛋白, 调节细胞活性、葡萄糖以及脂质代谢<sup>[11,12,13]</sup>。SIRT1 通过去乙酰化组蛋白和非组蛋白如 NF- $\kappa$ B、FOXO3、p53、PPAR- $\gamma$ 、PGC-1 $\alpha$  以及 eNOS 等, 来发挥其调节机制。已有研究表明, SIRT1 能通过 FOXO3a 的去乙酰化, 上调 CAT 和 MnSOD 的表达, 间接减轻细胞的氧化应激作用<sup>[14]</sup>。FOXO 信号通路与 DNA 损伤修复、应激反应、抗凋亡过程紧密相关。在本次研究中, 我们利用 RSV 来对 ZEA 的毒性进行干扰, 我们的假设为 RSV 可能通过激活 SIRT1 的表达, 去乙酰化 FOXO, 进而减轻 ZEA 引起的氧化胁迫和促凋亡作用。

HEK293 细胞是腺病毒转染的人胚肾细胞, 因为肾脏也是 ZEA 的毒作用靶器官之一, 所以本次研究, 选取 HEK293 细胞为对象, 探究 ZEA 导致 293 细胞毒性的相关机制和 RSV 缓解其毒性作用的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

HEK293 人胚肾细胞, 中国科学院细胞库提供; DMEM 高糖培养基、胎牛血清、胰酶 Gibco 公司提供; 玉米赤霉烯酮毒素标准品(ZEA)、白藜芦醇标准品(RSV)、硫辛酸标准品(LA) Sigma 公司提供; CCK8 试剂盒、MDA 检测试剂盒、SOD 活性检测试剂盒、Mn-SOD 活性检测试剂盒、AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒, 碧云天生物技术公司提供; UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒, 上海生工; PrimeScript<sup>TM</sup> RT 试剂盒、SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒, 常州博弘生物工程有限公司。

### 1.2 主要仪器设备

酶标仪、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、实时荧光定量 PCR 仪 Thermo 公司产品; FACSCalibur 流式细胞仪, BD 公司

### 1.3 方法

#### 1.3.1 细胞培养与染毒

293 细胞用含 10%胎牛血清、0.5%青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养至对数生长期。用 DMSO 溶解 ZEA、RSV 制成母液, 染毒前, 将母液用 DMEM 培养基稀释 1000 倍至 DMSO 质量分数为 0.1%的储备液, 再用含有质量分数 0.1% DMSO 溶液的 DMEM 培养基将储备液配置成所需浓度的工作液。

#### 1.3.2 CCK8 法测定细胞抑制率

调整对数期细胞密度为  $1 \times 10^4$  个/mL, 每孔 200  $\mu$ L 接种于 96 孔板中孵育 24 h 后, 弃去培养基, 加入含有 ZEA/RSV/LA 的培养液继续培养 24 h, 于结束培养前一小时, 每孔加入 20  $\mu$ L CCK-8 溶液, 培养 1 h 结束后, 在 450 nm 处测定吸光度 A(下标 g、k、c 分别表示给药组、空白组、阴性对照组)。计算不同浓度的 ZEA/RSV/LA 对 293 细胞的增值抑制率。增值抑制率  $Y = [1 - (Ag - Ak) / (Ac - Ak)] \times 100\%$ 。其中 ZEA 染毒浓度为 0 (溶剂对照组)、3、15、75、150、300  $\mu$ mol/L, RSV 的浓度为 0、0.01、0.1、1、10、100  $\mu$ mol/L, LA 的浓度为 0、1、10、100、1000  $\mu$ mol/L, 溶剂对照组为含有质量分数 0.1% DMSO 的 DMEM 培养基, 每个实验重复 4 次。

#### 1.3.3 RSV/LA 对 ZEA 毒性的干扰

上述实验得出 ZEA IC<sub>50</sub> 以及确定 RSV 和 LA 的无损害作用浓度之后, 选定适当的 RSV 和 LA 浓度对细胞进行预处理, 之后再换成一定浓度的 ZEA, 处理方法: 细胞铺板 24 h 之后, 加入含有 RSV/LA 的培养液培养 24 h 之后, 弃去培养基, 换成含有 ZEA 的培

养液,继续培养 24 h,于结束培养前 1 h,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,培养 1 h 结束后,在 450 nm 处测定吸光度 A。

### 1.3.4 ROS 的测定

调整细胞密度为  $1.5 \times 10^5$  个/ml,每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,24 h 后弃去培养基,换成含有药物的培养基继续培养 24 h,分以下几组:阴性对照组,2  $\mu\text{M}$  RSV 单独组,20  $\mu\text{M}$  ZEA、40  $\mu\text{M}$  ZEA 单独组,2  $\mu\text{M}$  RSV+20  $\mu\text{M}$  ZEA/40  $\mu\text{M}$  ZEA 干扰组。结束培养前,吸出培养基,每孔中加入 1 mL、10  $\mu\text{M}$  的 DCFH-DA 探针(溶于不含血清的培养基),37  $^{\circ}\text{C}$  培养 20 min,吸除探针,用不含血清的培养基洗涤 2~3 次,胰酶消化收集细胞,用 0.5 mL PBS 重悬细胞之后,流式细胞仪检测 FSC、SSC、FL1 通道,DCF 为绿色荧光。

### 1.3.5 细胞氧化还原状态的测定

选择根据预处理对细胞抑制率的实验结果,选定最佳的 RSV 预处理浓度 2  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[15]</sup>,LA 作为抗氧化剂阳性对照,确定其预处理浓度为 500  $\mu\text{M}$ ,对 ZEA 的作用进行干扰,ZEA 浓度选定为 20  $\mu\text{M}$  和 40  $\mu\text{M}$ ,阴性对照为含有 0.1% DMSO 的 DMEM 培养基。实验组设置如下:阴性对照组,RSV (2  $\mu\text{M}$ ) 单独作用组,LA (500  $\mu\text{M}$ ) 单独作用组,ZEA (20  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$ ) 单独作用组,RSV 预处理组(2 Mm RSV+20  $\mu\text{M}$ /40  $\mu\text{M}$  ZEA),LA 预处理组(500  $\mu\text{M}$  LA+20  $\mu\text{M}$ /40  $\mu\text{M}$  ZEA),每个实验组三个重复。

调整细胞数量为  $1.6 \times 10^6$  个/皿,接种于 10 cm 细胞培养皿中孵育 24 h 后,弃去培养基,预处理组加入含 RSV/LA 的培养基培养 24 h 后,换成含 ZEA 的培养基继续培养 24 h 结束培养。单独处理组加入 RSV/ZEA/LA 培养 24 h 后,结束培养。在冰上进行如下操作:用 PBS 洗一次细胞,每皿加入 1 mL 细胞裂解液,用移液枪吹打数次后,转移到 1.5 mL 离心管,10000 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$  离心 5 min,收集上清液,分装后冻在 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱,用于后续实验。

#### 1.3.5.1 脂质氧化(MDA)的测定

(1)TBA 储存液、MDA 工作液的配制;(2)标准品的稀释:取适量标准品用蒸馏水稀释至 1、2、5、10、20  $\mu\text{M}$ ,用于后续制作标准曲线;(3)在 2 mL 离心管中加入 0.1 mL 样品/裂解液/标准品,加入 0.2 mL MDA 工作液,混匀后,沸水浴中加热 40 min,水浴冷却至室温,1000 g 室温离心 10 min。取 200  $\mu\text{L}$  上清液加入到 96 孔板中,随后用酶标仪在 532 nm 测定吸光度。并根据标准曲线换算出 MDA 含量;(4)MDA 的计算:通过单位重量的蛋白质含量来表示,单位为  $\mu\text{mol/mg}$  蛋白。结果用 MDA 相对含量表示,即样品组/阴性对

照组的比值。

#### 1.3.5.2 总超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

(1)配置 WST-8/酶工作液、反应启动液;(2)在 96 孔板中分四组,先加入:20  $\mu\text{L}$  样品组;20  $\mu\text{L}$  SOD 检测缓冲液(空白对照 1);40  $\mu\text{L}$  SOD 检测缓冲液(空白对照 2);20  $\mu\text{L}$  待测样品+20  $\mu\text{L}$  SOD 缓冲液(空白对照 3)。再在所有孔中加入 160  $\mu\text{L}$  WST-8/酶工作液,最后在第二组样品组和第三组空白对照 1 组各加入 20  $\mu\text{L}$  反应启动液;(3)37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 450 nm 测定吸光度。总 SOD 活力的计算如下式,待测样品中 SOD 酶活力单位=抑制百分率/(1-抑制百分率),结果用 SOD 活性的相对值表示。

$$\text{抑制百分率} = [(A_1 - A_2) - (A_0 - A_3)] / (A_1 - A_2) \times 100\%$$

式中:  $A_1$  为 A 空白对照 1,  $A_2$  为 A 空白对照 2,  $A_0$  为 A 样品,  $A_3$  为 A 空白对照 3。

#### 1.3.5.3 锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)活性的测定

(1)Cu/Zn-SOD 的抑制:将 Cu/Zn-SOD 抑制剂 A 和样品按 1:24 的体积比(如 4  $\mu\text{L}$ +96  $\mu\text{L}$ ),在离心管中混合好,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h;(2)取 20  $\mu\text{L}$  Cu/Zn-SOD 抑制剂 B 加入到 780  $\mu\text{L}$  水中,混匀。将稀释好的 Cu/Zn-SOD 抑制剂 B 与上述混合物按 1:25 体积比混合均匀(如 4  $\mu\text{L}$ +100  $\mu\text{L}$ ),37  $^{\circ}\text{C}$  再孵育 15 min;(3)以下步骤同上一步。

#### 1.3.6 细胞凋亡率的测定

调整细胞密度为  $2.0 \times 10^5$  个/mL,每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,24 h 后弃去培养基,换成含有药物的培养基继续培养 24 h,分以下几组:阴性对照组,2  $\mu\text{M}$  RSV 单独组,20  $\mu\text{M}$  ZEA、40  $\mu\text{M}$  ZEA 单独组,2  $\mu\text{M}$  RSV+20  $\mu\text{M}$  ZEA/40  $\mu\text{M}$  ZEA 干扰组,培养结束后,将细胞培养基吸出,放于离心管中,PBS 洗涤贴壁细胞一次,加入 200  $\mu\text{L}$  胰酶消化液消化细胞 1 min 左右,加入前面收集的细胞培养液,结束消化,将细胞轻轻吹打下来,转移到离心管中,1000 r/min 离心 5 min。弃上清,加入 195  $\mu\text{L}$  AnnexinV-FITC 结合液,轻轻重悬细胞,加入 5  $\mu\text{L}$  AnnexinV-FITC,轻轻混匀,室温避光孵育 10 min 后,1500 r/min 离心 5 min 弃上清。加入 190  $\mu\text{L}$  AnnexinV-FITC 结合液,轻轻重悬细胞,加入 10  $\mu\text{L}$  碘化丙啶(PI)染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置。流式细胞仪检测 FSC、SSC、FL1、FL3 通道,AnnexinV-FITC 为绿色荧光,PI 为红色荧光,每个样品手机 20000 个细胞。

#### 1.3.7 RNA 提取及 RTq-PCR

调整细胞密度为  $15 \times 10^5$  个/孔,每孔 2 mL 接种于 6 孔板,孵育 24 h 后,换成含有药物的培养基继续培养 24 h,分为以下四组:阴性对照组、2  $\mu\text{M}$  RSV 单

独作用组, 20  $\mu\text{M}$  ZEA 单独作用组, 2  $\mu\text{M}$  RSV+20  $\mu\text{M}$  ZEA 干扰组。培养结束后, 采用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒进行 RNA 提取, 采用 PrimeScript TMRT 试剂盒进行 RNA 反转录, 以及采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行 QPCR 反应。按  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法计算。上下游引物以及内参引物序列见表 1。

表 1 相关基因引物序列

**Table 1 Primer sequences used for in RTq-PCR analysis**

Gene	Gene sequence no.	Primer	5'-3' Sequence	Size/bp
<i>Sirt1</i>	NM_012238.4	Forward	CGGATTTGAAGAATGTTGGT	106
		Reverse	ATCTGCTCCTTTGCCACTC	
<i>Bax</i>	NM_004324.3	Forward	CCGATTCATCTACCCTGCTG	111
		Reverse	TGAGCAATTCAGAGGCAGT	
<i>Bcl-2</i>	NM_000633.2	Forward	GAGGATTGTGGCCTTCTTTG	118
		Reverse	GTGCCGGTTCAGGTACTCA	
$\beta$ -actin	NM_001101.3	Forward	CCTGGCACCCAGCACAAT	144
		Reverse	GGGCCGGACTCGTCATAC	

## 2 结果与讨论

### 2.1 ZEA 对 293 细胞的半数抑制率

ZEA 对 HepG2 细胞增殖力的抑制率呈计量相关性, 根据染毒浓度对应的细胞增殖抑制率, 使用 Origin 8.0 进行 Polynomial Fit 分析, 抑制率为 50% 时对应的浓度即为 ZEA 对 293 细胞的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。ZEA 的浓度与抑制率曲线如图 1 所示,  $\text{ZEAIC}_{50}=80 \mu\text{M}$ 。

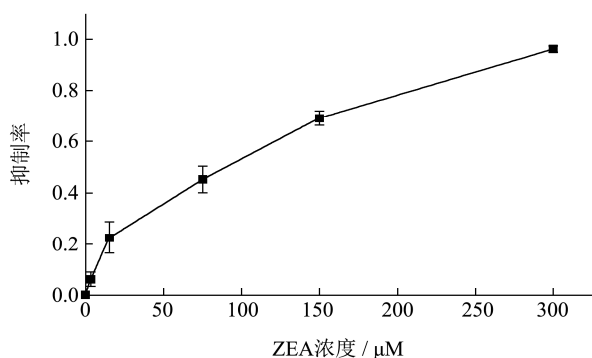


图 1 ZEA 对 293 细胞的细胞增殖力影响 (24 h)

Fig.1 Effect of ZEA treatment on HEK293 cell proliferation (24 h)

h)

### 2.2 RSV 与 LA 对细胞的无损害作用浓度

LA 为抗氧化剂, 在此处作为一种抗氧化阳性对照来发挥作用。当 RSV 浓度较低 ( $<10 \mu\text{M}$ ) 时, 作用于细胞 24 h 后, 对细胞增殖力没有影响, 当达到一定浓度 ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ) 之后, 才对细胞有损害。LA 在所选定的浓度范围 (0~1 mM) 内对细胞均无抑制。RSV 与

### 1.3.8 统计学分析

所有试验重复三次, 每组浓度设定 5 个平行。采用 Origin 8.5 进行绘图, SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 以  $p < 0.05$  为显著性差异,  $p < 0.01$  代表具有高度显著差异。实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  (平均值  $\pm$  标准差) 形式表示。

LA 的浓度与抑制率曲线如图 2 (a)、2 (b) 所示。

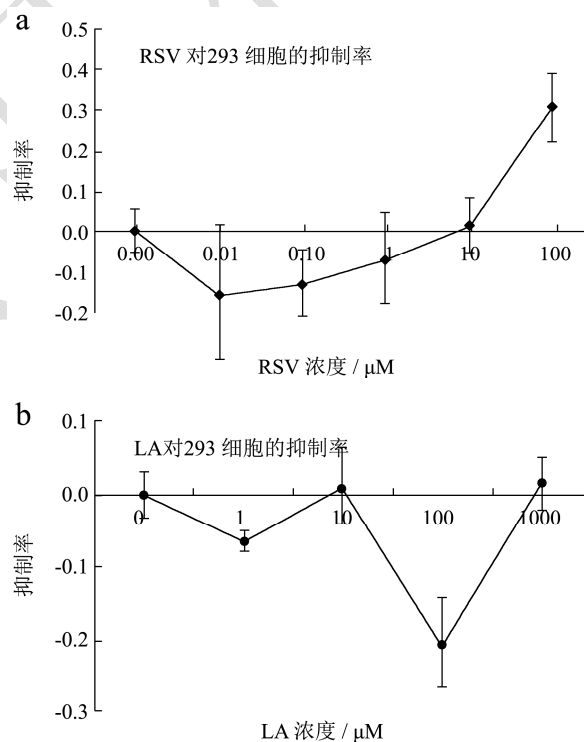


图 2 RSV (a) 和 LA (b) 对 293 细胞的细胞增殖力影响 (24 h)

Fig.2 Effect of RSV (a) and LA (b) on HEK293 cell proliferation (24 h)

### 2.3 RSV 和 LA 预处理干扰 ZEA 的细胞增殖抑制

一系列浓度的 RSV 或一定浓度 LA 预处理细胞

24 h 之后,再换成 ZEA 继续处理细胞 24 h,结果表明预处理能一定程度的减轻 ZEA 的细胞毒性。如图 3(a)所示,ZEA 单独处理组从 20  $\mu\text{M}$  浓度开始,存活率显著下降,20  $\mu\text{M}$ ~80  $\mu\text{M}$  的 ZEA 处理,存活率范围为 92.7%~54.3%。低浓度的 RSV (1、2、4  $\mu\text{M}$ ) 单独作用于细胞时,对存活率无影响。RSV 预处理细胞时,2  $\mu\text{M}$  浓度能产生最好的效果,将 10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$  ZEA 处理的细胞的存活率 95.49%、92.73%、84.52% 分别显著提高到 114.95%、100.19%、94.07%。但是,当 ZEA 浓度过高 (80  $\mu\text{M}$ ) 时,RSV 预处理对细胞存活率没有产生影响。如图 3 (b) 所示,500  $\mu\text{M}$  LA 预处理细胞,同样能提高细胞存活率,10~80  $\mu\text{M}$  ZEA 单独作用于细胞的存活率为 97.83%~41.61%,而 LA 预处理后的存活率为 133.55%~81.12%。

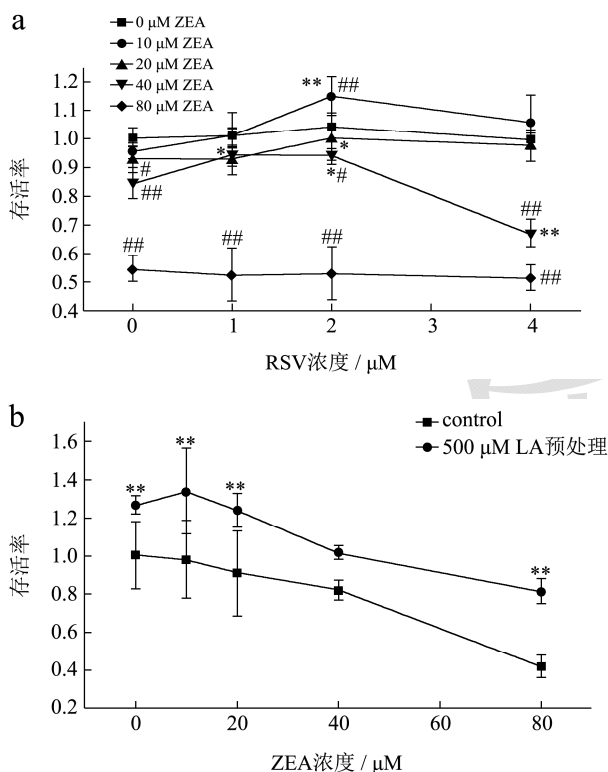


图 3 RSV/LA 预处理对细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of RSV/LA pretreatment on cell viability

注:图 a 为 RSV 预处理对细胞存活率的影响,\*表示相同 ZEA 浓度时,RSV 预处理组与无 RSV 处理组相比差异显著, $p<0.05$ ; \*\*表示差异极其显著, $p<0.01$ ; #表示相同 RSV 预处理浓度时,ZEA 处理组与无 ZEA 处理组相比差异显著, $p<0.05$ ; ##表示差异极其显著, $p<0.01$ 。图 b 为 LA 预处理对细胞存活率的影响,\*\*表示相同 ZEA 浓度时,LA 预处理组与无预处理组相比差异极其显著, $p<0.01$ 。

### 2.4 RSV 和 LA 预处理对细胞内 ROS 水平的

影响

如图 4 所示,随着 ZEA 浓度的增加,细胞内 ROS 水平也会上升,0~40  $\mu\text{M}$  ZEA 处理后,细胞内的绿色荧光平均强度从 186.74 增加到 256.82。RSV/LA 预处理能使显著降低细胞内 ROS 含量,RSV/LA 预处理后细胞内的绿色荧光强度分别为 195.82、203.61、172.72、167.93,与对照组相比没有显著差别。结果表明 RSV 能与 LA 能起到同样的抗氧化效果。

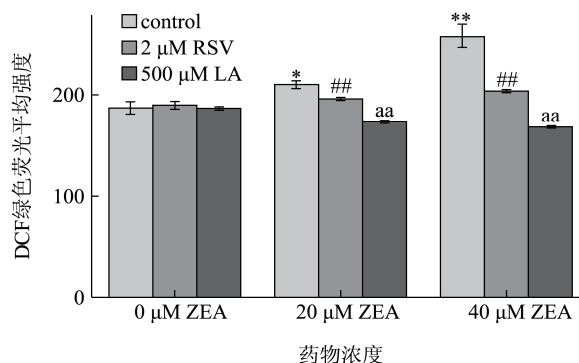
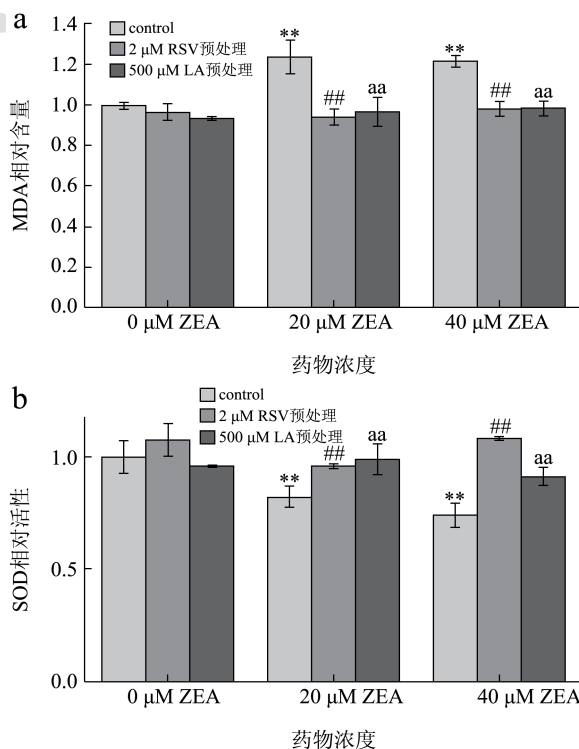


图 4 RSV/LA 预处理对细胞内 ROS 含量的影响

Fig.4 Effect of RSV/LA pretreatment on ZEA-induced intracellular ROS production

注:n=3,\*表明单独 ZEA 处理组与阴性对照组相比差异显著, $p<0.05$ ; \*\*表示差异极其显著, $p<0.01$ ; ##表示 RSV 预处理组与单独 ZEA 处理组相比差异极其显著, $p<0.01$ ; aa 表示 LA 预处理组与单独 ZEA 处理组相比差异极其显著, $p<0.01$ 。



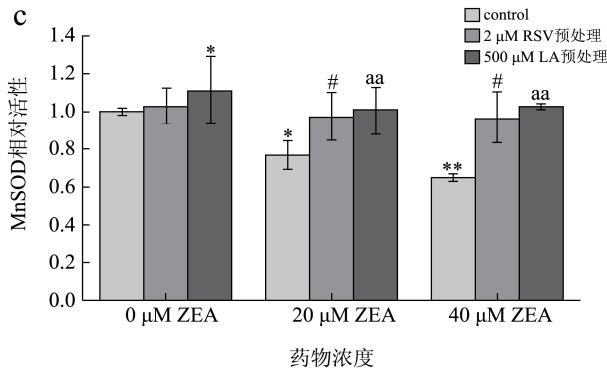


图5 RSV/LA 预处理对细胞抗氧化能力的影响

Fig.5 Effect of RSV/LA on antioxidant ability of HEK293 cells

注: a 为 RSV/LA 预处理对 MDA 相对含量的影响, b 为 RSV/LA 预处理对总 SOD 相对活性的影响, c 为 RSV/LA 预处理对 MnSOD 相对活性的影响。n=3, \*表示单独 ZEA 处理组与阴性对照组相比, 差异显著,  $p < 0.05$ ; \*\*表示差异极其显著,  $p < 0.01$ ; ##表示 RSV 预处理组与单独 ZEA 处理组相比差异极其显著,  $p < 0.01$ ; aa 表示 LA 预处理组与单独 ZEA 处理组相比差异极其显著,  $p < 0.01$ 。

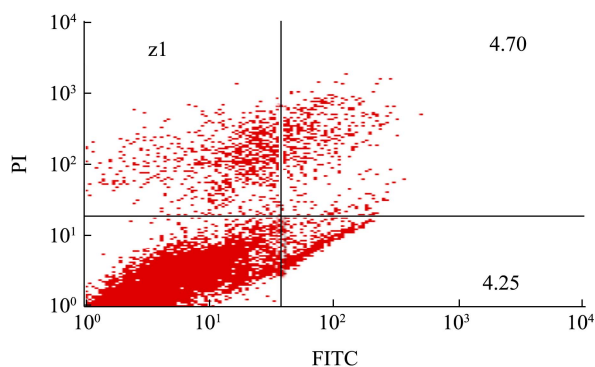
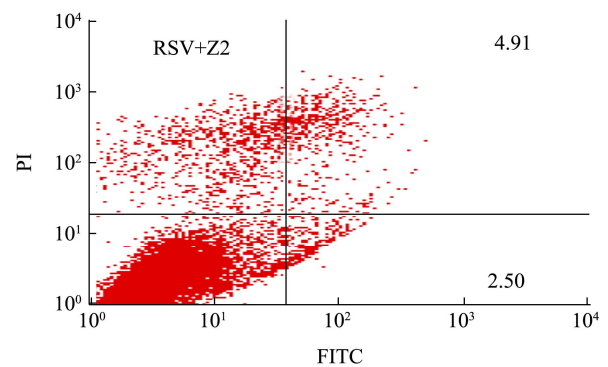
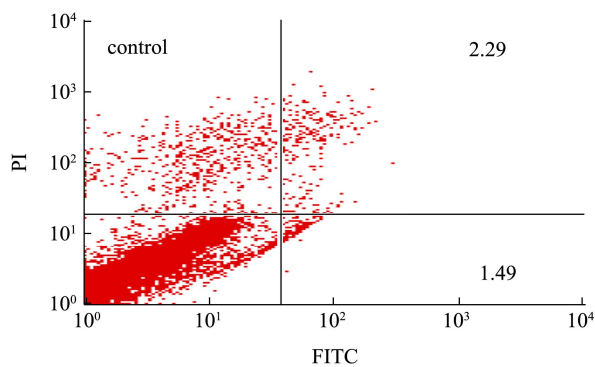
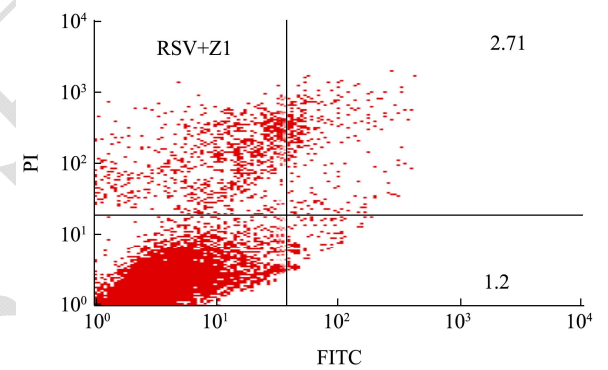
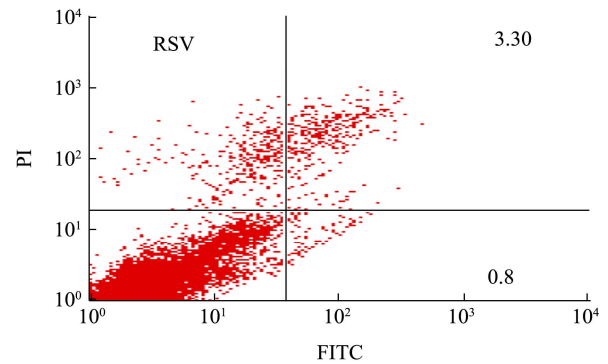
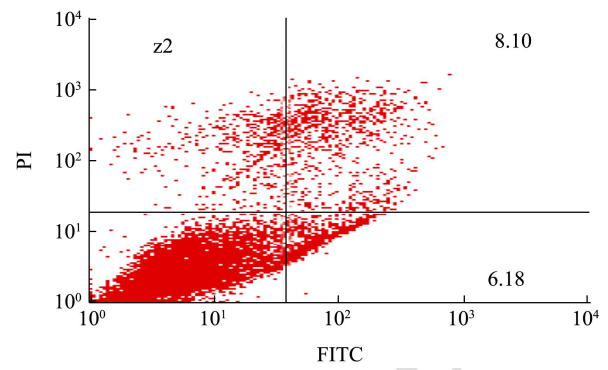
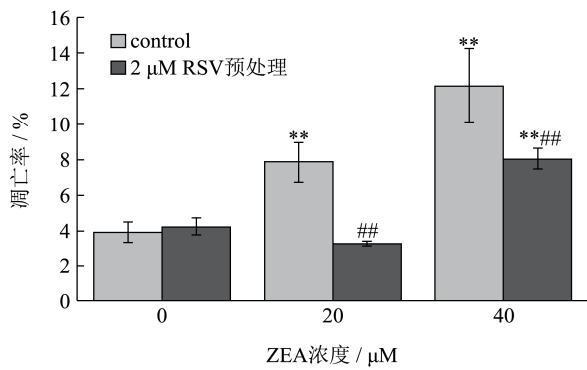


图6 RSV 预处理对 ZEA 引起的细胞凋亡率的影响

Fig.6 Effect of RSV pretreatment on ZEA-induced apoptosis

注: \*表示药物处理组与阴性对照组相比, 差异显著,  $p < 0.05$ ; \*\*表示差异极其显著,  $p < 0.01$ ; ##表示 RSV 预处理组与单独 ZEA 处理组相比, 差异极其显著,  $p < 0.01$ 。

### 2.5 RSV 和 LA 预处理对细胞抗氧化能力的影响



细胞内各种抗氧化酶能反应细胞的氧化还原状态,当细胞受到毒素损伤作用时,氧化还原稳定状态会发生改变。在 ZEA 对细胞染毒前,先用 RSV 和 LA 预处理能提高细胞的抗氧化性,进而抵抗由 ZEA 引起的氧化还原状态的紊乱。如图 5a、b、c,24 h 的 RSV/LA 预处理能降低 ZEA 产生的 MDA 含量,提高总 SOD 和 Mn-SOD 的活性。20 μM、40 μM ZEA 处理细胞后,细胞中 MDA 相对含量显著增加到 1.23、1.21, SOD 相对活性降低到 0.82、0.74, Mn-SOD 相对活性降低到 0.76、0.65。RSV/LA 预处理后 MDA 相对含量、SOD 和 Mn-SOD 相对活性都恢复到正常水平。

### 2.6 RSV 预处理对细胞凋亡率的影响

流失细胞仪检测凋亡早晚期细胞数,结果如图所示,右下角表示凋亡早期,右上角表示凋亡晚期。结果表明,20 μM、40 μM ZEA 处理细胞 24 h 后细胞凋亡率显著上升,RSV 预处理能将 20 μM ZEA 作用于细胞的凋亡率从 8.95%显著降低到 3.91%,将 40 μM ZEA 作用于细胞的凋亡率从 14.28%降低到 7.41%,但是 RSV 预处理并不能使 40 μM ZEA 对细胞的凋亡率降低到正常水平。

### 2.7 RSV/ZEA 对相关基因 mRNA 表达量的影响

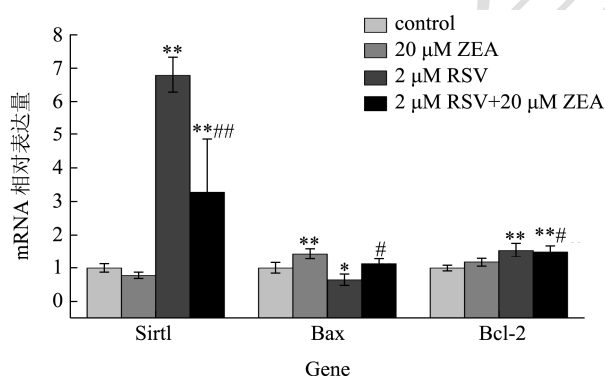


图 7 RSV/ZEA 处理对细胞相关基因 mRNA 相对表达量的影响

Fig.7 Effect of RSV/ZEA treatment on the relative mRNA expression of apoptosis-related genes

注: \*表示药物处理组与对照组相比差异显著,  $p < 0.05$ ;

\*\*表示差异极其显著,  $p < 0.01$ ; #表示 2 Mm RSV 预处理与 ZEA 单独组相比差异显著,  $p < 0.05$ ; ###表示差异极其显著,  $p < 0.01$ 。

为了进一步研究 RSV 干扰 ZEA 的细胞凋亡作用的原因,通过 RT-qPCR 对 RSV 作用细胞的相关基因 *Sirt1* 以及凋亡相关基因 *Bcl-2*、*Bax* 的 mRNA 水平进行研究,实验结果表明,与阴性对照组相比:*Sirt1* 的 mRNA 相对表达量在 RSV 处理组和干扰组都显著增

加到 6.79 和 3.28,而在 ZEA 处理组有下降,无显著差别;*Bax* 的 mRNA 相对表达量在 RSV 组显著降低到 0.65,在 ZEA 组显著升高到 1.44,干扰组没有显著差别;*Bcl-2* 的 mRNA 相对表达量在 RSV 组和干扰组显著升高 1.55 和 1.51,在 ZEA 没有变化。RSV 可能通过增加 *Sirt1* 基因的表达,来降低促凋亡基因 *Bax* 的表达,同时升高抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达,进而起到抗凋亡作用。

### 3 结论

3.1 研究表明,ZEA 可能通过多种毒性机理产生毒性作用,如细胞凋亡毒性机理,ZEA 在非雌激素浓度范围内(导致不到 10%细胞凋亡的浓度范围内),发现能影响靶细胞主要的代谢和合成,导致蛋白质合成被阻止,影响细胞完整性;DNA 损伤毒性机理,ZEA 能损害细菌 SOS 修复、诱导基因改变和细胞核病变,增加人外周淋巴细胞姐妹染色单体交换率,引起仓鼠卵巢细胞的染色体畸变,并在小鼠肝、肾中形成 DNA 加合物<sup>[16]</sup>;氧化损害毒性机理,研究发现抗氧化剂 VE 和葡萄糖醛酸(GA,具有抗氧化性)能阻止 ZEA 对细胞蛋白质毒害,暗示 ZEA 可能通过扰乱细胞的氧化还原状况,导致毒性作用<sup>[17]</sup>。在本次研究中,我们通过测定 ZEA 作用于 293 细胞产生的细胞毒性、对氧化应激相关指标和凋亡率的影响等,初步表明 ZEA 的细胞毒性作用机制可能与氧化应激引起的细胞凋亡有关,而 RSV 预处理明显地降低了 ZEA 的毒性,减轻了氧化应激和细胞凋亡。测定 RSV 发挥保护作用的基因 *SIRT1* 以及凋亡相关基因 *Bax* 和 *Bcl-2* 的 mRNA 相对表达量,结果进一步表明,RSV 可能通过激活 *SIRT1* 发挥抗氧化和抗凋亡作用。

3.2 本次研究从细胞水平和分子水平对 ZEA 的 293 细胞毒性作用及相关机制,以及 RSV 发挥拮抗 ZEA 作用的途径进行了初步探索,结果表明,多酚物质 RSV 能通过激活 *SIRT1*,提高细胞的抗氧化性能,发挥抗凋亡作用。此次研究对利用具有生物活性的食物成分干扰毒素毒性作用,具有十分重要的指导意义。

### 参考文献

[1] Muller H M, Reimann J, Schumacher U, et al. Natural occurrence of *Fusarium* toxins in oats harvested during 5 years in an area of southwest Germany [J]. Food Addit. Contam., 1998, 15: 801-806

[2] Scudamore K A, Patel S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom [J]. Food Addit. Contam., 2000, 15: 30-55

- [3] Etienne M, Jemmali M. Effects of zearalenone (F2) on estrous activity and reproduction in gilts [J]. *J. Anim. Sci.*, 1982, 55(1): 1-10
- [4] Kuiper-Goodman T, Scott P M, Watanabe H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone [J]. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 1987, 7(3): 253-306, Review
- [5] R M Farb, J L Mego, W Hayes. Effect of mycotoxins on uptake and degradation of albumin in mouse liver and kidney lysosomes [J]. *Toxicol. Environ. Health*, 1(1976): 985-990
- [6] K Maaroufi, L Chekir, E E Creppy, et al. Zearalenone induce modifications of haematological and biochemical parameters in rats [J]. *Toxicol.*, 1996, 34: 535-540
- [7] E E Golli, W Hassen, A Bouslimi, et al. Induction of Hsp 70 in *Vero* cells in response to mycotoxins cytoprotection by sub-lethal heat shock and by vitamin E [J]. *Toxicol. Lett.*, 2006, 166: 122-130
- [8] Z Ouanes, S Abid, I Ayed, et al. Induction of micronuclei by zearalenone in *Vero* monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of vitamin E [J]. *Mutat. Res.*, 2003, 538: 63-70
- [9] L M Hung, J K Chen, S S Huang, et al. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes [J]. *Cardiovasc. Res.*, 2000, 47: 549-555
- [10] J H Jang, Y J Surh. Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death [J]. *Free Radical Biol. Med.* 2003, 34: 1100-1110
- [11] Vaziri H, Dessain S K, Eaton E N, et al. hSIR2/SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase [J]. *Cell*, 2001, 107: 149-159
- [12] Hou X, Xu S, Maitland-Toolan, et al. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase [J]. *Biol. Chem.*, 283, 20015- 20026
- [13] Pfluger P T, Herranz D, Velasco-Miguel S, et al. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008, 105: 9793-9798
- [14] P J Elliott, M Jirousek. Sirtuins: novel targets for metabolic disease [J]. *Curr. Opin. in Investig. Drugs.* 2008, 9(4): 371-378
- [15] Walle T, Hsieh F, DeLegge M H, et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans [J]. *Drug Metab. Dispos.*, 32(2004) 1377-1382
- [16] Abid-Essefi S, Baudrimont I, Hassen W, et al. DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by vitamin E [J]. *Toxicology*, 2003, 192 (2-3): 237-248
- [17] Quane Z, Abid S, Ayed I, et al. Induction of micronuclei by zearalenone in *vero* monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of vitamin E [J]. *Mutation Res.*, 2003, 538: 63-70