

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.06.05

# 马度米星铵对成肌细胞转录组和超微结构的影响

陈新,刘畅,张雨梅

(扬州大学兽医学院兽医药理与毒理学实验室,江苏扬州 225009)

[收稿日期] 2023-08-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 06-0040-07 [中图分类号] S859.796

**[摘要]** 探究马度米星铵对成肌细胞基因表达和超微结构的影响。马度米星铵处理 C2C12 细胞后,于细胞实时分析仪中记录细胞生长情况;利用 Illumina HiSeq 平台进行转录组测序,筛选差异表达基因并进行基因本体富集分析;显微镜下观察细胞空泡情况并拍照;透射电镜下观察拍照细胞超微结构。结果表明,马度米星铵抑制 C2C12 细胞生长,呈浓度和时间相关性;1  $\mu\text{M}$  马度米星铵处理细胞 8 h 后,差异表达基因共 2450 个,其中下调基因为 1411 个,上调基因 1039 个;基因本体分析发现,差异表达基因显著富集到空泡、DNA 修复、转移酶活性正调控等;细胞内空泡显著增加;1  $\mu\text{M}$  马度米星铵处理细胞 24 h 后,细胞器明显肿胀、线粒体嵴结构髓样变、粗面内质网表面附着核糖体脱颗粒。由此可知,马度米星铵体外可诱导 C2C12 细胞空泡化,破坏细胞器结构,抑制细胞生长,从而导致其骨骼肌成肌细胞毒性作用,干预细胞空泡化是预防和治疗马度米星铵中毒的重要途径。

**[关键词]** 马度米星铵;转录组;空泡;超微结构;成肌细胞

## Effects of Maduramicin Ammonium on Transcriptome and Ultrastructure of Myoblasts

CHEN Xin, LIU Chang, ZHANG Yu - mei

(Laboratory of Veterinary Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

**Abstract:** This study was set to investigate the effect of maduramicin ammonium on gene expression and ultrastructure in myoblasts. C2C12 cells were treated with maduramicin ammonium, the cell growth was recorded in the cell real - time analyzer; transcriptome sequencing was performed using the Illumina HiSeq platform to screen differentially expressed genes and perform gene ontology enrichment analysis; the vacuoles were observed and photographed under a microscope; the ultrastructure were observed and photographed under a transmission electron microscope. The results showed that maduramicin ammonium inhibited the growth of C2C12 cells in a concentration - and time - dependent manner. After treatment with 1  $\mu\text{M}$  maduramicin ammonium for 8 h, there were 2450 differentially expressed genes, including 1411 down - regulated genes and 1039 up - regulated genes. gene ontology analysis showed that the differentially expressed genes were significantly enriched in vacuole, DNA

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金项目(31902324、陈新)

**作者简介:** 陈新,副教授、硕导,从事兽医药理与毒理研究。E-mail: xinchen@yzu.edu.cn

repair, positive regulation of transferase activity, etc. Intracellular vacuoles increased significantly after treatment with 1  $\mu\text{M}$  maduramicin ammonium for 8 h. After treatment with 1  $\mu\text{M}$  maduramicin ammonium for 24 h, the organelles were obviously swollen, the mitochondrial crista structure was medullated, and ribosome degranulation was attached to the surface of the rough endoplasmic reticulum. The results suggested that maduramicin ammonium induced vacuolation of C2C12 cells and destroyed the structures of organelle, resulting in cell growth inhibition and its toxicity to myoblasts. This study reveals that intervening cell vacuolization is an important means to prevent and treat maduramicin ammonium poisoning.

**Key words:** maduramicin ammonium; transcriptome; vacuole; ultrastructure; myoblasts

马度米星又称马杜霉素,是从马杜拉放线菌的发酵产物中分离得到的一种聚醚类离子载体抗生素<sup>[1]</sup>。生产中常用其铵盐即马度米星铵(maduramicin ammonium, MA),添加于鸡饲料中用于预防球虫病<sup>[2-3]</sup>。其毒性大、安全范围窄,可引起靶动物(如肉鸡和火鸡)和非靶动物(牛、羊、猪、鱼、虾等)中毒,也会因环境污染或食品残留甚至误食导致人类中毒<sup>[4-6]</sup>。因此,深入研究马度米星铵的中毒机理具有重要的理论价值和现实意义。

本课题组前期研究发现马度米星铵主要损伤心肌和骨骼肌,表现为细胞生长、增殖和死亡受到影响,涉及到细胞周期、凋亡和自噬的调控<sup>[7-8]</sup>。转录组学研究能从整体水平上反映基因表达情况及其调控规律<sup>[9]</sup>。鉴于骨骼肌损伤是马度米星铵中毒的主要病理表现,本研究在 C2C12 小鼠骨骼肌成肌细胞上考察马度米星铵在骨骼肌细胞中的毒性作用,运用 RNA-seq 技术,检测马度米星铵对上述细胞基因表达的影响,利用透射电镜观察细胞超微结构,以期进一步阐明马度米星铵在骨骼肌细胞中的毒性作用机制,为临床减轻马度米星铵毒性、预防和治疗马度米星铵中毒提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 药品 马度米星铵( $\text{C}_{47}\text{H}_{83}\text{NO}_{17}$ , 分子量 934.16)购自中国兽药药品监察所(K0181304, 纯度 92.3%),溶于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配制成 5 mM,分装保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

1.2 试剂 DMEM 培养基购自 Hyclone 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Eallbio 公司;胰

酶购自碧云天公司。

1.3 细胞培养 C2C12 小鼠骨骼肌成肌细胞(CRL-1771)购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC),培养于含 10% 胎牛血清和 2 mM 谷胺酰氨的高糖(4.5 g/L)DMEM 细胞培养全液和  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  环境中。

1.4 细胞实时生长监测 C2C12 细胞以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞的起始密度种于细胞实时分析仪专用检测板中,置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中测试台上,于对数生长期时,加入不同浓度的马度米星铵(0.5、1 或 2  $\mu\text{M}$ )后实时监测,结束后导出细胞生长曲线图和各孔细胞指数(cell index, CI)值数据。细胞指数 = (N 时孔中阻抗 - 未加入细胞时阻抗) / 标称阻抗值。标称阻抗值是指实时细胞分析仪的电阻器已测得的阻值。

1.5 转录组测序 取对数生长期 C2C12 细胞,1  $\mu\text{M}$  马度米星铵处理 8 h,收集细胞(MA 组),另取未处理细胞作为对照组(CK 组),通过 Illumina HiSeq 系统进行转录组测序(武汉迈特维尔生物科技有限公司)。

1.6 差异表达基因筛选和分析 根据测序结果,使用 featureCounts 实现基因的 reads 计数,将基因的未经标准化的 reads 计数数据输入 DESeq2 进行差异表达分析,获得差异表达基因集,用 Benjamini-Hochberg 方法对假设检验概率(P value)进行多重假设检验校正,得到错误发现率(False Discovery Rate, FDR),差异基因的筛选条件为  $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$ ,且  $\text{FDR} < 0.05$ 。筛选获得差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)后对其进行基

因本体 (gene ontology, GO) 功能归类分析。

1.7 细胞内空泡情况观察 C2C12 细胞以每孔  $2 \times 10^4$  个细胞的起始密度种于 6 孔板中, 加入  $1 \mu\text{M}$  的马度米星铵处理 8 h, 在显微镜下观察拍照细胞内空泡情况。

1.8 细胞超微结构观察 C2C12 细胞经  $1 \mu\text{M}$  的马度米星铵处理 24 h, 另取未处理细胞作为对照组, 透射电镜下观察细胞内超微结构并拍照。

1.9 数据统计和分析 数据使用 GraphPad Prism 软件进行统计分析, 结果以平均值  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SEM) 表示。One - way ANOVA 用于显著性分析,  $P < 0.05$  即认为具有统计学差异。

## 2 结果与分析

2.1 马度米星铵抑制 C2C12 细胞生长 C2C12 细胞的生长曲线如图 1A 所示, 细胞暴露于 0.5、1 或  $2 \mu\text{M}$  马度米星铵, 生长被明显抑制。处理 36 h 后, 抑制作用呈现浓度依赖性和时间相关性。暴露 36 和 72 h 时, 同一处理时间, 抑制效应随着药物处理浓度的增加而增加, 呈浓度依赖性; 相同药物浓度, 处理时间越长, 抑制作用越强, 表现出时间相关性 (图 1B)。

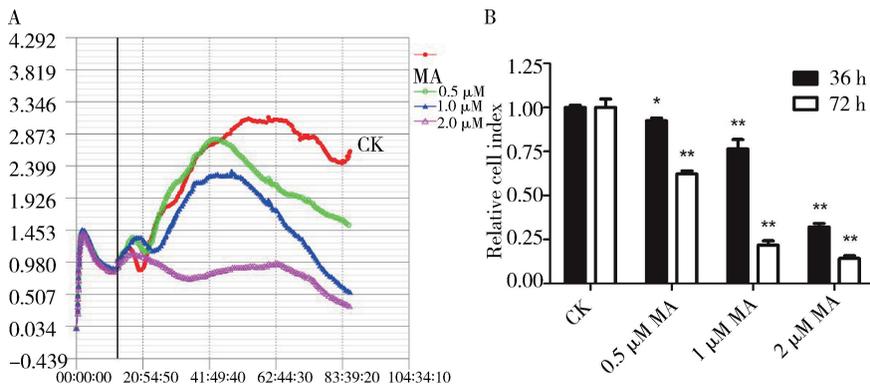
2.2 差异表达基因  $1 \mu\text{M}$  马度米星铵处理 C2C12 细胞 8 h 后, 共检测到 2450 个差异表达基因, 其中 1039 个基因被上调, 1411 个被下调 (图 2)。

2.3 基因本体富集分析 由图 3 可知, GO 注释显示, DEG 分别汇集在生物过程 (biological process)、

细胞组分 (cellular component)、分子功能 (molecular function) 三个类别中。上调和下调的 DEG 主要被注释到空泡 (vacuole)、DNA 修复 (DNA repair)、转移酶活性正调控 (positive regulation of transferase activity)、辅因子代谢过程 (cofactor metabolic process)、阴离子转运 (anion transport)、一元羧酸代谢过程 (monocarboxylic acid metabolic process)、溶酶体 (lysosome)、主动跨膜转运活性 (active transmembrane transport activity)、碳水化合物代谢过程 (carbohydrate metabolic process)。

2.4 马度米星铵诱导 C2C12 细胞空泡化 C2C12 细胞经  $1 \mu\text{M}$  马度米星铵处理 8 h 后, 不仅细胞数量减少, 而且细胞形态发生变化, 特别是胞内空间被大量空泡所占据, 同时空泡体积增大 (图 4)。

2.5 马度米星铵对 C2C12 细胞超微结构的影响 从图 5 中可知,  $1 \mu\text{M}$  马度米星铵处理 C2C12 细胞 24 h 后, 细胞中度损伤、水肿, 细胞膜完整, 膜周围可见少量微绒毛 (Mv), 未见明显肿胀; 细胞核 (N) 呈不规则形, 异染色质增多, 核膜完整, 核周隙未见明显增宽; 胞内基质局部溶解呈空泡样, 细胞器数量尚可、大多明显肿胀; 线粒体 (M) 大多中度肿胀, 膜完整, 基质溶解、变淡或呈空泡样, 嵴结构髓样变; 粗面内质网 (RER) 扩张, 膜间隙略增宽, 表面附着核糖体脱颗粒; 胞内可见 3 个自噬溶酶体 (ASS)、2 个自噬小体 (AP, 处于末期) 结构。



A. 生长曲线, B. 相对细胞指数。(与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;  $n = 3$ )

图 1 马度米星铵对 C2C12 细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of maduramicin ammonium on growth of C2C12 cells

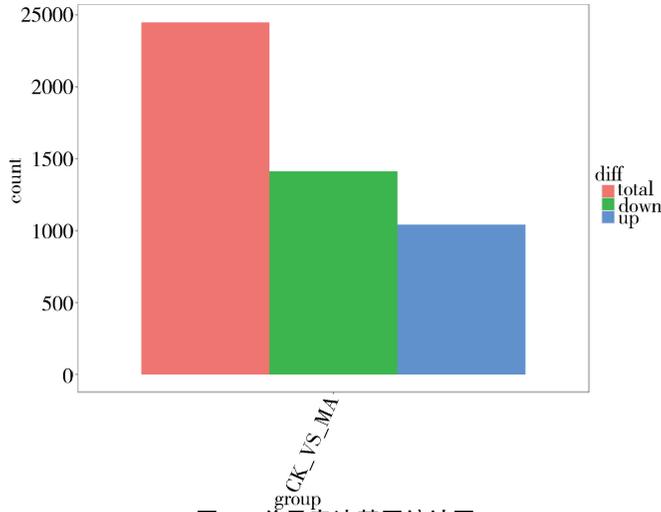


图 2 差异表达基因统计图

Fig 2 Cartogram of DEGs

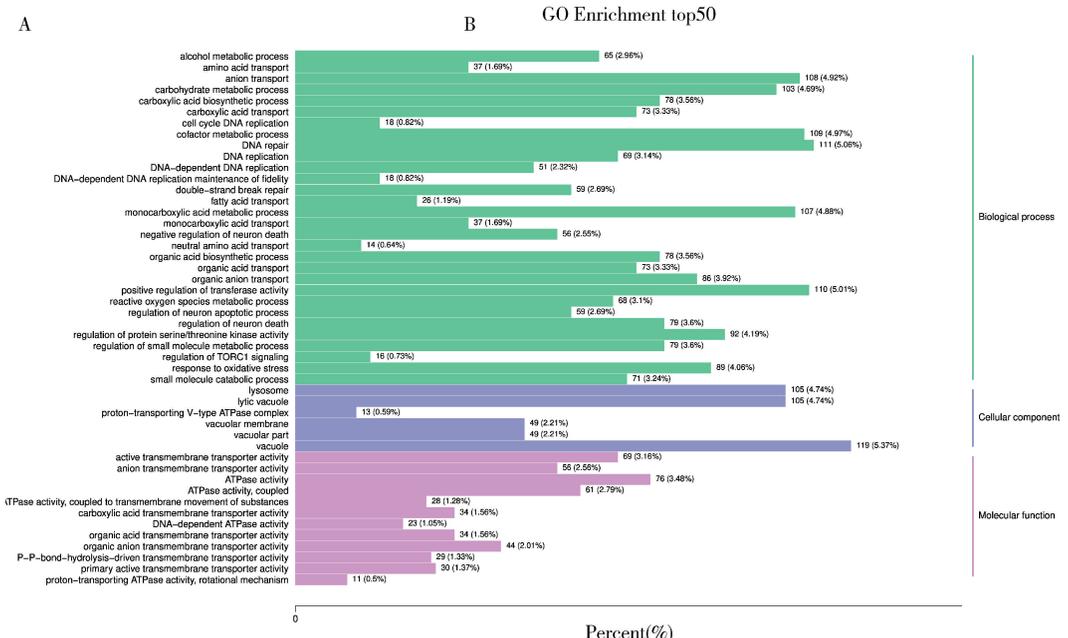
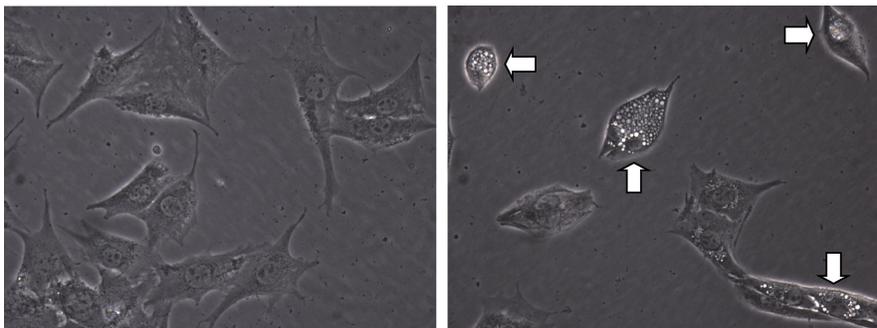


图 3 差异表达基因基因本体富集柱状图

Fig. 3 GO enrichment histogram of DEGs

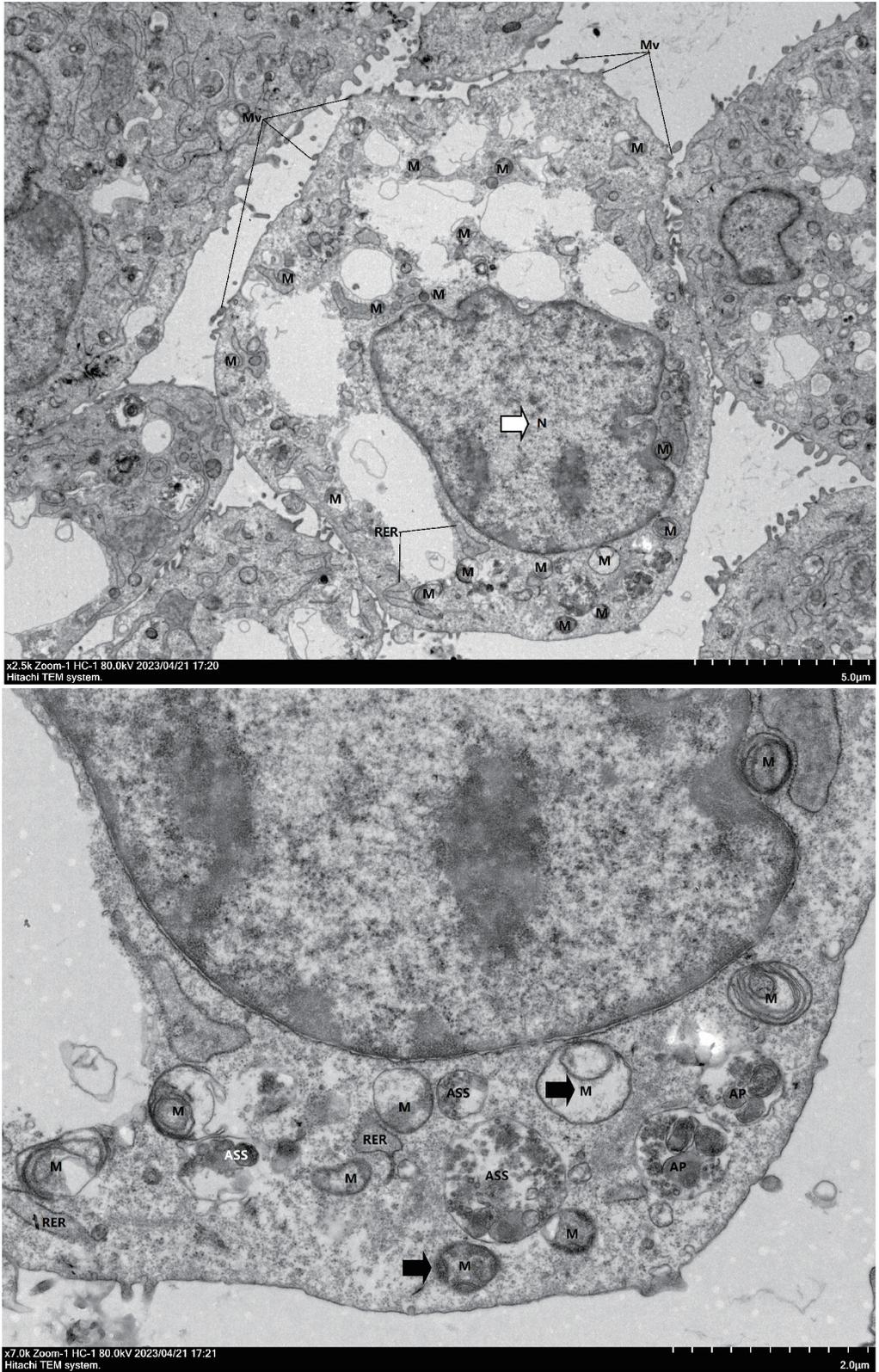


左图为对照组,右图为处理组

箭头指示细胞内出现大量空泡

图 4 马度米星铵对 C2C12 细胞内空泡情况的影响

Fig 4 Effect of maduramicin ammonium on cytoplasmic vacuolation in C2C12 cells



下图为上图的局部放大

白色箭头指示细胞核呈不规则形, 异染色质增多; 黑色箭头指示线粒体基质溶解, 嵴结构髓样变

图 5 马度米星铵处理后 C2C12 细胞超微结构

Fig 5 Ultrastructure of C2C12 cells treatment with maduramicin ammonium

### 3 讨论与结论

马度米星铵作为抗球虫药物被广泛应用<sup>[10]</sup>,但其毒性较大,威胁动物和人类的健康<sup>[11]</sup>,导致骨骼肌和心肌细胞损伤<sup>[12]</sup>。体外培养细胞,进行毒性试验,是广泛应用的化学物毒性考察方法,可用于预测药物对动物和人体的毒性。细胞实时分析仪可用于实时检测细胞生长情况,从而反映被测物质对细胞的毒性效应。本研究表明,马度米星铵可显著抑制 C2C12 细胞生长,呈浓度和时间依赖性。

细胞生长曲线是细胞增殖、衰老、死亡等作用的综合表现,受到细胞内相关基因表达的精密调控。转录组学已在多个领域上广泛应用于整体水平上研究基因表达情况及其调控规律<sup>[13]</sup>。高通量测序结果显示,暴露于马度米星铵后,C2C12 细胞中 1411 个基因被下调,1039 个基因上调。对这 2450 个 DEG 进行 GO 分析发现,显著富集到空泡、DNA 修复、转移酶活性正调控等。

细胞空泡化是药物和外源化学物细胞毒性的重要表现形式<sup>[14]</sup>。为了验证转录组分析的结果,本研究在普通光学显微镜下观察暴露于马度米星铵后,C2C12 细胞内的空泡情况,结果显示,马度米星处理可使细胞内空泡明显增多增大;同时,本研究还进一步通过透射电镜观察到细胞暴露于马度米星铵后,胞内基质局部溶解呈空泡样。这些结果与转录组分析结果相互印证,表明引起胞质空泡形成可能是马度米星铵影响细胞功能,甚至导致细胞死亡的重要原因,马度米星铵的骨骼肌毒性与其诱导骨骼肌成肌细胞空泡化密切相关。其它聚醚类离子载体抗生素如莫能菌素、盐霉素和拉沙洛西同样可引起细胞空泡增加<sup>[15]</sup>。究其原因,可能是由于聚醚类抗生素具有离子载体的性质,可与钠、钾、钙等离子结合,导致细胞内离子水平失衡,渗透压改变<sup>[16]</sup>。

细胞空泡化死亡是与细胞空泡化紧密联系的细胞死亡,表现为细胞内出现大量不可逆的空泡<sup>[17]</sup>。空泡化死亡包括类(副)凋亡、自噬、坏死性凋亡、巨泡式死亡、胀亡等,其中类(副)凋亡细胞会呈现线粒体和内质网等细胞器结构和功能改变<sup>[18]</sup>。本研究中,利用透射电镜对 C2C12 细胞超

微结构的观察发现,马度米星铵处理后,细胞器明显肿胀,线粒体嵴结构髓样变、粗面内质网表面附着核糖体脱颗粒等,表明细胞可能发生类(副)凋亡。同时,胞内可见自噬溶酶体和末期自噬小体结构,说明细胞存在自噬行为。自噬是一种依赖溶酶体水解活性的细胞自我更新方式,自噬的过度激活或者自噬流阻断都会导致细胞死亡<sup>[19]</sup>。我们之前的研究表明马度米星铵可阻断细胞内自噬流,诱导内质网应激<sup>[12]</sup>。因此,马度米星铵导致的细胞空泡化与空泡化死亡的关系还有待进一步研究。

另外,本研究中,透射电镜下还观察到马度米星铵导致细胞核呈不规则形,异染色质增多,提示细胞凋亡的发生。而马度米星铵作为离子载体是否会引引起胞内钠、钾、钙等离子浓度的变化,这些离子水平的改变与细胞凋亡的关系及具体机制也需进一步研究。细胞维持离子平衡和渗透压需要消耗能量,我们前期已发现马度米星可调节细胞内 AMPK 和 Akt 蛋白活性<sup>[12]</sup>,AMPK 蛋白是细胞内重要的能量调节器,Akt/mTOR 通路也参与能量代谢,马度米星铵对这些蛋白活性的影响与其改变线粒体等细胞器结构之间是否存在联系也有待深入研究。

马度米星铵作为聚醚类离子载体抗生素,可引起 C2C12 细胞空泡化,改变细胞超微结构,从而抑制其生长,这是其骨骼肌毒性的重要原因。故调控马度米星铵所致的细胞空泡化可预防和治疗其中毒。

### 参考文献:

- [1] Fleck W F, Strauss D G, Meyer J, *et al.* Fermentation, isolation, and biological activity of maduramycin: a new antibiotic from *Actinomadura rubra* [J]. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 1978, 18(6):389-398.
- [2] Noack S, Chapman H D, Selzer P M. Anticoccidial drugs of the livestock industry[J]. *Parasitology Research*, 2019, 118(7): 2009-2026.
- [3] Nouri A. Anticoccidial and immunogenic effectivity of encapsulated organic acids and anticoccidial drugs in broilers infected with *Eimeria* spp[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1):17060.
- [4] Singh T, Gupta R. Clinico-haematological and mineral studies on experimental maduramycin toxicity in chickens[J]. *Veterinary*

- Parasitology, 2003, 116(4):345–353
- [5] Shimshoni J A, Britzi M, Pozzi PS, *et al.* Acute maduramicin toxicosis in pregnant gilts[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 68:283–289
- [6] Sharma N, Bhalla A, Varma S, *et al.* Toxicity of maduramicin [J]. Emergency Medicine Journal, 2005, 22(12):880–882
- [7] Chen X, Gu Y, Singh K, *et al.* Maduramicin inhibits proliferation and induces apoptosis in myoblast cells[J]. PLoS One, 2014, 9(12):e115652.
- [8] Chen X, Chen L, Jiang S, *et al.* Maduramicin induces apoptosis and necrosis, and blocks autophagic flux in myocardial H9c2 cells [J]. Journal of Applied Toxicology, 2018, 38(3):366–375.
- [9] 黄钧鸿, 黄巧娟, 李斌, 等. 基于高通量测序的 RNA 信息解析技术[J]. 生命科学, 2021, 33(3):267–280.
- Huang J H, Huang Q J, Li B, *et al.* Bioinformatic methods for analyzing noncoding RNAs from high – throughput sequencing data[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2021, 33(3):267–280.
- [10] Rajan S, Tsou H R, Mowery P C, *et al.* Natural abundance two – dimensional double – quantum  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of maduramicin, a polyether ionophore antibiotic and coccidiostat[J]. The Journal of Antibiotics(Tokyo), 1984, 37(11):1495–1500.
- [11] Dorne J, Fernández – Cruz M, Bertelsen U, *et al.* Risk assessment of coccidiostats during feed cross – contamination; animal and human health aspects[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2013, 270(3):196–208
- [12] 陈新. 马度米星铵致 H9c2 心肌细胞和 C2C12 骨骼肌细胞毒性作用机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- Chen X. Toxic mechanism of maduramicin ammonium in H9c2 cardiac muscle cells and C2C12 skeletal muscle cells [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [13] 刘妍罕, 张明洋, 曾茂芹, 等. 类志贺邻单胞菌感染对杂交鲟脾脏转录组的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2022, 43(1):33–41.
- Liu Y H, Zhang M Y, Zeng M Q, *et al.* Transcriptome analysis of sturgeon spleen infected with *Plesiomonas shigelloides* [J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2022, 43(1):33–41.
- [14] Aki T, Nara A, Uemura K. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances [J]. Cell Biology and Toxicology, 2012, 28(3):125–131.
- [15] Henn D, Venter A, Ferreira GCH, *et al.* The In Vitro Cytotoxic Effects of Ionophore Exposure on Selected Cytoskeletal Proteins of C2C12 Myoblasts[J]. Toxins(Basel), 2022, 14(7):447.
- [16] Ekinci İ B, Chłódowska A, Olejnik M. Ionophore Toxicity in Animals; A Review of Clinical and Molecular Aspects [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2):1696.
- [17] Shubin A V, Demidyuk I V, Komissarov A A, *et al.* Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival[J]. Oncotarget, 2016, 7(34):55863–55889.
- [18] Lee D, Kim I Y, Saha S, *et al.* Paraptosis in the anti – cancer arsenal of natural products[J]. Pharmacology and Therapeutics, 2016, 162:120–133.
- [19] Klionsky D J, Abdel – Aziz A K, Abdelfatah S, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)[J]. Autophagy, 2021, 17(1):1–382.

(编辑:侯向辉)