

基于氧化应激和线粒体功能障碍的 伏马毒素 B1 诱导线虫神经毒性机制

叶永丽¹, 张晓娟¹, 唐莉莉², 王加生², 张银志¹, 孙秀兰^{*1}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 美国佐治亚大学 公共卫生学院, 佐治亚 雅典 30602)

摘要: 为研究线粒体功能和氧化应激在伏马毒素 B1 (fumonisin B1, FB1) 诱导神经毒性中的作用, 以秀丽隐杆线虫为模型, 对 FB1 处理后的线虫行为表型以及包括氧化应激和线粒体功能相关指标变化进行分析。结果表明, 20~200 $\mu\text{g/mL}$ 的 FB1 暴露 24 h 以剂量依赖方式诱导细胞色素氧化酶、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 相关基因 (*cyp35A2*, *sod-1*, *sod-3*, *ctl-2* 和 *ctl-3*) 的异常表达。此外, 100~200 $\mu\text{g/mL}$ 的 FB1 处理降低了线虫线粒体密度, 并显著降低了三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 水平和线粒体膜电位 ($P < 0.05$)。200 $\mu\text{g/mL}$ 的 FB1 处理显著抑制了线虫线粒体呼吸链复合物 I 和 V 的表达, 提高了线粒体分裂基因 *drp-1* 的表达水平。相关性分析显示, 氧化应激和线粒体功能相关指标的表达与线虫行为学表型具有显著相关性。综上, FB1 可能通过参与线虫氧化应激、线粒体呼吸链和线粒体动力学过程诱导神经毒性。

关键词: 伏马毒素 B1; 秀丽隐杆线虫; 氧化应激; 线粒体功能障碍; 神经毒性

中图分类号: TS 201.6 文章编号: 1673-1689(2024)03-0026-10 DOI: 10.12441/spyswjs.20221006001

Mechanism Investigation of Neurotoxicity of *Caenorhabditis elegans* Induced by Fumonaxin B1-Mediated Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction

YE Yongli¹, ZHANG Xiaojuan¹, TANG Lili², WANG Jiasheng², ZHANG Yinzhhi¹, SUN Xiulan^{*1}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. College of Public Health, University of Georgia, Athens 30602, USA)

Abstract: To study the role of mitochondrial function and oxidative stress in the neurotoxicity induced by fumonisin B1 (FB1), the model of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) was used. The behavioral phenotype of *C. elegans* treated by FB1, and the changes in indices related to oxidative stress and mitochondrial function were analyzed. The results showed that 20~200 $\mu\text{g/mL}$ FB1 exposure for 24 hours induced abnormal expression of genes (*cyp35A2*, *sod-1*, *sod-3*, *ctl-2*, and *ctl-3*) related to cytochrome oxidase, superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) in a dose-dependent manner. Moreover, 100~200 $\mu\text{g/mL}$ FB1 treatment reduced mitochondrial density of

收稿日期: 2022-10-06 修回日期: 2022-11-20

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32202189); 中国博士后科学基金项目(2021TQ0128)。

作者简介: 叶永丽(1990—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事食品安全与质量控制研究。E-mail: yyly0222@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 孙秀兰(1976—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全检测与主动防控研究。E-mail: sxlzzz@jiangnan.edu.cn

C. elegans and significantly decreased the levels of adenosine triphosphate (ATP) and the potential of mitochondrial membrane ($P<0.05$). The expression levels of mitochondrial respiratory chain complexes I and V were significantly inhibited by 200 $\mu\text{g/mL}$ FB1 treatment, while the expression level of mitochondrial fission gene *drp-1* was increased. Correlation analysis demonstrated a significant correlation between the expression of indices related to oxidative stress and mitochondrial function and the behavioral phenotype of *C. elegans*. In conclusion, FB1 may induce neurotoxicity by participating oxidative stress, mitochondrial respiratory chain, and mitochondrial dynamics in *C. elegans*.

Keywords: fumonisin B1, *Caenorhabditis elegans*, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, neurotoxicity

伏马毒素(fumonisin, FUM)是污染率最高的一类镰刀菌毒素,在粮食作物及其制品中污染严重。2021 年全球真菌毒素调查报告显示,FUM 在东南亚、东亚、美洲中部、中东和北非、南欧等地区粮食作物中的污染率达 70%以上,在中国粮食中的污染率达 81%,以玉米、谷类及其制品中的污染最为严重^[1]。在已知的 20 多种 FUM 中,FB1 污染最为广泛(占 60%以上),毒性最强^[2]。FB1 的热稳定性较高,常规热处理难以改变其理化性能^[3]。FB1 污染可影响饲料的营养价值和感官特性,导致动物采食量和生产性能下降,造成巨大的经济损失。目前粮食中 FB1 等真菌毒素污染的防控策略主要集中在储藏和加工过程的毒素物理脱除和生物、化学降解方面,大多数成果仍在实验室阶段^[4]。由于日常食源性真菌毒素暴露难以避免^[5],对其在体内毒性的预防和干预对公众健康非常重要。因此,研究 FB1 对生物体的神经毒性作用分子机制,明确其毒性作用靶点,对粮食产品中生物源性污染物的防控和终点暴露风险进行主动干预,对保障人体健康有重要意义。

研究发现,FB1、黄曲霉毒素、呕吐毒素等真菌毒素与大脑有较强的亲和力,其毒素原型或代谢物可穿过血脑屏障,通过转运体到达神经细胞,影响神经系统的正常功能^[6-8]。此外,由于真菌毒素诱导氧化应激、DNA 损伤和线粒体功能障碍等机制与衰老、神经退行性病变机制有相关性,慢性接触环境毒素会增加神经退行性疾病的风险^[9-11]。因此,对真菌毒素引起的神经损伤干预有望成为保障神经系统正常功能的关键。

以体外培养细胞模型为研究对象的 FB1 神经毒性评价与机制探究已有相关报道,FB1 可显著诱

导神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞氧化应激损伤,抑制胶质细胞及神经源性细胞活性^[12]。此外,FB1 暴露可抑制海马神经元轴突生长,上调大鼠原代胶质细胞的鞘氨醇水平和降低少突胶质细胞活性,并破坏髓鞘形成^[13]。有研究认为 FB1 的神经毒性与其抑制线粒体呼吸和钙稳态失调有关^[14],线粒体可能是其作用靶点。研究发现,FB1 通过抑制线粒体呼吸链复合物 I 来诱导大鼠星形胶质细胞和 SH-SY5Y 细胞线粒体,降低细胞呼吸速率并产生体内活性氧(ROS)^[14]。氧化应激和线粒体损伤是目前 FB1 神经毒性作用机制研究的主要方向。尽管体外细胞模型已明确 FB1 具有神经毒性,但在生物个体水平上对 FB1 暴露诱导神经毒性及其分子机制的研究尚不充分。

线虫是神经科学和衰老研究的典型模式生物,其中枢神经系统结构简单但组成完善,各类神经元在控制线虫运动行为中的作用已被深入解析,并已建立系统的线虫神经行为学指标评价体系^[15-17]。目前,线虫已被作为人体健康与生态毒性的双重模式动物,用于研究环境中重金属/农药残留、抗生素残留单一或联合暴露的毒害作用,并逐步建立起了相对完整的研究体系^[18]。作者所在团队前期以秀丽隐杆线虫(简称为线虫)为模式生物模型,对比分析了几种真菌毒素暴露下线虫的神经行为学变化。发现 FB1 暴露诱导了线虫行为缺陷并且升高 ROS 水平,影响了 GABA 能神经元和血清素能神经元的完整性,最终导致线虫神经系统损伤^[19]。基于这些研究结果,作者以线虫为生物模型,分析 FB1 暴露对线虫氧化应激和线粒体功能障碍的影响,进一步探讨 FB1 诱导线虫神经毒性的作用机制,以期膳食中 FB1 暴露诱导神经毒性的干预策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

线虫品系为野生型 N2 线虫, 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记体壁肌肉细胞中所有线粒体的转基因线虫 PD4251; 标记线粒体外膜蛋白 TOM7 的转基因线虫 DLM14; GFP 标记咽肌和体壁中复合物 I、II 和 III; 红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP) 标记咽肌和表皮中的复合物 IV 和 V 的转基因线虫 CB7272、*drp-1* 基因突变株 CU6372。线虫品系均来自美国明尼苏达州国际线虫遗传中心 (CGC), 且均以大肠杆菌 (*E. coli* OP50) 为食物。

FB1: 纯度 $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich 公司; BCA 蛋白质、ROS、ATP 和线粒体膜电位测定试剂盒: 上海碧云天生物技术有限公司; SOD、CAT 测定试剂盒: 南京建成生物工程技术有限公司; 琼脂、蛋白胨、酵母浸粉等培养基配制用试剂, 氢氧化钠、次氯酸钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、三氯甲烷、乙醇、异丙醇等试剂: 均为分析纯, 国药集团化学试剂公司; 实验用水均为超纯水。

1.2 设备与仪器

BDTEC 倒置生物显微镜: 重庆奥特光学仪器公司; C-PSN 体视显微镜: 日本 Nikon 公司; 超净工作台和 SHP-150 生化培养箱: 上海森信实验仪器公司; SpectraMAX M5 酶标仪: 美国 Molecular Devices 公司; VB-40 立式高温高压灭菌锅: 德国 SYSTEC 公司; Eppendorf 离心机: 德国艾本德公司。

1.3 实验方法

1.3.1 线虫培养和同步化 所有品系的线虫培养温度均为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 具体操作参照文献[19]。

1.3.2 FB1 暴露处理 同步化 L1 期线虫转移至含有 OP50 的线虫生长培养基 (nematode growth medium, NGM) 平板上培养得到 L3 期线虫。适量的 M9 缓冲溶液冲洗 L3 期线虫, 自然静置沉淀收集虫体, 分别转移至含有不同质量浓度 FB1 (0、20、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 和 OP50 (5 mg/mL) 的 96 孔板中, 暴露 24 h 后测定各项指标。每组实验 3 个平行, 独立重复 3 次试验。

1.3.3 ROS 水平和抗氧化酶活性测定 参考 ROS 试剂盒的操作说明书, 将 FB1 暴露结束后收集的 *drp-1* 突变株 CU6372 线虫用 M9 缓冲液清洗 3 次,

转移至 100 μL 含 100 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 探针的 PBS 缓冲液 (0.1 mol/L , pH 7.4) 的 96 孔板 (每孔约 100 条线虫)。避光孵育 30 min 后, 用酶标仪测定荧光强度 (激发波长为 485 nm、发射波长为 530 nm)。暴露结束后的线虫用 M9 缓冲液洗涤 3 次, 用玻璃研磨器研磨匀浆, 12 000 g 离心 4 min, 收集上清液为样品。根据试剂盒操作说明, 分别测定样品中 SOD 和 CAT 的活性, 对测得的对应蛋白质质量浓度进行归一化。

1.3.4 荧光标记线粒体的观察 采用转基因线虫 PD4251 中 GFP 标记的荧光物质来分析 FB1 暴露时线虫线粒体表达变化。处理结束后的线虫用 M9 缓冲液清洗 3 次, 用体积分数 2.5% 戊二醛溶液将线虫固定在铺有 4 g/dL 琼脂糖凝胶的载玻片上, 然后使用倒置荧光显微镜 (FITC 通道) 拍照, 物镜倍数为 20 倍。使用 Image J 软件分析图像, 并计算平均荧光强度。每组 3 个平行, 每个平行至少拍摄 10 条线虫。

1.3.5 ATP 和线粒体膜电位的测定 ATP 和线粒体膜电位测定参照试剂盒说明进行。暴露结束后收集各组线虫, M9 缓冲液清洗 3 次, 按试剂盒说明加入裂解液, 用玻璃研磨器破碎线虫, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 5 min, 收集上清液作为样品。每份样品平均分成 3 部分, 分别用于样品中的总蛋白质质量浓度、ATP 水平、线粒体膜电位测定。其中, 使用 JC-1 探针的红绿荧光相对比例来表示线粒体膜电位, 数值越低说明线粒体去极化程度越高, 即膜电位较低。

1.3.6 线粒体相关内膜和外膜蛋白的测定 DLM14 和 CB7272 转基因线虫参照 1.3.2 的步骤进行 FB1 暴露处理。在转基因线虫 DLM14 中, GFP 与 *eft-3p::CERULEAN-VENUS::tomm-7* 共同表达, 其荧光强度可以用来表征线粒体外膜蛋白 TOM7 的表达。在转基因线虫 CB7272 中, GFP 在咽肌和体壁中与复合物 I、II 和 III 一起表达, 咽肌和表皮中的复合物 IV 和 V 被 RFP 共同标记。因此, CB7272 线虫中 GFP 和 RFP 的同时测定可以用来表征线粒体呼吸链复合物 I~V 的变化。DLM14 和 CB7272 转基因线虫荧光强度检测方法参照 1.3.4。

1.3.7 线虫氧化应激和线粒体相关基因表达的测定 不同暴露组的线虫用玻璃研磨器破碎后, 依次加入 Trizol 试剂、三氯甲烷、异丙醇、体积分数 75% 的乙醇溶液和 DEPC 水 (无菌无酶水) 提取 RNA。然后根据 Prime Script TM RT 逆转录试剂盒和 TB

Green® Premix Ex Taq™ 的试剂盒的说明制备反应体系,检测并计算氧化应激和线粒体相关基因的表达水平。内参基因(*act-1*)、氧化应激和线粒体相关基因的引物序列参考文献[20]。

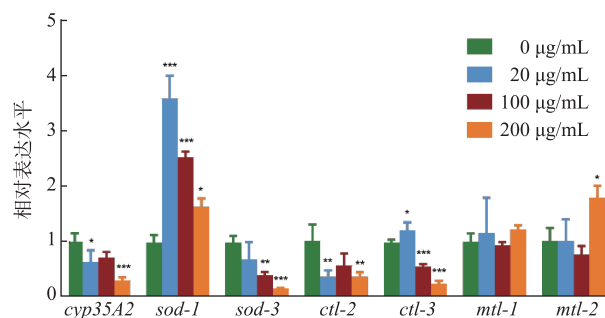
1.3.8 数据处理与分析 采用 SPSS 18.0 软件进行 Spearman 相关性检验分析,分析各实验参数之间的相关性。所有数据均用平均值±标准差(Mean±SD)表示。采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析和绘图,利用 *t* 检验分析和单因素方差分析进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 FB1 对线虫氧化应激相关基因表达的影响

氧化应激与线粒体功能密切相关,FB1 暴露可引起线虫体内 ROS 水平升高^[9],因此作者在基因水平上探讨 FB1 暴露对线虫氧化应激相关基因(*cyp35A2*、*sod-1*、*sod-3*、*ctl-2*、*ctl-3*、*mtl-1* 和 *mtl-2*)表达水平的影响。所有基因的表达量均以内参基因 *act-1* 为标准,结果见图 1。与空白对照组相比,线虫 *cyp35A2*、*sod-3*、*ctl-2* 和 *ctl-3* 基因表达水平随 FB1 质量浓度的增加呈下降趋势。其中,*sod-3* 的剂量效应最为显著,而 *ctl-3* 基因表达量呈先上升后降低的趋势。此外,20 μg/mL 的 FB1 使线虫 *sod-1* 基因表达显著升高($P<0.001$),且随剂量升高显著下降。100 μg/mL FB1 暴露组的 *sod-1* 基因表达水平仍较对照组中的水平高($P<0.05$),*mtl-2* 基因仅在高剂量组(100 μg/mL)表达水平有统计学意义($P<0.05$)。在考察 FB1 剂量范围内,FB1 暴露对 *mtl-1* 基因表达水平无明显影响,见图 1。

FB1 暴露对线虫不同胁迫基因的表达存在差异。*cyp-35A2* 是细胞色素 P450 家族基因中一种重要的基因,参与调控线虫氧化应激平衡,也是脂肪储存信号通路的主要基因^[21]。N2 线虫喂食十八烯酸甘油三酸酯后,基因 *cyp-35A2*、*cyp-35A4* 和 *cyp-35A5* 的表达量显著下降^[22]。FB1 诱导线虫体内 *cyp-35A2* 基因下调,表明 FB1 暴露可能会通过干扰线虫体内的脂肪存储诱导氧化应激损伤。此外,*sod-1*、*sod-3*、*ctl-2* 和 *ctl-3* 等 4 个基因是 SOD 和 CAT 合成代谢过程中的重要基因,可调控线虫体内的氧化应激水平^[23]。FB1 暴露导致 *sod-3*、*ctl-2* 和 *ctl-3* 基因表达水平降低,在分子水平上验证了 FB1 会抑制 SOD 和 CAT 酶的活性^[21]。



$P<0.05$ 时表示具有统计学意义,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$ 。

图 1 FB1 暴露对线虫抗氧化基因表达的影响

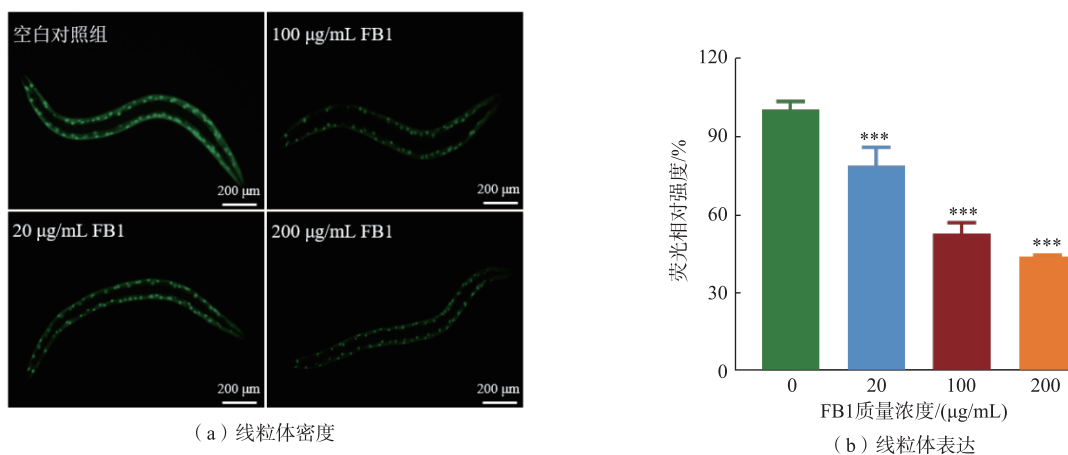
Fig. 1 Effects of FB1 exposure on the expression of genes associated with oxidative stress in *C. elegans*

2.2 FB1 对线虫线粒体表达的影响

FB1 暴露可诱导线虫线粒体表达水平显著降低。在 PD4251 转基因线虫中,体壁和外阴肌肉中 *myo-3p::mitochondrial GFP* 表达的荧光标记物的变化反映了 FB1 暴露对线虫体内线粒体表达的影响。如图 2 所示,随着 FB1 暴露质量浓度的增加,PD4251 线虫体内线粒体的密度和荧光强度逐渐下降。对荧光强度进行统计发现,与对照组相比,质量浓度为 20~200 μg/mL 的暴露组中线虫体内的线粒体荧光强度均显著下降,平均减少 21.30%~56.01% ($P<0.001$)。

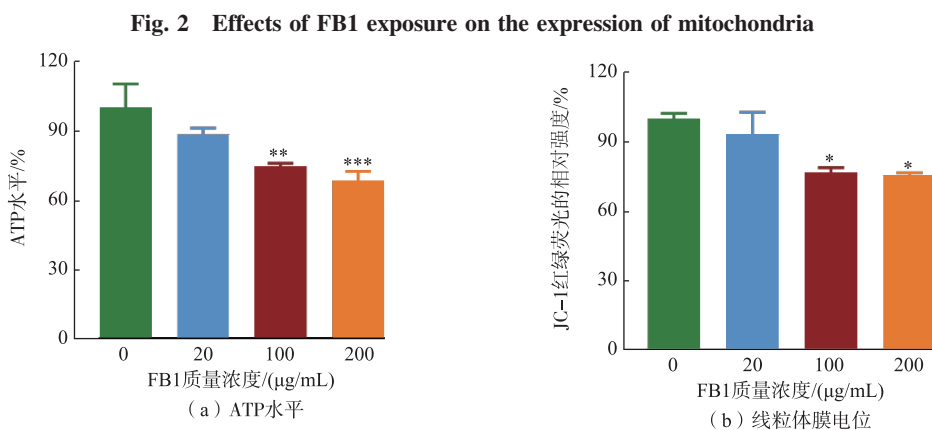
2.3 FB1 暴露对线虫线粒体 ATP 和膜电位的影响

神经毒性的发生常伴随着线粒体 ATP 水平和膜电位的下降。100 μg/mL 和 200 μg/mL FB1 暴露均导致了线虫体内 ATP 水平下降,较对照组分别下降 25.38%和 31.52% ($P<0.01$),见图 3(a)。此外,线粒体膜电位是合成 ATP 的主要动力,其水平的变化也被用来评估机体的氧化应激水平。与对照组相比,100 μg/mL 和 200 μg/mL 的 FB1 暴露均诱导线虫体内线粒体膜电位水平的显著降低,较对照组分别下降 23.22%和 24.47% ($P<0.05$),见图 3(b)。低剂量的 FB1 (20 μg/mL)对线虫线粒体 ATP 水平和膜电位变化无显著影响。线粒体是神经元的供能细胞器,线粒体结构和功能的异常改变可影响 ATP 的合成,说明较高剂量的 FB1 暴露可引起线虫线粒体正常功能紊乱。此外,线粒体功能障碍是神经毒性作用的关键介质^[24]。FB1 暴露对线粒体表达、ATP 水平和膜电位的影响表明,线粒体功能障碍可能是 FB1 诱导神经毒性的重要原因。



$P < 0.05$ 时表示具有统计学意义, *** 表示 $P < 0.001$ 。

图 2 FB1 暴露对线虫线粒体表达的影响



$P < 0.05$ 时表示具有统计学意义, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$ 。

图 3 FB1 暴露对线虫 ATP 水平和线粒体膜电位的影响

Fig. 3 Effects of FB1 exposure on the level of ATP and mitochondrial membrane potential in *C. elegans*

2.4 FB1 对线虫线粒体外膜蛋白的影响

作为外膜转位酶 TOM 复合体的关键因子, TOM-7 对 TOM 的合成及稳定性具有重要作用^[25]。在 DLM14 转基因线虫中,标记 TOM-7 的绿色荧光蛋白的强度反映了线粒体重要的外膜蛋白 TOM-7

的表达情况。与对照组相比,20~200 µg/mL FB1 暴露的线虫体内荧光斑点和对应的荧光强度均没有明显变化,说明 FB1 暴露对线虫线粒体关键外膜蛋白 TOM-7 的影响不显著,见图 4。

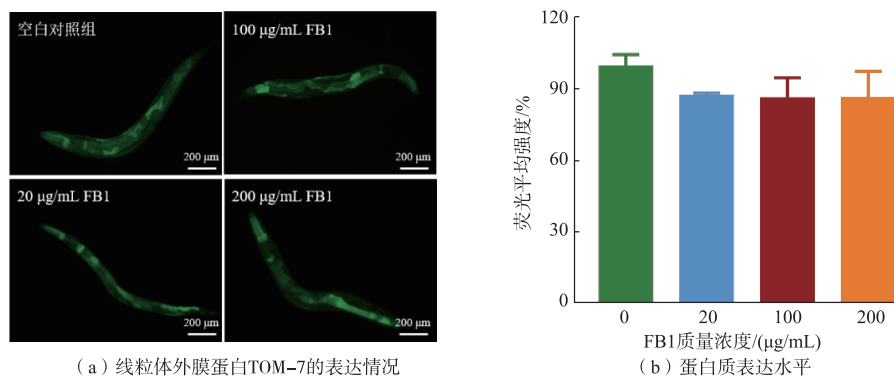


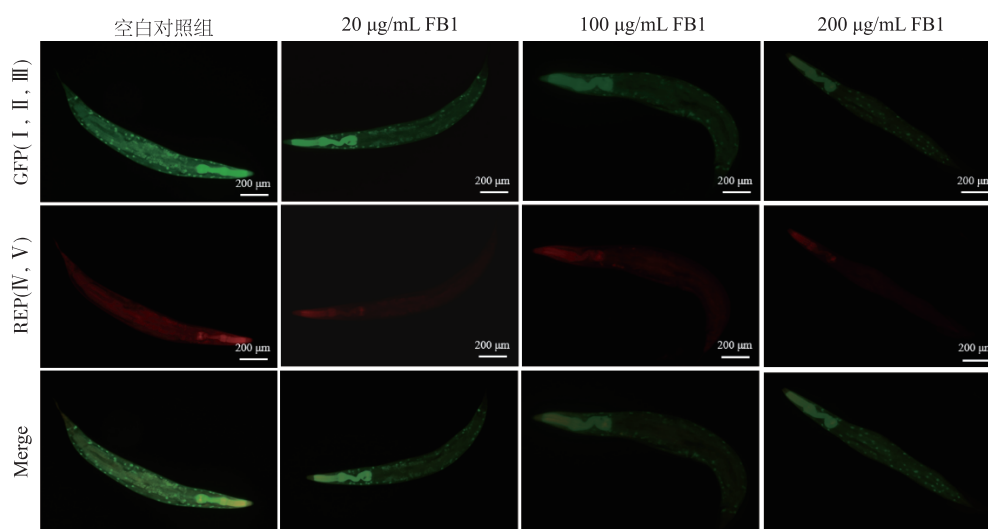
图 4 FB1 暴露对 DLM14 转基因线虫线粒体外膜蛋白的影响

Fig. 4 Effects of FB1 exposure on mitochondrial outer member proteins in DLM14 strains

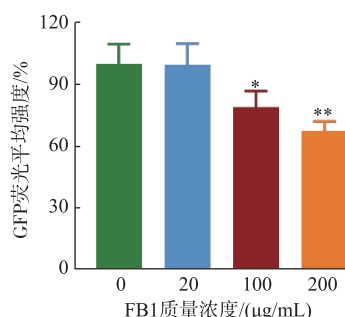
2.5 FB1 对线虫线粒体内膜蛋白的影响

呼吸链复合物 I、II、III、IV 和 V 是线粒体重要的内膜蛋白,在线粒体的氧化还原反应和电子传递过程中发挥关键作用^[26]。在 CB7272 转基因线虫中, GFP 在咽肌和体壁中与复合物 I、II 和 III 共同表达, RFP 在咽肌和表皮中与复合物 IV 和 V 共同表达。如图 5(a)所示,与对照组相比,随着 FB1 暴露质量浓度的增加,线虫体内的 GFP 和 RFP 的表达量

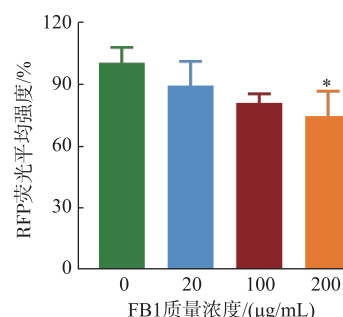
均逐渐减少。荧光强度的量化分析结果显示,100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组线虫的绿色荧光强度分别下降了 21.00% ($P<0.05$) 和 32.57% ($P<0.01$), 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 FB1 暴露后红色荧光强度下降了 25.77% ($P<0.05$),表明高质量浓度的 FB1 暴露降低了线虫线粒体复合物 I、II、III、IV 和 V 的表达,见图 5(b)和图 5(c)。



(a) 线粒体内膜蛋白表达情况



(b) 复合物 I、II、III 达水平



(c) 复合物 IV、V 表达水平

$P<0.05$ 时表示具有统计学意义, * 表示 $P<0.05$ 、** 表示 $P<0.01$ 。

图 5 FB1 暴露对线虫线粒体内膜蛋白的影响

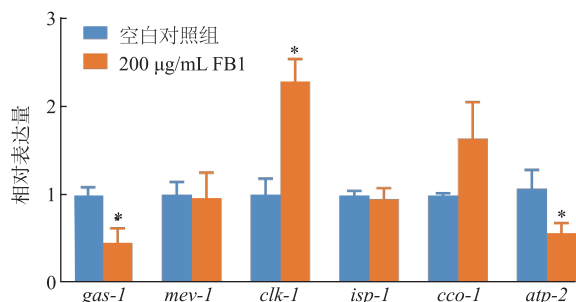
Fig. 5 Effects of FB1 exposure on mitochondrial member proteins

2.6 FB1 暴露对线虫线粒体内膜复合物相关基因表达的影响

进一步分析了 FB1 处理对 N2 线虫线粒体内膜复合物相关基因 *gas-1*、*mev-1*、*clk-1*、*isp-1*、*cco-1* 和 *atp-2* 表达水平的影响。200 $\mu\text{g/mL}$ FB1 暴露显著降低线虫体内 *gas-1* 和 *atp-2* 基因的表达水平 ($P<0.05$), 提高了 *clk-1* 基因的转录水平 ($P<0.05$) 见图 6。*gas-1* 基因主要参与复合物 I 与辅酶 Q 的结合过程^[27], 而 *clk-1* 基因为泛醌合成所必需, 主要

参与从复合物 I 或 II 到复合物 III 的电子转移过程^[28]。*atp-2* 基因编码线虫线粒体复合物 V 的 β 亚基或活性位点^[29]。研究表明, *gas-1* 突变可显著降低复合物 I 依赖性代谢^[30], 而 *atp-2* (ua2) 突变体则出现发育停滞和神经肌肉缺陷等症状, 具体表现为运动行为损伤、咽泵频率和排便减少^[29]。Domijan 等发现 FB1 暴露会抑制星形胶质细胞和人神经母细胞瘤细胞中线粒体复合物 I 的活性, 促进 ROS 的产生, 降低线粒体呼吸速率^[24]。结合 CB7272 线虫中 GFP 和 RFP

荧光强度以及 N2 线虫 ATP 和线粒体膜电位水平等指标的显著降低,推测 FB1 可通过抑制线粒体复合物 I 和 V 的表达来破坏呼吸链电子传递,干扰线粒体氧化磷酸化过程,从而诱导神经毒性作用。



$P < 0.05$ 时表示具有统计学意义, * 表示 $P < 0.05$ 。

图 6 FB1 暴露对线虫线粒体内膜复合物相关基因表达的影响

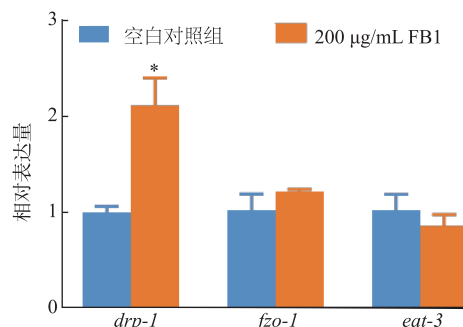
Fig. 6 Effects of FB1 exposure on the expression of genes associated with mitochondrial inner membrane protein complexes in N2 *C. elegans*

2.7 FB1 对线虫线粒体分裂融合相关基因表达的影响

为分析 FB1 暴露对线虫线粒体分裂融合稳态的影响,对 N2 线虫的线粒体裂变和融合相关基因 (*drp-1* *fzo-1* 和 *eat-3*) 表达情况进行测定。如图 7 所示,200 μg/mL 的 FB1 暴露显著提高 *drp-1* 基因的表达量,但 *fzo-1* 和 *eat-3* 基因的表达量无明显变化。*drp-1* 为线粒体分裂所必需,而 *fzo-1* 和 *eat-3* 分别参与线粒体外膜和内膜的融合^[31]。神经毒素诱导的线粒体过度裂变可导致氧化磷酸化失衡、氧化应激和细胞凋亡^[32]。玉米赤霉烯酮毒素和百草枯诱导的神经毒性被证实是由 *drp-1* 上调和线粒体裂变引起的^[33-34]。因此,FB1 诱导的神经毒性可能与线虫线粒体分裂融合稳态扰乱、线粒体裂变加剧密切相关^[35-36]。

2.8 FB1 暴露对 *drp-1* 基因突变线虫的运动行为和氧化应激影响

为了进一步验证 FB1 暴露诱导的线虫神经行为学毒性与线粒体裂变之间的关系,采用 *drp-1* 突变株 CU6372 分析 FB1 暴露对线虫运动行为和氧化应激指标的影响。如图 8 所示,与对照组相比,200 μg/mL 的 FB1 暴露对 *drp-1* 突变株的身体弯曲频率、头部摆动频率、ROS 水平、SOD 活性和 CAT 活性均无明显影响。前期研究结果显示,FB1 暴露以



$P < 0.05$ 时表示具有统计学意义, * 表示 $P < 0.05$ 。

图 7 FB1 暴露对 N2 线虫线粒体动力学相关基因表达影响
Fig. 7 Effects of FB1 exposure on the expression of genes associated with mitochondrial dynamics in N2 *C. elegans*

剂量时间依赖方式显著降低 N2 线虫的身体弯曲和头部摆动频率、SOD 和 CAT 活性,并升高 ROS 水平。说明 FB1 暴露对 *drp-1* 突变株无明显毒性作用,进一步验证了 *drp-1* 基因可能在 FB1 诱导的线虫神经毒性中发挥重要作用。

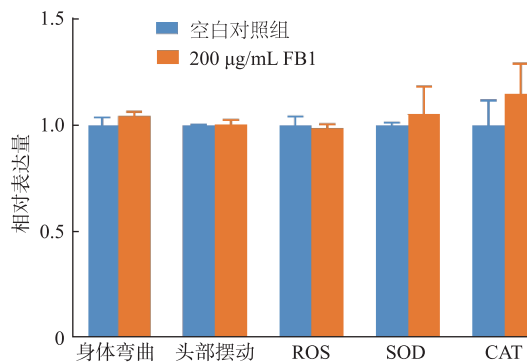


图 8 FB1 暴露对 *drp-1* 基因突变株的运动行为和生化指标的影响

Fig. 8 Effects of FB1 exposure on motor behavior and biochemical indicators of *drp-1* mutants

2.9 FB1 诱导的线虫线粒体功能障碍与神经毒性效应相关性分析

为了进一步确定线粒体功能障碍与氧化应激在 FB1 诱导线虫神经毒性中的作用,采用 Spearman 相关系数分析 FB1 诱导的线虫线粒体氧化损伤相关的 25 个指标与前期获得的线虫神经行为学表型相关的 6 个指标(包括身体弯曲、头部摆动、爬行距离、爬行速度、觅食能力、化学趋向性)之间的相关性,结果见表 1。ROS 水平、SOD 和 CAT 活性与线虫头部摆动频率、爬行速率、觅食能力和化学趋向性的行为学指标存在显著相关性 ($P < 0.05$),而

cyp35A2、*sod-3* 和 *ctl-3* 基因的表达水平则与化学趋向性外的其余指标显著相关($P<0.05$),进一步表明 FB1 诱导的线虫神经行为毒性可能与线虫线粒体功能障碍和氧化应激密切相关。此外,ATP 水平、线粒体膜电位和 *gas-1*、*atp-2*、*clk-1*、*drp-1* 基因表

达水平以及 PD4251 线虫 GFP 荧光强度、CB7272 线虫 GFP 和 RFP 荧光强度也与 5 个线虫行为学指标呈较强的相关性($P<0.05$),表明线粒体呼吸链损伤和线粒体裂变在 FB1 诱导的神经毒性机制中发挥着关键作用。

表 1 FB1 暴露 24 h 时线虫各评价指标的Spearman 相关性分析

Table 1 Spearman's correlations between measured parameters in *C. elegans* after FB1 exposure for 24 h

检测指标	身体弯曲	头部摆动	爬行距离	爬行速度	觅食能力	化学趋向性
ROS	-0.543	-0.783**	-0.776**	-0.636*	-0.657*	0.420
SOD	0.851**	0.676*	0.855**	0.781**	0.830**	-0.427
CAT	0.729**	0.867**	0.867**	0.783**	0.818**	-0.503
<i>cyp35A2</i>	0.942**	0.790**	0.762**	0.811**	0.881**	-0.573
<i>sod-1</i>	-0.277	-0.203	-0.161	-0.259	-0.252	-0.168
<i>sod-3</i>	0.907**	0.769**	0.790**	0.888**	0.916**	-0.573
<i>ctl-2</i>	0.802**	0.524	0.448	0.664*	0.720**	-0.510
<i>ctl-3</i>	0.630*	0.629*	0.720**	0.706*	0.720**	-0.608*
<i>mtl-1</i>	-0.434	-0.343	-0.196	-0.357	-0.245	0.434
<i>mtl-2</i>	-0.532	-0.210	-0.448	-0.406	-0.538	0.308
PD4251	0.900**	0.881**	0.811**	0.986**	0.930**	-0.657*
ATP	0.900**	0.937**	0.790**	0.916**	0.846**	-0.566
线粒体膜电位	0.662*	0.657*	0.552	0.720**	0.783**	-0.378
DLM14	0.438	0.315	0.503	0.608*	0.622*	-0.280
CB7272-GFP	0.687*	0.804**	0.846**	0.762**	0.727**	-0.671*
CB7272-RFP	0.620*	0.874**	0.678*	0.664*	0.601*	-0.650*
<i>gas-1</i>	0.679*	0.817**	0.610*	0.753**	0.703*	-0.480
<i>mev-1</i>	0.241	0.481	0.254	0.042	0.042	-0.099
<i>clk-1</i>	-0.559	-0.707*	-0.806**	-0.664*	-0.664*	0.410
<i>isp-1</i>	0.106	0.311	0.481	-0.014	0.057	0.057
<i>cco-1</i>	-0.771	-0.829*	-0.829*	-0.543	-0.657	0.771
<i>atp-2</i>	0.573	0.820**	0.707*	0.664*	0.594*	-0.254
<i>drp-1</i>	-0.581*	-0.707*	-0.735**	-0.749**	-0.693*	0.551
<i>fzo-1</i>	-0.262	-0.113	-0.339	-0.198	-0.368	0.410
<i>eat-3</i>	0.205	0.141	0.028	0.523	0.368	-0.170

注: $P<0.05$ 时表示具有统计学意义,* 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$ 。

3 结 语

以线虫为体内评价模型,从氧化应激、线粒体功能角度探讨了 FB1 暴露诱导线虫神经毒性作用机制。20~200 $\mu\text{g/mL}$ 的 FB1 处理影响了线虫氧化应激相关基因 (*cyp35A2*、*sod-1*、*sod-3*、*ctl-2*、*ctl-3* 和 *mtl-2*) 的正常表达,导致氧化应激响应。高剂量 FB1 暴露显著降低了 ATP 和线粒体膜电位水平、抑

制了线粒体复合物 I 和 V 的表达。此外,200 $\mu\text{g/mL}$ 的 FB1 暴露显著提高了 N2 线虫体内 *drp-1* 基因的表达水平,CU6372 突变株验证 FB1 暴露并未改变 *drp-1* 基因缺陷线虫的行为学。结合对 FB1 暴露诱导线虫氧化应激、线粒体呼吸链和动力学等相关指标的检测以及各指标之间相关性分析,推测 FB1 诱导的神经毒性可能与氧化应激损伤、线粒体功能障碍包括线粒体呼吸链损伤和线粒体分裂相关。

参考文献:

- [1] Biomin. Mycotoxin survey Q3 2021 results [R/OL]. (2021-10-18)[2022-08-08]. <https://www.biomin.net/solutions/mycotoxin-survey>.
- [2] RODRÍGUEZ-CARRASCO Y, FATTORE M, ALBRIZIO S, et al. Occurrence of Fusarium mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population[J]. **Food Chemistry**, 2015, 178: 149-155.
- [3] DUPUY J, LE BARS P, BOUDRA H, et al. Thermostability of fumonisin B(1), a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1993, 59(9): 2864-2867.
- [4] 纪剑, 于坚, 王良哲, 等. 真菌毒素的降解技术研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(5): 1-10.
JI J, YU J, WANG L Z, et al. Research progress in mycotoxin degradation technology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2022, 41(5): 1-10. (in Chinese)
- [5] 牛灿杰, 叶素丹, 胡玉霞, 等. 谷物及制品中真菌毒素前处理及检测技术研究进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(5): 203-210.
NIU C, YE S, HU Y, et al. Research progress in detection technologies of mycotoxins in cereals and cereal-based products[J]. **Food & Machinery**, 2023, 39(05): 203-210. (in Chinese)
- [6] ELMAZOU DY R H, ATTIA A A. Endocrine-disrupting and cytotoxic potential of anticholinesterase insecticide, diazinon in reproductive toxicity of male mice[J]. **Journal of Hazardous Materials**, 2012, 209/210: 111-120.
- [7] PEI X Y, ZHANG W J, JIANG H Y, et al. Food-origin mycotoxin-induced neurotoxicity: intend to break the rules of neuroglia cells[J]. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2021, 2021: 9967334.
- [8] WEIDNER M, LENCZYK M, SCHWERDT G, et al. Neurotoxic potential and cellular uptake of T-2 toxin in human astrocytes in primary culture[J]. **Chemical Research in Toxicology**, 2013, 26(3): 347-355.
- [9] SANTIS B, BRERA C, MEZZELANI A, et al. Role of mycotoxins in the pathobiology of autism: a first evidence[J]. **Nutritional Neuroscience**, 2019, 22(2): 132-144.
- [10] ZHANG J J, YOU L, WU W D, et al. The neurotoxicity of trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON): current status and future perspectives[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2020, 145: 111676.
- [11] RATNASEELAN A M, TSILIONI I, THEOHARIDES T C. Effects of mycotoxins on neuropsychiatric symptoms and immune processes[J]. **Clinical Therapeutics**, 2018, 40(6): 903-917.
- [12] KARA M, OZTAS E. *In-vitro* evaluation of aflatoxin-B1 and fumonisin-B1 cellular stress effects on SH-SY5Y cell line[J]. **Medicine Science**, 2020, 9(2): 492-495.
- [13] OSUCHOWSKI M F, SHARMA R P. Fumonisin B1 induces necrotic cell death in BV-2 cells and murine cultured astrocytes and is antiproliferative in BV-2 cells while N2A cells and primary cortical neurons are resistant[J]. **Neuro Toxicology**, 2005, 26(6): 981-992.
- [14] DOMIJAN A M, ABRAMOV A Y. Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis—implication to mechanism of cell toxicity[J]. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2011, 43(6): 897-904.
- [15] 魏焱, 曾敏, 李珂, 等. 以秀丽隐杆线虫为模式生物的蓝莓果酒抗氧化及抗衰老研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(5): 16-19.
WEI T, ZENG M, LI K, et al. Study on antioxidant and anti-aging analysis of blueberry wine in *C.elegans* [J]. **Food & Machinery**, 2016, 32(5): 16-19. (in Chinese)
- [16] 彭颖. 辣木籽水提物对酒精诱导线虫运动功能障碍的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(10): 149-152.
PENG Y. *Morigna oleifera* seed water extract protects alcohol-induced movement disorder in *Caenorhabditis elegans* [J]. **Food & Machinery**, 2020, 36(10): 149-152. (in Chinese)
- [17] SEDENSKY M M, MORGAN P G. Handbook of developmental neurotoxicology[M]. Amsterdam: Elsevier, 2018.
- [18] TANG B W, TONG P, XUE K S, et al. High-throughput assessment of toxic effects of metal mixtures of cadmium (Cd), lead (Pb), and manganese (Mn) in nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. **Chemosphere**, 2019, 234: 232-241.
- [19] ZHANG X J, YE Y L, SUN J D, et al. Abnormal neurotransmission of GABA and serotonin in *Caenorhabditis elegans* induced by Fumonisin B1 [J]. **Environmental Pollution**, 2022, 304: 119141.
- [20] ZHANG X J, YE Y L, SUN J D, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharide extract relieves FB1-induced neurotoxicity by reducing oxidative stress and mitochondrial damage in *Caenorhabditis elegans* [J]. **Food Bioscience**, 2022, 49: 101939.
- [21] CAO X, WANG X L, CHEN H B, et al. Neurotoxicity of nonylphenol exposure on *Caenorhabditis elegans* induced by reactive oxidative species and disturbance synthesis of serotonin [J]. **Environmental Pollution**, 2019, 244: 947-957.

- [22] AARNIO V,LEHTONEN M,STORVIK M,et al. *Caenorhabditis elegans* mutants predict regulation of fatty acids and endocannabinoids by the CYP-35A gene family[J]. **Frontiers in Pharmacology**,2011,2:12-21.
- [23] ZHOU D,YANG J,LI H,et al. The chronic toxicity of bisphenol A to *Caenorhabditis elegans* after long-term exposure at environmentally relevant concentrations[J]. **Chemosphere**,2016,154:546-551.
- [24] LIN C H,NICOL C J B,WAN C,et al. Exposure to PM_{2.5} induces neurotoxicity,mitochondrial dysfunction,oxidative stress and inflammation in human SH-SY5Y neuronal cells[J]. **Neurotoxicology**,2022,88:25-35.
- [25] WU S Y,LEI L L,SONG Y,et al. Mutation of hop-1 and pink-1 attenuates vulnerability of neurotoxicity in *C. elegans*: the role of mitochondria-associated membrane proteins in Parkinsonism[J]. **Experimental Neurology**,2018,309:67-78.
- [26] WANG H W,ZHU S Q,LIU J,et al. Fluoride-induced renal dysfunction via respiratory chain complex abnormal expression and fusion elevation in mice[J]. **Chemosphere**,2020,238:124607.
- [27] VBLIEK A M,SEDESKY M M,MORGAN P G. Cell biology of the mitochondrion[J]. **Genetics**,2017,207(3):843-871.
- [28] MIYADERA H,AMINO H,HIRAIISHI A,et al. Altered quinone biosynthesis in the long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans*[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2001,276(11):7713-7716.
- [29] TSANG W Y,LEMIRE B D. Mitochondrial ATP synthase controls larval development cell nonautonomously in *Caenorhabditis elegans* [J]. **Developmental Dynamics:an Official Publication of the American Association of Anatomists**,2003,226(4):719-726.
- [30] DANCY B M,SEDESKY M M,MORGAN P G. Effects of the mitochondrial respiratory chain on longevity in *C. elegans* [J]. **Experimental Gerontology**,2014,56:245-255.
- [31] KIM H,PERENTIS R J,CALDWELL G A,et al. Gene-by-environment interactions that disrupt mitochondrial homeostasis cause neurodegeneration in *C. elegans* Parkinson's models[J]. **Cell Death & Disease**,2018,9(5):555-567.
- [32] SPRENGER H G,LANGER T. The good and the bad of mitochondrial breakups[J]. **Trends in Cell Biology**,2019,29(11):888-900.
- [33] WEI C C,YANG N C,HUANG C W. Zearalenone induces dopaminergic neurodegeneration via DRP-1-involved mitochondrial fragmentation and apoptosis in a *Caenorhabditis elegans* Parkinson's disease model [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2021,69(40):12030-12038.
- [34] CHEN N Z,GUO Z K,LUO Z S,et al. Drp1-mediated mitochondrial fission contributes to mitophagy in paraquat-induced neuronal cell damage[J]. **Environmental Pollution**,2021,272:116413.
- [35] 陈伟哲,杜李宇,陈俊杰,等. 醋醅源潜在益生菌的筛选及其对秀丽隐杆线虫寿命延长作用[J]. 现代食品科技,2023,39(3):102-111.
CHENG W Z,DU L Y,CHEN J J,et al. Screening of potential probiotics derived from cupei and their effect on prolonging the lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. **Modern Food Science and Technology**,2023,39(3):102-111.(in Chinese)
- [36] 王猛,关思宇,于杰,等. 褐藻多糖的体外抗氧化活性及其延长秀丽隐杆线虫的寿命[J]. 现代食品科技,2022,38(4):1-8.
WANG M, GUAN S Y, YU J, et al. *In vitro* antioxidant activity of fucoidan-containing sulfated polysaccharide and its prolongation of the lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. **Modern Food Science and Technology**,2022,38(4):1-8.(in Chinese)