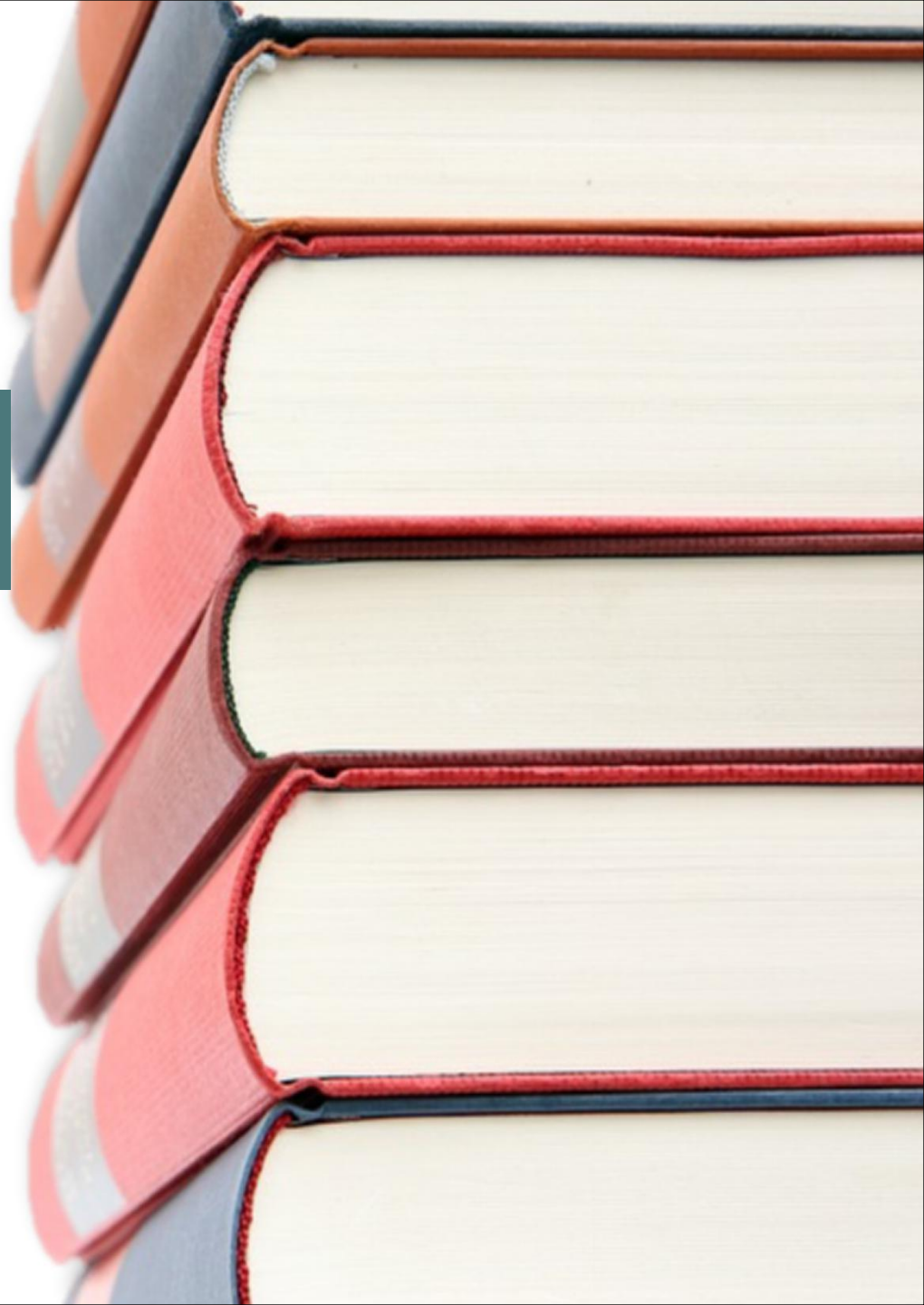


读书报告

- 报告人：胡俊仪
- 时间：2019年1月6日





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi



Full length article

Regulation mechanism of oxidative stress induced by high glucose through PI3K/Akt/Nrf2 pathway in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

Wenjing Pan^a, Linghong Miao^b, Yan Lin^b, Xin Huang^a, Xianping Ge^{a, b, *},
Silli Laban Moosa^a, Bo Liu^{a, b}, Mingchun Ren^b, Qunlan Zhou^b, Hualiang Liang^a,
Wuxiao Zhang^a, Liangkun Pan^b

^a Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, 9 Shanshui East Road, Wuxi, Jiangsu 214081, PR China

^b Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center (FFRC), Chinese Academy of Fishery Sciences (CAFS), 9 Shanshui East Road, Wuxi, Jiangsu 214081, PR China



高糖诱导团头鲂的氧化应激通过PI3K/Akt/Nrf2通路中的调控机制

目 录

CONTENTS

01 前言背景

02 研究方法

03 结果与讨论



01

• PART ONE •

前言背景

• PART ONE 背景

在商品饲料配方中，糖类作为成本最低的能源被广泛运用。饲料中添加糖可以减少蛋白质的消耗，减少氨氮对水污染的负荷。饲料中适当水平的糖对蛋白质或脂类的利用起着至关重要的作用。然而，鱼饲料中高水平的糖会导致鱼类氧化应激，抑制生理活动，降低肝脏抗氧化能力，引起免疫损伤。

• PART ONE 背景

目的与意义:

团头鲂，因其具有极高的经济效益、优良的肉质、快速的生长性能和较高的幼苗存活率，是我国主要的淡水养殖鱼种。以往的研究主要集中在不同浓度CHO喂养下鱼的生长性能(增重)、抗病性、饲料利用率、消化酶和身体组成等方面。还没有关于高糖摄入对团头鲂氧化应激和免疫功能损害的分子机制的研究。因此，本研究旨在探讨口服高浓度葡萄糖对团头鲂呼吸暴发、抗氧化状态和肝血红素氧合酶-1 (ho1)和PI3K/Akt/ nrf2相关信号分子基因表达的影响，为高糖诱导的肝脏损伤和氧化应激提供理论依据。

• PART ONE 背景

呼吸爆发又称为氧爆发，是指活性氧(ROS)的快速释放，如超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基(OH)，来自免疫细胞如中性粒细胞和单核细胞;它在免疫系统中起着重要的作用。在营养物质包括糖代谢过程中，会产生大量ROS。

天然免疫中，病原微生物被吞噬后，免疫细胞的一种氧依赖的杀伤机制。

NADPH氧化酶： $NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP + 2O_2^- + H^+$

$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow OCl^- + H_2O$ 生成 $^{\cdot}O_2 + Cl^- + H_2O \rightarrow H_2O_2 + ^{\cdot}O_2$

其中的 Cl^- 和 OCl^- 都具有毒性，可以杀伤吞噬入细胞的病原体。

杀伤以后，要把过氧化物还原，需要过氧化物酶体。

在超氧化物歧化酶的作用下，还原成 $H_2O + O_2$ 。



02

• PART TWO •

研究方法

• PART TWO 研究方法

鱼与实验设计

为探讨高糖诱导下团头鲂氧化应激的分子机制，进行了为期3天的高糖负荷实验。

团头鲂 (19.94 ± 0.58 g) 在实验室条件下(光周期为自然条件，整个实验期间水温维持在 $25 \sim 26^{\circ}\text{C}$)，在实验设施的室内水箱(每个300 L)中驯化2周，实验前用基础商业饲料喂养。团头鲂禁食24小时后口服3 g/kg(体重)葡萄糖。口服前随机采集9条鱼作为对照。

• PART TWO 研究方法

样品收集

在灌喂后的0、1、2、4、8、12、24、48 h各时间点随机抽取3条鱼进行取样。从尾静脉采集血样，分为3个管，分别进行血液呼吸暴发测量、血细胞数和血浆制备。将血液以7500rpm，4℃离心5分钟制备血浆，血浆在-80℃保存，以备后续血浆参数分析。收集肝脏，立即冷冻在液氮中，保存在-80℃，以便随后检测基因表达和酶活性。

血液生化指标：采用检测试剂盒检测血浆中甘油三酯(TG)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、碱性磷酸酶(ALP)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)水平。

细胞计数：白细胞数、红细胞数和血红蛋白含量采用自动血液学分析仪(BC- 5300Vet;深圳迈瑞医疗国际有限公司)及检测试剂盒(深圳迈瑞医疗国际有限公司)。

呼吸爆发活力：100毫升血浆和0.2%的硝基蓝四唑（NBT）溶液在25°C的黑暗中孵育30min。孵育后，15 mL反应溶液和300 mL N，N-二甲酰胺充分混合，4 C、2000 rpm离心5min, 540 nm测定吸光度值。



03

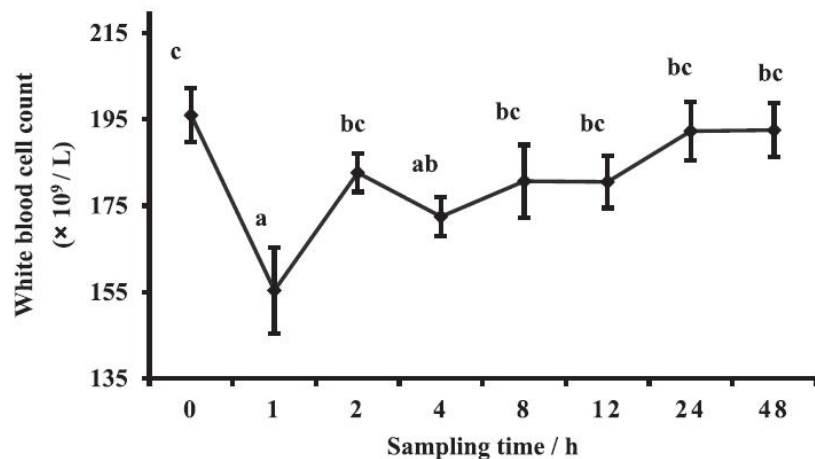
• PART TREE •

结果与分析

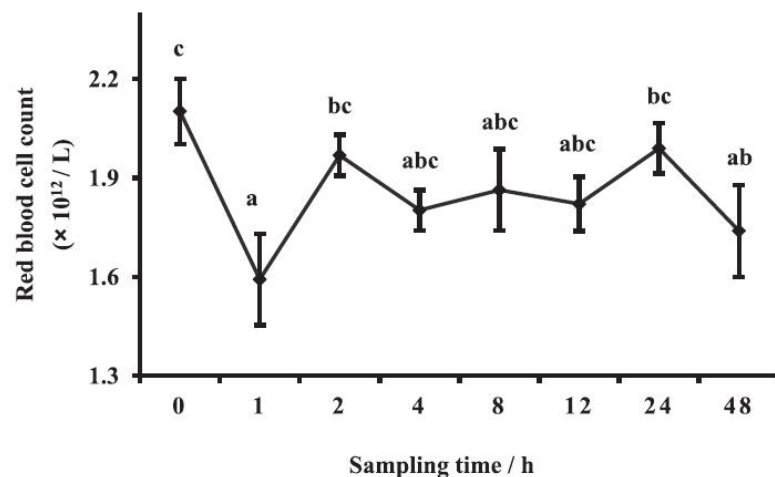
• PART THREE 结果与分析

血液指标

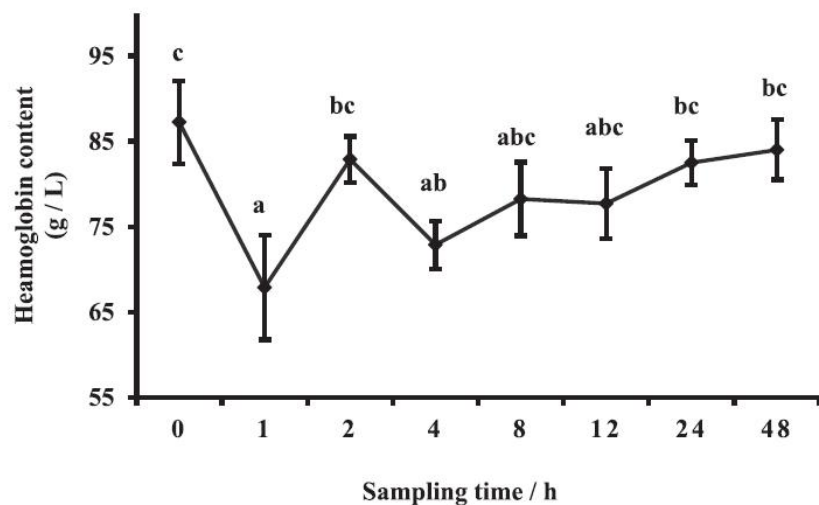
A



B



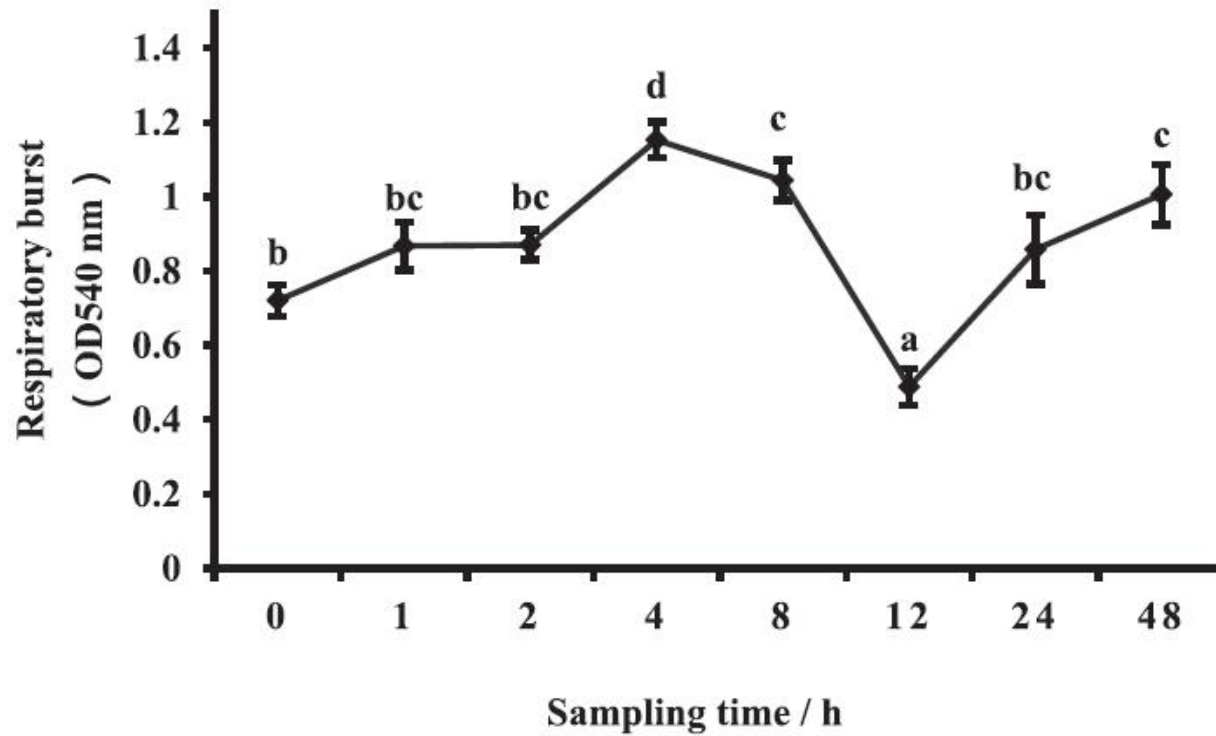
C



1 h时白细胞数、红细胞数和血红蛋白含量最低($P < 0.05$), 但随后恢复到初始水平。

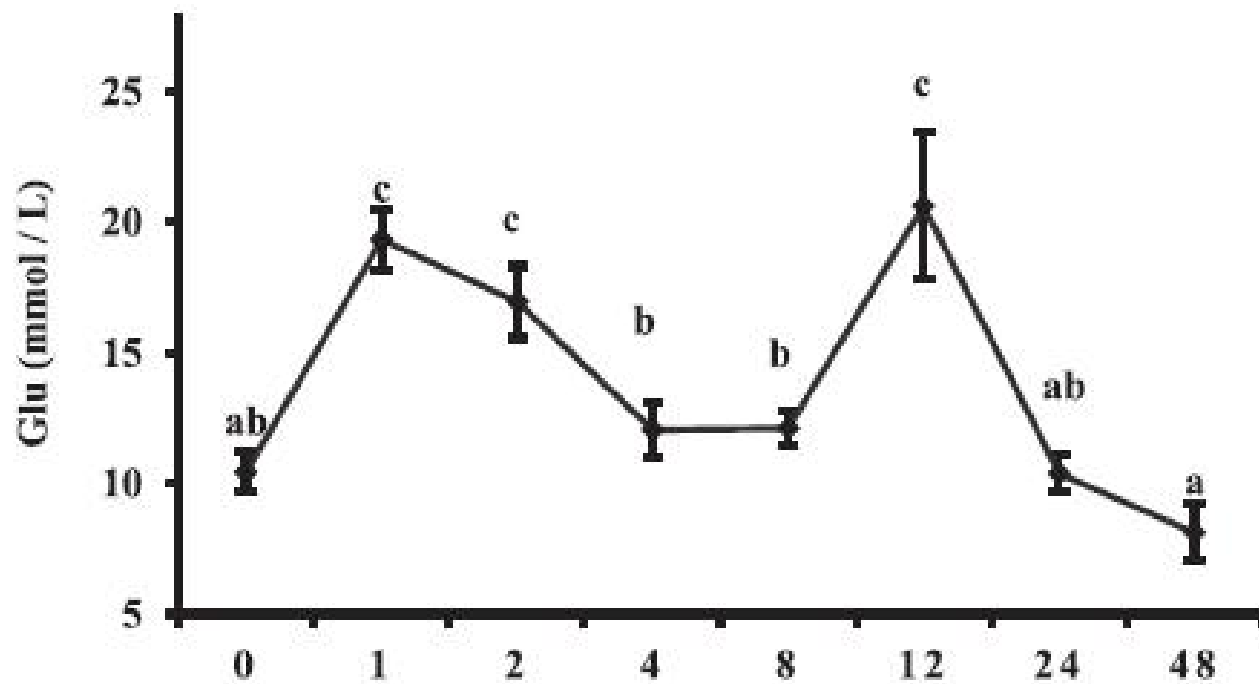
• PART THREE 结果与分析

血液呼吸爆发



• PART THREE 结果与分析

血液生化指标



• PART THREE 结果与分析

血液生化指标

Table 2
Plasma biochemical parameters in blunt snout bream juveniles fed with a high glucose concentration (3 g/kg body weight).

	Sampling time (h)								
	0	1	2	4	8	12	24	48	
TG (mmol/L)	1.50 ± 0.13 ^{bc}	1.68 ± 0.23 ^c	1.28 ± 0.07 ^{abc}	1.22 ± 0.80 ^{ab}	1.56 ± 0.13 ^{bc}	0.88 ± 0.15 ^a	1.04 ± 0.05 ^a	1.09 ± 0.15 ^a	
TC (mmol/L)	5.94 ± 0.36 ^{bc}	5.55 ± 0.13 ^{bc}	5.48 ± 0.28 ^{bc}	5.27 ± 0.22 ^{bc}	6.11 ± 0.46 ^c	3.76 ± 0.48 ^a	5.05 ± 0.21 ^{bc}	4.96 ± 0.41 ^{bc}	
IgG (mg/L)	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.00	
ALB (g/L)	11.91 ± 0.40 ^{bc}	10.69 ± 0.32 ^b	11.14 ± 0.48 ^{bc}	11.85 ± 0.34 ^{bc}	12.9 ± 0.97 ^c	8.35 ± 0.54 ^a	10.69 ± 0.35 ^b	10.89 ± 0.99 ^b	
TP (g/L)	29.22 ± 1.11 ^{bc}	27.27 ± 0.75 ^b	27.57 ± 1.14 ^{bc}	28.1 ± 0.65 ^{bc}	32.18 ± 2.54 ^c	18.97 ± 1.90 ^a	25.64 ± 0.80 ^b	27.41 ± 2.23 ^{bc}	
ALP (U/L)	42.39 ± 4.15 ^{ab}	48.83 ± 1.49 ^{bc}	43.76 ± 3.03 ^{abc}	49.31 ± 3.03 ^{bc}	53.93 ± 2.50 ^c	44.25 ± 5.13 ^{abc}	42.75 ± 4.57 ^{abc}	37.46 ± 3.74 ^a	
AST (U/L)	47.14 ± 5.15 ^a	85.50 ± 7.00 ^{bc}	103.61 ± 11.87 ^c	87.08 ± 7.83 ^{bc}	100.50 ± 5.85 ^c	53.90 ± 4.83 ^a	52.46 ± 5.10 ^a	66.99 ± 10.66 ^{ab}	
ALT (U/L)	3.13 ± 0.42 ^{ab}	6.60 ± 0.96 ^{cd}	10.33 ± 1.44 ^e	8.51 ± 1.09 ^{de}	6.30 ± 1.59 ^{bcd}	3.85 ± 0.67 ^{abc}	3.94 ± 0.57 ^{abc}	1.84 ± 0.92 ^a	
LDH (U/L)	427.63 ± 44.60 ^a	1102.46 ± 151.73 ^b	1182.60 ± 109.53 ^b	989.89 ± 123.08 ^b	1045.61 ± 145.48 ^b	595.05 ± 151.85 ^a	438.30 ± 57.72 ^a	968.80 ± 78.25 ^b	

Values are means for 9 fish at each time point. Mean values with different small letters next to each parameter are significantly different ($P < 0.05$).

TG: triglyceride; TC: total cholesterol; IgG: immunoglobulin G; ALB: albumin; TP: total protein; ALP: alkaline phosphatase; AST: aspartate transaminase; ALT: alanine aminotransferase; LDH: lactate dehydrogenase.

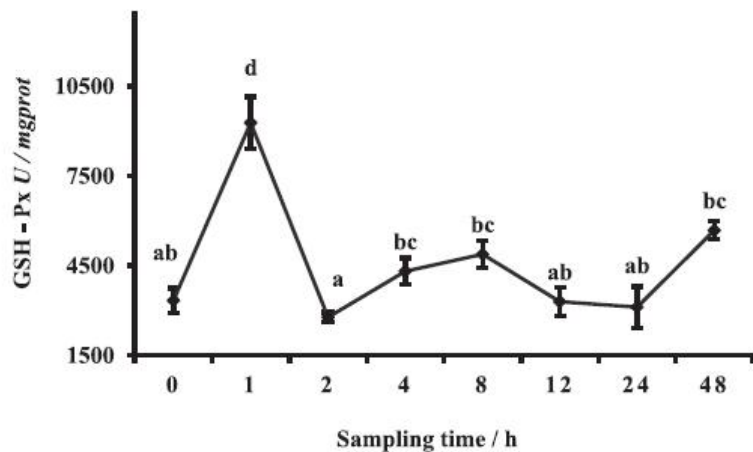
急性高血糖引起天冬氨酸转氨酶AST和丙氨酸转氨酶ALT水平升高($P < 0.05$), 说明肝损伤。同时, 高浓度ALT与胰岛素抵抗以及随后胰岛素敏感性的下降具有相关性。

随着第二阶段(12~48 h)血糖水平的升高, 血浆ALB、TP、TG、TC水平显著降低($P < 0.05$);这可能是由于急性高血糖引起的炎症所致。

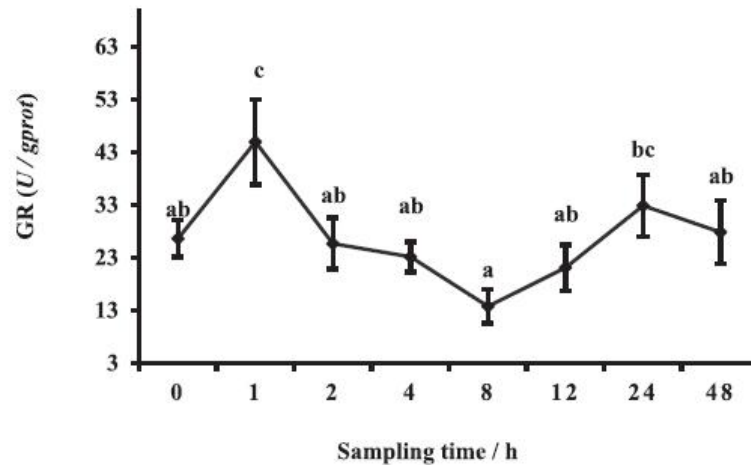
• PART THREE 结果与分析

肝脏抗氧化酶活性

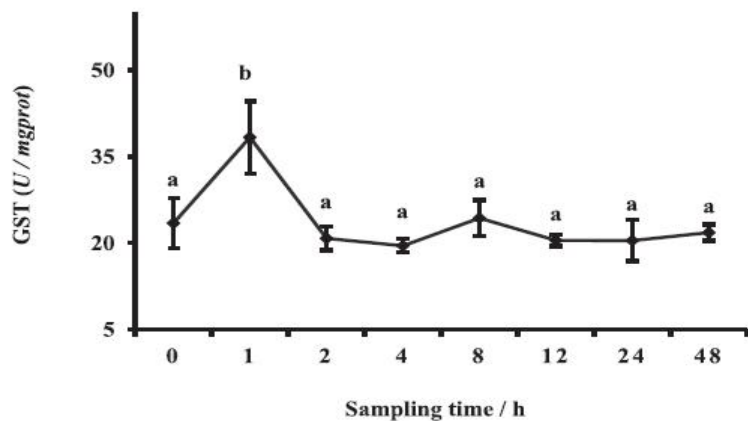
A



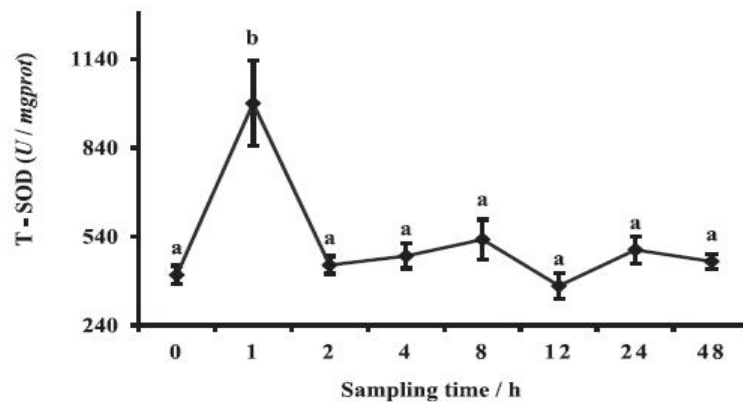
C



B



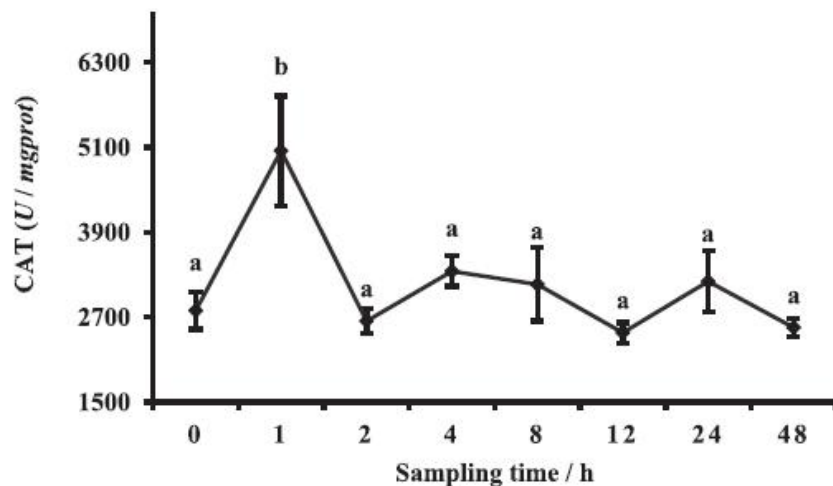
D



• PART THREE 结果与分析

肝脏抗氧化酶活性

E



口服葡萄糖后1小时团头鲂肝脏中抗氧化酶如T-SOD、GSH-Px、GST、GR、CAT活性显著增强。这表明清除急性高血糖引起的ROS所必需的保护机制被激活。因此，抗氧化酶的活性与氧化应激的程度高度相关。

• PART THREE 结果与分析

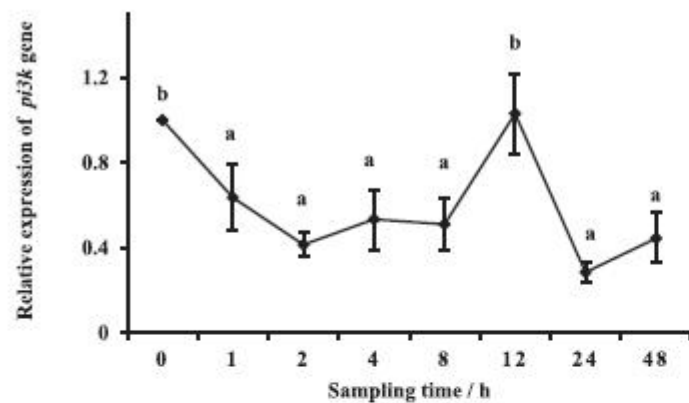
讨论

这些结果表明，高血糖和血糖水平的波动抑制了团头鲂口服葡萄糖后的呼吸暴发，可能与两种机制有关。首先，口服葡萄糖引起的急性高血糖同时激活氧化应激和抗氧化系统，是机体保护的“相互抵消”。其次，血糖水平的波动直接抑制了血液呼吸暴发。然而，高糖摄入对鱼类呼吸暴发的影响的具体分子机制还需要进一步研究。

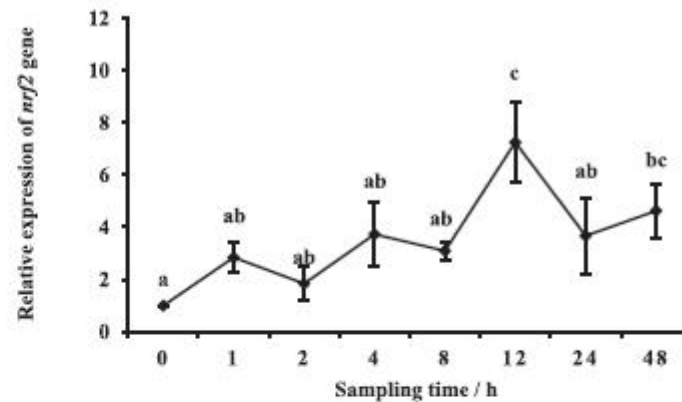
• PART THREE 结果与分析

pi3k、akt、nrf2、ho1基因在肝脏中的相对表达量

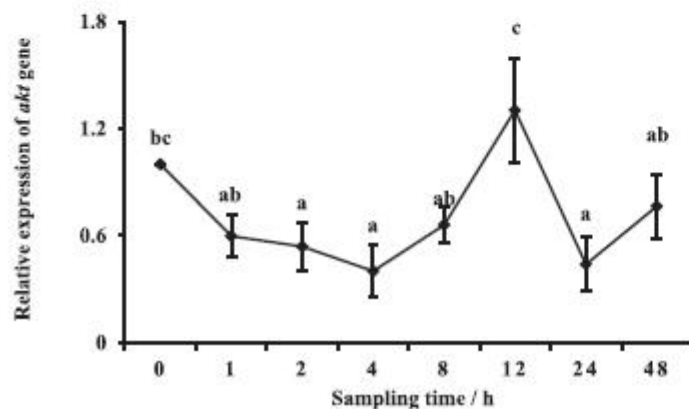
A



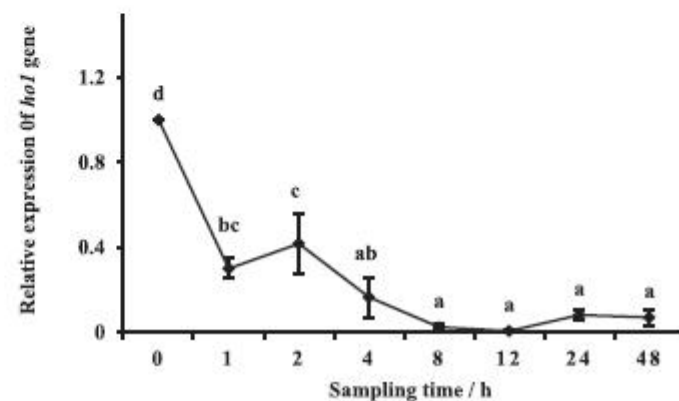
C



B



D



• PART THREE 结果与分析

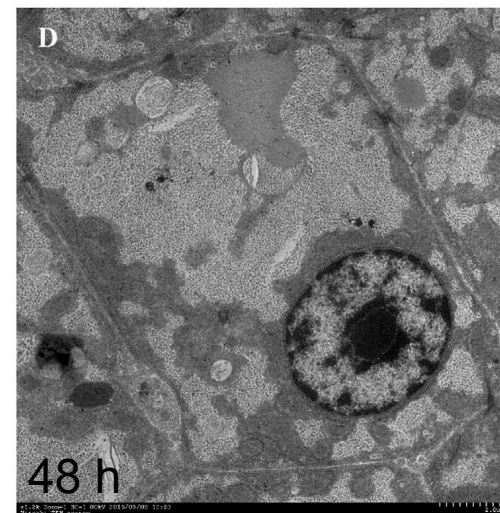
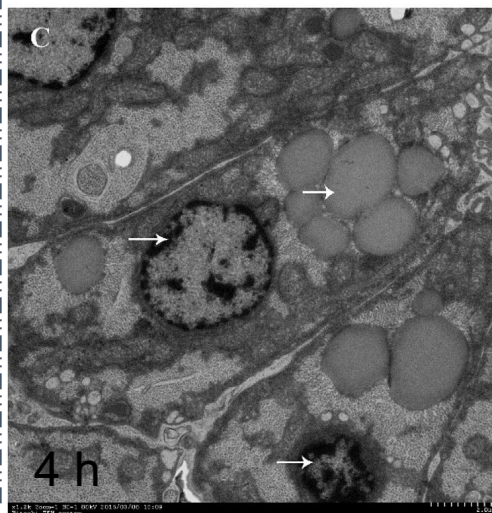
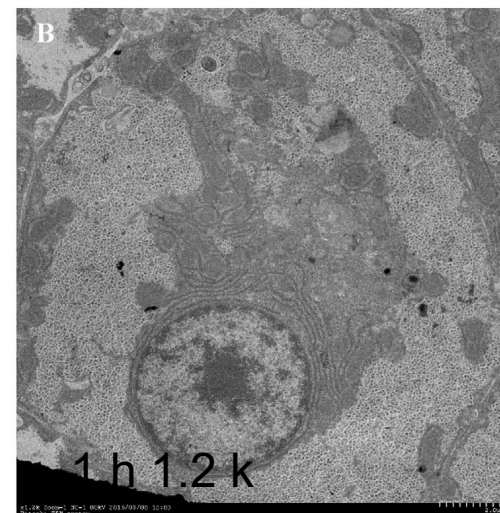
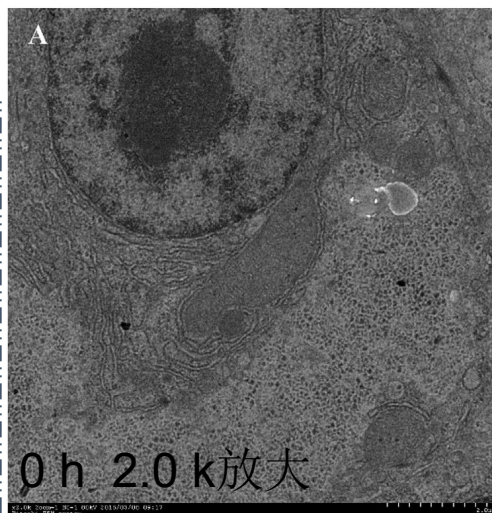
肝细胞的形态

采用日立S-450扫描电镜记录口服高糖后不同时间的变化。

1h(B), 团头鲂肝细胞出现细胞粘连, 但与处理前相比(A)不明显。

4 h(c)后,肝细胞的形态开始发生显著变化:细胞体积变小,细胞结构关闭,细胞脂滴积累较多,细胞器数量减少,脂滴严重挤压细胞器。另外,染色质固缩,凝集成大小不等的团块附着在核膜上。

48h(D)后,肝细胞大小恢复到初始状态;但在此阶段仍可观察到核固缩,且与1 h时相似。



结论

综上所述，本研究结果表明，口服葡萄糖引起的急性和持续性高血糖显著降低鱼的白细胞数、红细胞数和血红蛋白含量，引起氧化应激(丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、葡萄糖水平显著升高)和肝细胞早期凋亡。肝超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽还原酶活性均迅速升高，以保护机体免受氧化应激的影响。高血糖可显著降低血呼吸暴发。*nrf2* mRNA和抗氧化酶轻度上调作为一种补偿保护机制，下调的PI3K/Akt通路阻断了*nrf2*的这一功能。



THANK YOU



敬请老师同学批评指正