

# 呕吐毒素对人心肌细胞AC16增殖和凋亡的影响

张百刚\*, 李阳, 焦禄, 付炳刚

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050)

**摘要:** 该研究旨在探讨呕吐毒素对人心肌细胞 AC16 增殖和凋亡的影响。不同浓度的呕吐毒素处理人心肌细胞 AC16 后, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率, 荧光显微镜观察细胞形态学变化, 通过乳酸脱氢酶释放检测细胞毒性, Annexin V-FITC 流式细胞法检测凋亡率的变化, JC-1 荧光探针法检测线粒体膜电位的变化。Western blotting 测定 Bax 和 Bcl-2 凋亡相关蛋白的表达水平。结果表明, 呕吐毒素显著抑制 AC16 细胞增殖并诱导凋亡, 呈现明显的剂量效应关系。2、4、8  $\mu\text{mol/L}$  的呕吐毒素处理 24 h 后, 细胞凋亡率分别为 14.89%、43.20% 和 51.40%。线粒体膜电位表达水平的变化暗示呕吐毒素可能通过线粒体途径引起 AC16 细胞凋亡。Western blotting 结果表明, 呕吐毒素上调了 Bax 蛋白表达, 下调了 Bcl-2 蛋白表达。综上所述, 呕吐毒素对 AC16 细胞有毒性效应, 具有明显的抑制增殖效果, 并促使细胞发生凋亡, 线粒体膜电位的变化显示呕吐毒素可能是通过线粒体途径诱导了人心肌细胞 AC16 的凋亡。该研究为进一步研究呕吐毒素对心肌和细胞的损伤机制提供了理论支持。

**关键词:** 呕吐毒素; AC16 细胞; 凋亡; 增殖

文章编号: 1673-9078(2025)04-109-116

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.0183

## Effects of Vomitoxin on Proliferation and Apoptosis of Human Myocardial Cell AC16

ZHANG Baigang\*, LI Yang, JIAO Lu, FU Binggang

(College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

**Abstract:** The effect of vomitoxin on the proliferation and apoptosis of human cardiomyocytes AC16 was explored in this study. After treatment of human cardiomyocytes AC16 with different concentrations of vomitoxin, the cell proliferation inhibition rate was detected by CCK-8 assay. The morphological changes of cells were observed by fluorescence microscopy, the cytotoxicity was detected by lactate dehydrogenase release, the shift in apoptosis rate was detected by Annexin V-FITC flow cytometric assay, and the change of mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 fluorescent probe assay. The western blotting measured the apoptosis-associated proteins Bax and Bcl-2 expression levels. The results indicated that vomitoxin significantly inhibited cell proliferation and induced apoptosis in AC16 cells in a dose-dependent manner. Apoptosis rates of 14.89%, 43.20%, and 51.40% were observed after treatment with 2, 4, and 8 mol/L vomitoxin for 24 hours, respectively. The change in mitochondrial membrane potential expression level implied that vomitoxin may cause apoptosis of AC16 cells through the mitochondrial pathway. Western blotting results demonstrated up-regulation of Bax expression and down-regulation of Bcl-2 expression by vomitoxin. In summary, vomitoxin exerts a toxic effect on AC16 cells, significantly

引文格式:

张百刚,李阳,焦禄,等.呕吐毒素对人心肌细胞AC16增殖和凋亡的影响[J].现代食品科技,2025,41(4):109-116.

ZHANG Baigang, LI Yang, JIAO Lu, et al. Effects of vomitoxin on proliferation and apoptosis of human myocardial cell AC16 [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 109-116.

收稿日期: 2024-02-08

基金项目: 甘肃省高等学校科研项目(2016B-024); 甘肃省自然科学基金项目(18JR3RA136); 国家自然科学基金地区科学基金项目(31760495)

作者简介: 张百刚(1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 2160693904@qq.com

inhibiting cell growth and promoting cell death through apoptosis. The changes in mitochondrial membrane potential indicate that vomitoxin may induce the apoptosis of human cardiomyocytes AC16 through the mitochondrial pathway. The results provide theoretical support for further research on myocardial and cellular damage mechanisms by vomitoxin.

**Key words:** vomitoxin; AC16 cells; apoptosis; proliferation

呕吐毒素 (Vomitoxin) 又名脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON)<sup>[1]</sup>, 其化学名称为 3,7,15-三羟基-12,13-环氧单端孢霉-9-烯-8-酮<sup>[2]</sup>, 属镰刀菌产生的 B 族单端孢霉烯族毒素<sup>[3]</sup>, 是最为常见的霉菌毒素之一。这种毒素最初是在 20 世纪 70 年代由日本科学家 Yoshizawa 等<sup>[4]</sup>在发霉的小麦和禾谷类食物中分离和确定的。DON 主要污染饲料、谷物及其副产品等。DON 在我国污染很普遍, 2022 年我国各省饲料原料中霉菌毒素污染调查中, DON 检出率高达 88% 以上<sup>[5]</sup>。摄入含 DON 的食物对人和动物可能产生一系列不良反应, 包括头昏、呕吐、胃肠炎等症状<sup>[6]</sup>, 如果摄入过量 DON, 还可引发免疫功能下降、畸形和癌症等问题<sup>[7]</sup>。此外, 长期接触 DON 可损伤正常皮肤, 甚至造成皮肤肿瘤<sup>[8]</sup>。DON 由于其物理性质和化学结构稳定性, 在高温烹饪和烘烤中仅部分被破坏<sup>[9]</sup>, 并且它可以在动物组织中积累并穿透血脑屏障进入大脑。目前尚无针对 DON 中毒的特异性疗法, 已知的预防措施是避免暴露, 因此了解 DON 的毒性作用和机制, 为更好的应对摄入 DON 导致的疾病就变得很重要。

因此, DON 由于极强的危害性和广泛存在受到了全球许多国家的关注。2017 年, DON 被国际癌症研究机构归入三类致癌物。国内外大量研究表明, DON 可导致各种免疫细胞死亡, 如单核细胞、巨噬细胞等<sup>[10]</sup>, 同时在肠道、脾脏、肝脏和肾脏细胞中也观察到细胞凋亡, DON 已被证实可通过氧化应激、DNA 损伤、内质网应激、细胞周期阻滞和线粒体途径等诱导细胞凋亡<sup>[11-14]</sup>。其中线粒体在控制细胞凋亡方面起着关键作用, 细胞凋亡的早期特征是线粒体受损<sup>[15]</sup>。肠道是 DON 作用的主要器官, 最近的研究表明, 线粒体功能障碍是 DON 肠道毒性的一个关键因素<sup>[16]</sup>。线粒体靶向治疗 DON 诱导的肠道损伤也被认为是重要的一个方向, 已有研究用番茄红素维持线粒体稳态发现能缓解 DON 对 IPEC-J2 细胞的毒性<sup>[17]</sup>。适当的线粒体功能和动力学在具有高能量需求的组织和细胞 (如心脏) 中尤为必要。目前国内外对 DON 心肌毒性作用和机制的研究较少, 在大鼠心肌细胞中, 发现 DON 影响

了线粒体的正常功能<sup>[18]</sup>, 但具体的机制并未阐述。本研究以人心肌细胞 AC16 为研究模型, 探究 DON 对 AC16 细胞的增殖抑制和诱导凋亡的作用机理, 为进一步阐述 DON 的心肌和细胞毒性机制提供更多理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株及试验试剂

人心肌细胞 (AC16), 购自于上海中科院细胞库; DON (白色粉末、纯度 $\geq 97\%$ ), 购自麦克林生物试剂; 胎牛血清 (FBS), 购自 ABW (美国) 公司; DMEM (高糖) 培养基、青霉素和链霉素以及 PBS, 购自上海源培生物; CCK-8 购自 AbMole (美国) 公司; 细胞凋亡—Hoechst 染色 (C0003)、LDH (C0017)、Annexin V-FITC (C1062M) 试剂盒, 均购自碧云天 (中国上海) 公司; JC-1, 购自 UE 生物公司; Bax 和 Bcl-2 抗体, 均购自 Proteintech (美国) 公司; 高效 RIPA 裂解液, 购自 Solarbio (北京) 公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

HF240 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱, 上海力新仪器有限公司; Infinte 200pro 多功能酶标仪, 瑞士 TECAN 公司; H1850R 高速冷冻离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; PA53 FS6 生物荧光显微镜, 麦克奥迪实业集团有限公司; BD Accuri C6 Plus 流式细胞仪, 美国 BD 公司; 垂直电泳槽、湿式转移槽, 韦克斯科技有限公司

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养

将 AC16 细胞至于 T25 的培养瓶中, 用体积含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基 (青霉素和链霉素分别为 100 U/L) 培养, 在  $\varphi=5\%$  CO<sub>2</sub> 和 37 °C 下培养 (每天换液一次), 细胞每 2~3 d 传代一次, 当细胞达到对数生长期时, 用 0.25% 的胰酶进行消化和传代。

### 1.2.2 AC16细胞增殖试验

于96孔板中每孔接种100  $\mu\text{L}$  ( $5 \times 10^3$  cells) AC16细胞,待其生长到对数期后,分别添加不同浓度的DON(0、2、4、6、8和10  $\mu\text{mol/L}$ ),在培养箱(5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$ )中培养24 h,每孔加入10  $\mu\text{L}$ 的CCK-8溶液,37  $^\circ\text{C}$ 孵育2 h,最后使用酶标仪在波长450 nm处测定吸光值<sup>[19]</sup>。设置5个重复孔,实验重复3次。

于96孔板中每孔接种100  $\mu\text{L}$  ( $5 \times 10^3$  cells) AC16细胞,待其生长到对数期后,加入6  $\mu\text{mol/L}$ 的DON,培养箱中(5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$ )培养0、6、12、24、48和72 h后,加入每孔10  $\mu\text{L}$ 的CCK-8溶液,37  $^\circ\text{C}$ 孵育2 h,最后使用酶标仪在波长450 nm处测定吸光值。设置5个重复孔,实验重复3次。细胞存活率的方法如下计算。

细胞存活率计算公式为:

$$Y = \frac{\text{OD}_{\text{treat}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$Y$ —细胞存活率, %;

$\text{OD}_{\text{treat}}$ —处理组上清液在450 nm处的吸光度;

$\text{OD}_{\text{control}}$ —对照组上清液在450 nm处的吸光度。

### 1.2.3 细胞凋亡形态检测

于6孔板中每孔接种1 000  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^5$  cells) AC16细胞,待其生长到对数期后,分别添加不同浓度的DON(0、2、4、6、8和10  $\mu\text{mol/L}$ ),将细胞培养于含有5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$ 的培养箱中,培养结束后,吸去每个孔中的培养液,每孔加入500  $\mu\text{L}$ 固定液进行10 min的预处理。固定完成后,PBS清洗孔中残留的固定液2次,每次3 min。去除PBS后,每孔加入500  $\mu\text{L}$  Hoechst33258染液染色5 min。吸去染色液后,PBS洗3 min,洗去残留的染色液。最后在每个小孔中滴加适量抗荧光封片液进行封片<sup>[20]</sup>,获得的样品需进行避光保存,随后用荧光显微镜观察其形态学变化。

### 1.2.4 细胞凋亡率测定

于6孔板中每孔接种1 000  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^5$  cells) AC16细胞,待其生长到对数期后,分别添加不同浓度的DON(0、2、4和8  $\mu\text{mol/L}$ ),在培养箱(5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$ )中培养24 h,去除培养液并用PBS洗涤1遍,随后用0.25%胰酶处

理细胞,消化完成后,除去胰酶,然后往离心管中加入1 mL DMEM培养基(含10%体积分数的FBS),1 000 g离心5 min收集细胞。加入195  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC结合液重悬细胞,然后加入5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC,最后加入10  $\mu\text{L}$ 碘化丙啶,避光室温下处理15 min,中途颠倒2~3次离心管以保证染色效果,最后于流式细胞仪上检测。

### 1.2.5 细胞中LDH的测定

于96孔板中每孔接种100  $\mu\text{L}$  ( $5 \times 10^3$  cells) AC16细胞,待其生长到对数期后,分别添加浓度为0、2、4、6、8和10  $\mu\text{mol/L}$ 的DON,在培养箱(5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$ )中培养24 h后。吸取上清,加入新的96孔板中,各孔加入60  $\mu\text{L}$  LDH检测工作液,然后用锡纸包裹起来,在摇床上缓慢摇动30 min,随后在490 nm处测定吸光度,每组各设3个复孔,实验平行3次。

### 1.2.6 细胞线粒体膜电位的测定

于6孔板中每孔接种1 000  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^5$  cells) AC16细胞,待其生长到对数期后,分别添加不同浓度的DON(0、2、4和8  $\mu\text{mol/L}$ ),在培养箱( $\varphi=5\%$   $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$ )中培养24 h后,PBS洗涤1次,分别加入1 mL细胞培养基和1 mL 1 $\times$ JC-1染色工作液,培养20 min。孵育结束后,用4  $^\circ\text{C}$ 的1 $\times$ 检测缓冲液洗涤2次。最后每孔再加入2 mL细胞培养基,最后按照不同激发波长要求在荧光显微镜下观察并拍照<sup>[21]</sup>。

### 1.2.7 Western blotting 检测Bax和Bcl-2蛋白的表达水平

将对数生长期AC16细胞接种到T25细胞培养瓶中,大约生长至80%~90%后,分别加入不同浓度的DON(0、2、4、6、8和10  $\mu\text{mol/L}$ ),培养24 h后同时收集上清液和细胞样本。在RIPA中以4  $^\circ\text{C}$ 条件进行30 min的裂解,裂解样品12 000 g,4  $^\circ\text{C}$ 离心15 min,取上清液,使用BCA法测量其浓度<sup>[22]</sup>。固定上样60  $\mu\text{g}$ 蛋白,10%的分离胶,进行SDS-PAGE电泳,电泳完成后湿转到PVDF膜上,转膜需在冰浴条件下进行。转膜完成后,将膜条带放置于封闭液中处理1.5 h。加入一抗后4  $^\circ\text{C}$ 摇床过夜,TBST洗膜3次,每次5 min,最后加入二抗溶液,于摇床上处理1.5 h。实验结果用Image J软件进行处理,以目的条带与内参条带灰度值比值作为结果进行绘图。

1.2.8 数据处理

使用 GraphPad Prism 8.4.3 软件进行制作图表并进行单因素方差分析。实验重复 3 次，实验数据用平均数 ± 标准差表示，若  $P < 0.05$  时，则认为存在差异显著，具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 DON抑制AC16细胞的增殖

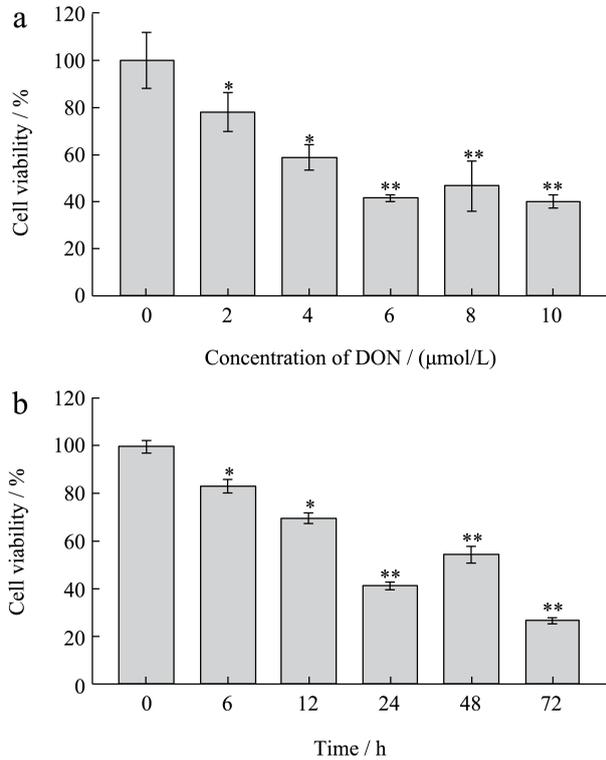


图 1 DON 对 AC16 细胞的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of DON on AC16 cell

注：a：不同浓度 DON 对 AC16 细胞存活率的影响；b：AC16 在 6 μmol/L DON 处理不同时间后细胞的存活率。  
\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

DON 对 AC16 细胞增殖的抑制作用如图 1 所示，随着 DON 浓度的升高，对 AC16 细胞的增殖抑制作用逐渐增强。不同浓度（2、4、6、8、10 μmol/L）的 DON 对 AC16 细胞的抑制率分别为 21.87%、41.05%、58.41%、53.34% 和 59.72%；不同时间段（0、6、12、24、48 和 72 h）6 μmol/L 的 DON 处理 AC16 细胞后，细胞的存活率为 99.73%、83.07%、69.27%、41.58%、55.27% 和 27.07%。从细胞存活率可知，AC16 细胞经 6 μmol/L DON 处理 72 h 后细胞毒性达到最大。实验结果显示，DON 在较低浓度下对 AC16 细胞产生了毒性，并且 DON 对 AC16 细胞增殖抑制具有一定的剂量 - 效应关

系。Xu 等<sup>[23]</sup>的研究也发现，当用 0.125、0.25 和 0.5 μg/mL DON 处理 6、12 和 24 h 后，细胞表现出不同程度的损伤，包括细胞数量和活力降低、细胞收缩和漂浮。

2.2 细胞形态的变化

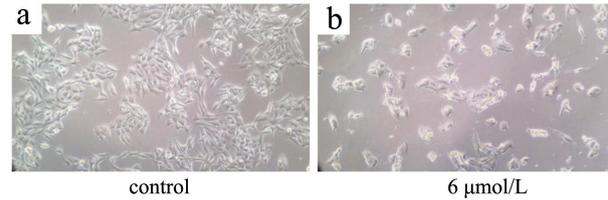


图 2 不同浓度 DON 处理 AC16 细胞图 ( × 200 )

Fig.2 AC16 cells treated with different concentrations of DON ( × 200 )

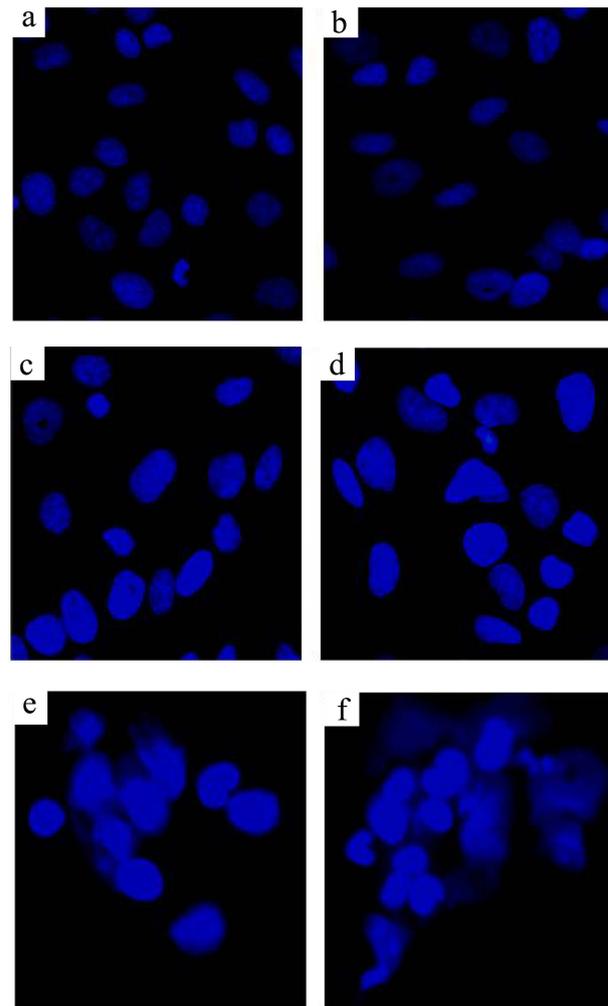


图 3 AC16 细胞在经过不同浓度的 DON 处理后的 Hoechst 荧光染色照片 ( × 400 )

Fig.3 Different concentrations of DON processed AC16 Hoechstfluorescence staining photos ( × 400 )

注：a 为 control，b 为 2 μmol/L，c 为 4 μmol/L，d 为 6 μmol/L，e 为 8 μmol/L，f 为 10 μmol/L。

由图 2 中可看出, 正常培养 24 h 后的 AC16 细胞贴壁生长, 细胞生长状况良好且饱满细胞轮廓清晰, 形状呈多角形或梭形、棱角分明。6  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理 24 h 后的 AC16 相较于正常细胞, 可发现出现大量的细胞死亡, 细胞边界形态被破坏, 这表明 DON 对细胞有毒性作用, 并且导致细胞受损。Hoechst 染色结果由图 3 所示, 在不同浓度 DON 作用下, 对照组的细胞呈现出正常的颜色, 染色质均匀、没有浓缩和边集现象。经过 DON 处理的实验组出现典型的凋亡特征, 呈现明显亮蓝色, 核染色质凝结和核收缩, 出现凋亡小体。6  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理后的细胞, 细胞内凋亡和死亡细胞的比例增大, 10  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理后的细胞, 出现了更多碎块化, 细胞膜发生破碎, 内容物外泄, 细胞呈现明显的凋亡或死亡状态。我们之前的研究也发现, 30  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理后的 HK2 细胞可明显破坏细胞形态, 更高浓度如 40  $\mu\text{mol/L}$  和 80  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理后的 HK2 细胞, 荧光染色可发现凋亡和死亡细胞的比例不断上升<sup>[24]</sup>。这表明 DON 对细胞形态有较大影响。

### 2.3 细胞凋亡率的检测

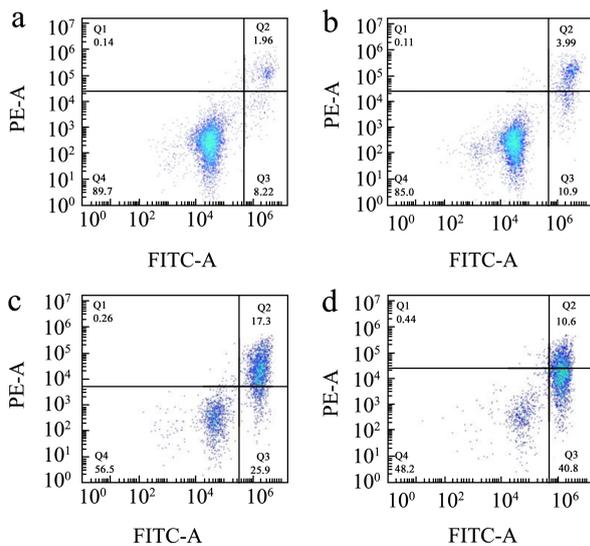


图 4 DON 对 AC16 细胞凋亡率的影响

Fig.4 The effect of DON on AC16 cell apoptosis rate

注: a: 对照; b: 2  $\mu\text{mol/L}$  DON; c: 4  $\mu\text{mol/L}$  DON; d: 8  $\mu\text{mol/L}$  DON。

经过 DON 处理 24 h 后细胞凋亡率的变化如图 4 所示, AV/PI 双染法可以检测到不同时期凋亡的细胞, 细胞在凋亡早期将磷脂酰丝氨酸转置到细胞表面, AV 与细胞表面的磷脂酰丝氨酸结合, 而

坏死和凋亡晚期的细胞可以被 PI 染色, 从而可以用来检测不同时期凋亡的细胞<sup>[25]</sup>。随着 DON 的浓度增加, 细胞凋亡率也逐渐提高。2  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理的细胞, 细胞凋亡率为 14.89%, 而 4  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理的细胞, 细胞凋亡率上升至 43.20%, 当 DON 浓度升至 8  $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞凋亡率高达 51.40%。结果表明, DON 浓度的提高会显著提升细胞凋亡率, 这说明 DON 浓度的升高对 AC16 细胞的凋亡具有明显的促进作用。细胞凋亡是 DON 造成细胞死亡的主要方式, 我们的结果也表明 DON 通过细胞凋亡影响了 AC16 细胞的正常生长。

### 2.4 细胞内 LDH 的含量

根据图 5 显示, DON 对 AC16 细胞内 LDH 释放有一定影响。LDH 是一种稳定的细胞质酶, 存在于所有细胞中。当细胞膜受损时, LDH 会迅速释放到细胞培养上清液中<sup>[26]</sup>。当 DON 浓度增加时, 会引起细胞内 LDH 被释放。正常情况下, 细胞 LDH 释放率仅为 27.52%。经过 2  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理后的细胞, 其细胞 LDH 释放率上升至 33.72%。4  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理后的细胞, 细胞 LDH 释放率升高至 39.37%。当 6  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理后的细胞, 细胞 LDH 释放率升高至 47.16%。8  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理后的细胞 LDH 释放率达到 46.73%。10  $\mu\text{mol/L}$  DON 处理后的细胞 LDH 释放率达到 41.83%。在 0.5  $\mu\text{g/mL}$  DON 诱导 24 h 后的 IPEC-J2 细胞中也发现 LDH 释放的增加<sup>[27]</sup>。这表明, 细胞的毒性作用随着 DON 浓度的升高不断增强, 细胞膜遭受 DON 的破坏, 使得细胞发生凋亡或坏死, 接着导致细胞膜内的 LDH 被释放至培养液中, 从而被检测出来。

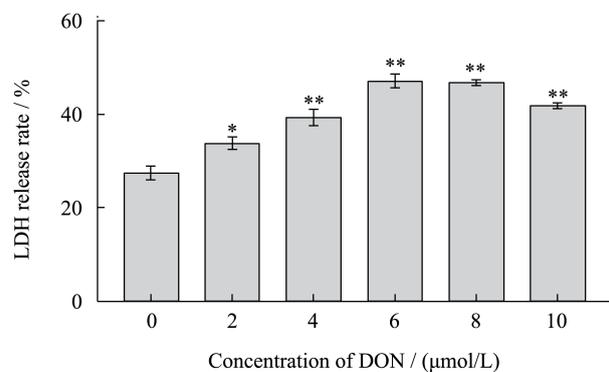


图 5 AC16 细胞内 LDH 释放率随 DON 浓度的影响

Fig.5 The rate of LDH release in AC16 cells is affected by varying concentrations of DON

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

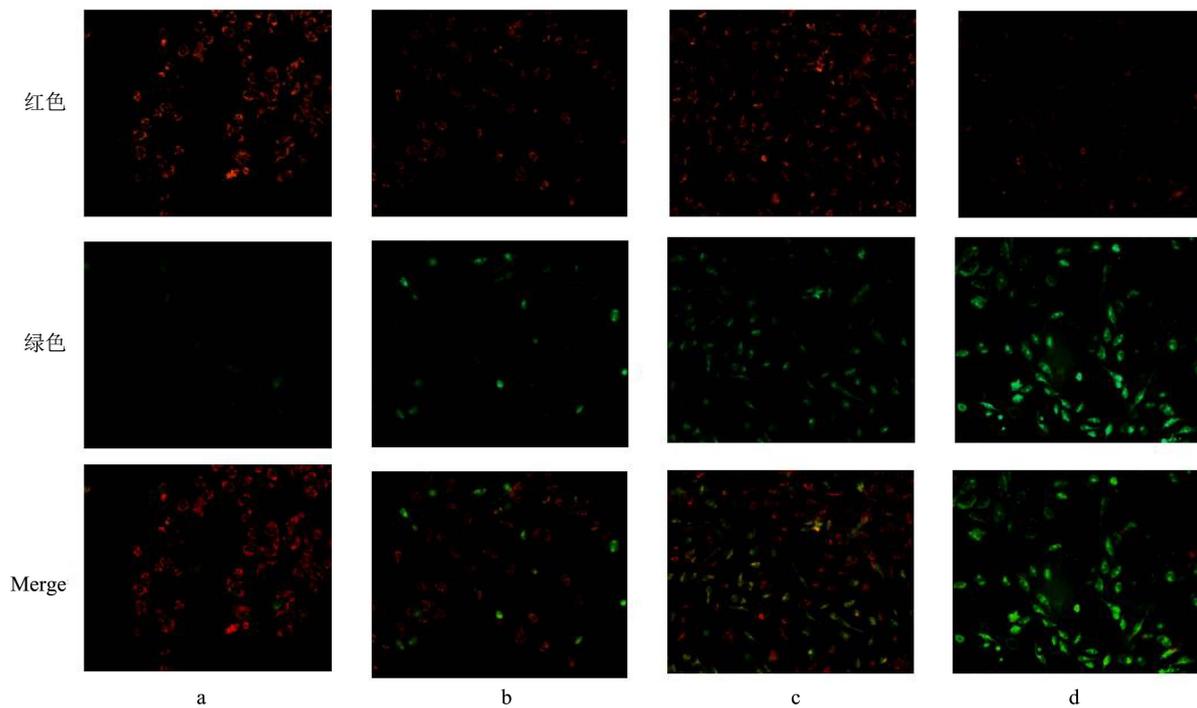


图6 不同浓度 DON 对 AC16 细胞线粒体膜电位的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of DON on mitochondrial membrane potential in AC16 cells

注: a: 对照; b: 2  $\mu\text{mol/L}$  DON; c: 4  $\mu\text{mol/L}$  DON; d: 8  $\mu\text{mol/L}$  DON。

## 2.5 DON对AC16细胞线粒体膜电位的影响

DON对线粒体膜电位的影响如图6所示,细胞凋亡早期的特征是线粒体受损,线粒体的受损特征包括膜电位( $\Delta\Psi\text{m}$ )的改变和线粒体外膜通透化(MOMP)<sup>[28]</sup>,JC-1是线粒体膜电位的敏感标记物,在高膜电位线粒体中,JC-1积累,并且由于其高浓度,自发形成可逆聚集体(J聚集体),其表现出红色荧光。能量较低的线粒体(即低膜电位)中,线粒体内JC-1染料的浓度降低,形成的J聚集体减少,因此,JC-1保持其单体状态,表现出绿色荧光。当DON浓度为2  $\mu\text{mol/L}$ 时,从荧光显微镜中看到基本为红色的JC-1线粒体聚合物。然而,随着DON浓度的增大,绿色的JC-1线粒体单体的占比不断上升,经过DON处理后的细胞显示出细胞线粒体膜电位降低和膜通透性增加。当DON浓度达到8  $\mu\text{mol/L}$ 时,从荧光显微镜中看到基本为绿色JC-1线粒体单体。Xu等<sup>[23]</sup>的研究也发现,DON通过降低HaCaT细胞线粒体膜电位诱导线粒体损伤和细胞凋亡。这表明DON造成了AC16细胞线粒体损伤,可能通过线粒体途径引起AC16细胞的凋亡,并且与DON的浓度呈现依赖性。

## 2.6 DON对AC16细胞内凋亡蛋白表达的影响

图7结果表明,Bax蛋白表达随着DON浓度的增加而上升;Bcl-2蛋白表达随着DON浓度的增加而下降。细胞凋亡作为一种主要的程序性细胞死亡的方式,其能够清除不再需要或存在潜在危险的细胞<sup>[29]</sup>,在这个过程中,Bcl-2蛋白家族发挥了关键性的作用。该家族通过其引发的细胞凋亡特性被细划分两类,一类为抗凋亡蛋白(如Bcl-XL、Bcl-2等)另一类则是促凋亡蛋白(如Bax、Bak等)<sup>[30]</sup>。Bcl-2是抗凋亡蛋白,可稳定线粒体膜的完整性,抑制线粒体中细胞凋亡诱导因子和细胞色素c的释放,还可防止钙从线粒体中流出,从而稳定线粒体膜电位<sup>[31]</sup>。Bcl-2表达的增加可以有效防止细胞损伤并防止细胞凋亡<sup>[32]</sup>。Bax是促凋亡蛋白,对Bcl-2具有拮抗作用,Bax和Bcl-2结合为异二聚体以抵消Bcl-2的抗凋亡作用<sup>[33]</sup>,当它的表达量增加时,会触发细胞凋亡的发生。Wang等<sup>[34]</sup>的研究也表明,DON通过激活线粒体凋亡途径诱导PC12细胞凋亡,并抑制线粒体相关抗凋亡基因Bcl-2和刺激促凋亡基因Bax表达。结合之前的实验结果表明,DON可能通过线粒体凋亡途径诱导了AC16细胞的凋亡。

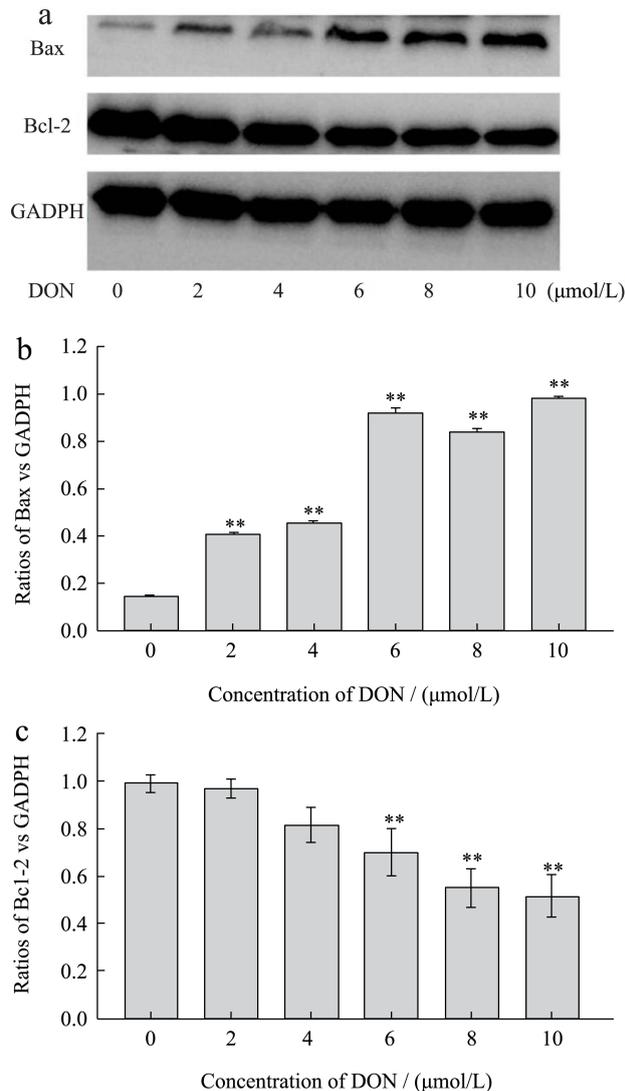


图7 Bax、Bcl-2 蛋白在 AC16 细胞中的表达水平  
Fig.7 The level of Bax and Bcl-2 proteins expressed in AC16 cells

注: \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ 。

### 3 结论

DON 可抑制人心肌细胞 AC16 的增殖, 并呈现显著的剂量和时间效应关系。AC16 细胞在暴露于 DON 后会发形态变化, 呈现出经典的凋亡细胞特征和细胞正常结构的破坏。细胞凋亡率的测定结果进一步表明, DON 浓度的增高诱导了 AC16 细胞凋亡率的升高。LDH 实验表明 DON 对 AC16 细胞膜造成了损伤, DON 浓度的增加对细胞的毒性作用不断增强, 造成细胞内 LDH 释放量增加。DON 还造成了 AC16 线粒体损伤, 表现为细胞线粒体膜电位和膜通透性的改变。AC16 细胞凋亡相关蛋白表达的测定结果显示, DON 可上调 Bax 蛋白表达, 抑制了 Bcl-2 的蛋白表达。

线粒体途径诱导的细胞凋亡是研究 DON 毒性的重要方向之一, 已有研究表明 DON 可通过线粒体凋亡途径诱导 PC12、DF-1 等细胞的凋亡<sup>[35,36]</sup>。综上所述, DON 对人心肌细胞的增殖具有一定的抑制作用并诱导其凋亡, 其凋亡通路的启动可能与线粒体途径有关, 但详细的作用机制仍需后续深入研究。本研究通过体外细胞株研究了 DON 的心肌毒性, 为探究 DON 对人体毒性作用和机理, 应对由于 DON 暴露导致的疾病, 以及为完善 DON 在食品中的限量标准提供研究基础。

### 参考文献

- [1] KARAMI S, PAPARI S, KLINGHOFFER N B, et al. Pyrolytic conversion of vomitoxin-contaminated corn into value-added products [J]. Sustainability, 2022, 14(19): 12842.
- [2] YOSHIZAWA T, TAKEDA H, OHI T. Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a tricho-thecane mycotoxin, in animals [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 2014, 47(9): 2133-5.
- [3] SILU H, JINGJIAO M, YUQIANG C, et al. DON induced DNA damage triggers absence of p53-mediated G2 arrest and apoptosis in IPEC-1 cells [J]. Toxicology, 2024, 501: 153707.
- [4] YOSHIZAWA T, MOROOKA N. Deoxynivalenol and its monoacetate :new mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1973, 37(12): 2933-2934.
- [5] 苏青云, 齐莎日娜, 雷元培, 等. 2022年中国饲料和原料中霉菌毒素污染调查报告 [J]. 饲料工业, 2024, 45(9): 121-125.
- [6] YUANG T, SHIQI L, PEIRAN C, et al. Global distribution, toxicity to humans and animals, biodegradation, and nutritional mitigation of deoxynivalenol: A review [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(5): 3951-3983.
- [7] BILAL M, LILI W, XIAOYU L, et al. Recalling the reported toxicity assessment of deoxynivalenol, mitigating strategies and its toxicity mechanisms: Comprehensive review [J]. Chemico-Biological Interactions, 2023, 387: 110799.
- [8] CHEN J, ZHOU Z, WU N, et al. Chlorogenic acid attenuates deoxynivalenol-induced apoptosis and pyroptosis in human keratinocytes via activating Nrf2/HO-1 and inhibiting MAPK/NF-κB/NLRP3 pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 170: 116003.
- [9] ZHAO P, LIANGKAI C, K N A, et al. Current sights for mechanisms of deoxynivalenol-induced hepatotoxicity

- and prospective views for future scientific research: A mini review [J]. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 2017, 37(5): 518-529.
- [10] AWAD W, GHAREEB K, BÖHM J, et al. The toxicological impacts of the fusarium mycotoxin, deoxynivalenol, in poultry flocks with special reference to immunotoxicity [J]. *Toxins*, 2013, 5(5): 912-925.
- [11] JING Z, QINGBO Z, ZHIHUI X, et al. Deoxynivalenol induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis via the IRE1/JNK/CHOP pathway in porcine alveolar macrophage 3D4/21 cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2023, 180: 114033.
- [12] SILU H, YUQIANG C, ZHAOFEI W, et al. DON entry into the nucleus induces DNA damage, apoptosis and cycle arrest in GES-1 cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2022, 171: 113531.
- [13] SOUZA M D, BAPTISTA A A S, VALDIVIEZO M J J, et al. *Lactobacillus* spp. reduces morphological changes and oxidative stress induced by deoxynivalenol on the intestine and liver of broilers [J]. *Toxicon*, 2020, 185: 203-212.
- [14] F. L., X. Y., L. H., et al. Effects of deoxynivalenol on the histomorphology of the liver and kidneys and the expression of MAPKs in weaned rabbits [J]. *World Mycotoxin Journal*, 2022, 15(4): 393-406.
- [15] MARTINOU J-C, YOULE R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics [J]. *Developmental Cell*, 2011, 21(1): 92-101.
- [16] DONGFANG X, PING Y, YANYU Y, et al. Deoxynivalenol triggers porcine intestinal tight junction disorder through hijacking SLC5A1 and PGC1 $\alpha$ -mediated mitochondrial function [J]. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 2022, 163: 112921.
- [17] CAI Z, CHEN F, WANG Y, et al. Lycopene maintains mitochondrial homeostasis to counteract the enterotoxicity of deoxynivalenol [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(11): 1958.
- [18] NGAMPONGSA S, HANAFUSA M, ANDO K, et al. Toxic effects of T-2 toxin and deoxynivalenol on the mitochondrial electron transport system of cardiomyocytes in rats [J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2013, 38(3): 495-502.
- [19] MENGXUAN L, NAN C, XINGZHE L, et al. Dauricine regulates prostate cancer progression by inhibiting PI3K/AKT-dependent M2 polarization of macrophages [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2023, 217: 115838.
- [20] WANG D, WANG S, LIU W, et al. Hydroxysafflor yellow B induces apoptosis via mitochondrial pathway in human gastric cancer cells [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2022, 74(9): 1320-1329.
- [21] REN B, CHEN D F, ZHAO X J, et al. Evaluating biological activity of folic acid-modified and 10-hydroxycamptothecin-loaded mesoporous silica nanoparticles [J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2022, 292: 126756.
- [22] CUI X, GONG Y, GE J, et al.  $\alpha$ -Solanine induces ferroptosis in nasopharyngeal carcinoma via targeting HSP90 $\alpha$ /p53 axis [J]. *Journal of Functional Foods*, 2023, 104: 105517.
- [23] XU X, XI N, CHEN J, et al. Deoxynivalenol exposure induces oxidative stress and apoptosis in human keratinocytes via PI3K/Akt and MAPK signaling pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2024, 39(1): 277-288.
- [24] 张百刚,李金亮,梁海荣,等.呕吐毒素对HK2细胞增殖及诱导凋亡蛋白表达的调节作用[J].*现代食品科技*,2022, 38(7):309-315.
- [25] JUAN-GARCÍA A, MANYES L, RUIZ M-J, et al. Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: A review [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 56: 40-59.
- [26] PRITI K, ARVINDHAN N, D U P. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018, 2018(6): 095497.
- [27] HUANG Z, ZHONG H, LI T, et al. Selenomethionine alleviates deoxynivalenol-induced oxidative injury in porcine intestinal epithelial cells independent of MAPK pathway regulation [J]. *Antioxidants*, 2024, 13(3): 356.
- [28] F C D, LAÍS F, F O P, et al. Evaluation of human spermatozoa mitochondrial membrane potential using the JC-1 Dye [J]. *Current Protocols*, 2022, 2(9): 531.
- [29] ZHENG Y, GRANT D, E C P, et al. VDAC2 and the BCL-2 family of proteins [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2021, 49(6): 2787-2795.
- [30] LUO X, O'NEILL K L, HUANG K. The third model of Bax/Bak activation: a Bcl-2 family feud finally resolved? [J]. *F1000 Research*, 2020, 9: 935.
- [31] NATALIA N, RADEK Š. Regulation of cell death by mitochondrial transport systems of calcium and Bcl-2 proteins [J]. *Membranes*, 2020, 10(10): 299.
- [32] 赖颖蓉,赵倩琳,姜丽红.基于Bcl-2/BAX/Caspase-3信号通路探究参红通络方对心肌缺血再灌注损伤大鼠细胞凋亡的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2024,30(11):104-110.
- [33] DANA S, DANIELA K C, SARKA D, et al. Cell-specific modulation of mitochondrial respiration and metabolism by the pro-apoptotic Bcl-2 family members Bax and Bak [J]. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 2023, 29(3-4): 424-438.
- [34] WANG X, XU W, FAN M, et al. Deoxynivalenol induces apoptosis in PC12 cells via the mitochondrial pathway [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 43: 193-202.
- [35] LI D, YE Y, LIN S, et al. Evaluation of deoxynivalenol-induced toxic effects on DF-1 cells *in vitro*: Cell-cycle arrest, oxidative stress, and apoptosis [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 37(1): 141-149.
- [36] WANG X, XU W, FAN M, et al. Deoxynivalenol induces apoptosis in PC12 cells via the mitochondrial pathway [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016, 43: 193-202.