

程金花, 崔乐康, 戴超辉, 等. *FBXW7* 基因对脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)诱导的猪肠上皮细胞铁死亡的调控[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(1): 132-141.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.01.014

FBXW7 基因对脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)诱导的猪肠上皮细胞铁死亡的调控

程金花^{1,2}, 崔乐康³, 戴超辉^{1,2}, 李伟宁^{1,2}, 李辉^{1,2}, 赵为民^{1,2}, 李碧侠^{1,2}, 王学敏^{1,2}, 廖超^{1,2}, 包文斌³, 付言峰^{1,2}

(1.江苏省农业科学院畜牧研究所/农业农村部种养结合重点实验室/江苏省畜禽精准育种工程研究中心, 江苏 南京 210014; 2.江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014; 3.扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 为了明确 *FBXW7* 基因在脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)诱导的猪肠上皮细胞铁死亡过程中的调控作用, 本研究用 DON 处理猪肠上皮细胞系(IPEC-J2)细胞, 通过实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)检测细胞中 *FBXW7* 基因与铁死亡相关基因的表达水平, 通过基因干扰/过表达技术结合 qPCR 探究 *FBXW7* 基因在 DON 诱导的 IPEC-J2 细胞损伤过程中的调控作用。结果表明, 与未用 DON 处理的对照(NC)相比, DON 处理 IPEC-J2 细胞后, 细胞活力下降, 细胞内活性氧(ROS)水平极显著升高($P < 0.01$), 细胞中 *FBXW7* 基因表达水平显著或极显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且铁死亡相关基因表达水平也发生显著或极显著变化($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 *FBXW7* 基因过表达抑制了铁死亡激活基因的表达, 促进了铁死亡抑制基因的表达, 最终缓解了 DON 诱导的 IPEC-J2 细胞铁死亡。本研究结果初步揭示过表达 *FBXW7* 基因可缓解 DON 诱导的猪肠上皮细胞铁死亡, 进而提高猪对 DON 的抗性, 为利用抗病育种策略制订 DON 预防和控制新方法提供了理论依据。

关键词: 猪; *FBXW7* 基因; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON); 肠上皮细胞; 铁死亡

中图分类号: S828 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2026)01-0132-10

Regulation of deoxynivalenol-induced ferroptosis in porcine intestinal epithelial cells by *FBXW7* gene

CHENG Jinhua^{1,2}, CUI Lekang³, DAI Chaohui^{1,2}, LI Weining^{1,2}, LI Hui^{1,2}, ZHAO Weimin^{1,2}, LI Bixia^{1,2}, WANG Xuemin^{1,2}, LIAO Chao^{1,2}, BAO Wenbin³, FU Yanfeng^{1,2}

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop and Animal Integrated Farming, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Jiangsu Province Engineering Research Center of Precision Animal Breeding, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China; 3. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

收稿日期: 2025-08-11

基金项目: 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目[JBSG(2021)099]; 江苏省青年基金项目(BK20230753); 国家生猪产业技术体系项目(CARS-PIG-35); 江苏省农业科学院科学仪器开放共享自主研究课题[GX(24)1004]

作者简介: 程金花(1981-), 女, 江苏盐城人, 博士, 副研究员, 研究方向为猪遗传育种与繁殖。(E-mail) jhcheng@jaas.ac.cn

通讯作者: 付言峰, (E-mail) 20110009@jaas.ac.cn; 包文斌, (E-mail) wbbao@yzu.edu.cn

Abstract: To elucidate the regulatory role of the *FBXW7* gene in deoxynivalenol (DON)-induced ferroptosis in porcine intestinal epithelial cells, IPEC-J2 cells were treated with varying concentrations of DON, and quantitative real-time PCR (qPCR) was used to determine the expression levels of the *FBXW7* gene and some ferroptosis-related genes in IPEC-J2 cells under different treatments. Furthermore, gene knockdown and overexpression

techniques combined with qPCR were utilized to explore the regulation of *FBXW7* in DON-induced IPEC-J2 cell damage. The results demonstrated that DON significantly reduced IPEC-J2 cell viability, and markedly increased intracellular reactive oxygen species (ROS) level ($P < 0.01$). Additionally, DON exposure significantly upregulated *FBXW7* gene expression and induced substantial alterations in the expression of ferroptosis pathway-related genes. However, *FBXW7* overexpression inhibited the expression of DON-induced ferroptosis-activating genes and promoted the expression of ferroptosis-inhibiting genes, ultimately alleviating DON-induced ferroptosis in IPEC-J2 cells. This study provided preliminary insights into that the overexpression of *FBXW7* gene *in vitro* may be beneficial for alleviating DON induced ferroptosis in pig intestinal epithelial cells, thereby enhancing pig resistance to DON. This study provides a theoretical basis for developing new methods for DON prevention and control using disease resistant breeding strategies.

Key words: pig; *FBXW7* gene; deoxynivalenol (DON); intestinal epithelial cells; ferroptosis

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON), 俗称呕吐毒素,是一类主要由禾谷镰刀菌产生的霉菌毒素,也是饲料中最常见的污染物之一^[1]。肠道不仅是动物机体抵抗 DON 侵害的第一道屏障,也是该毒素的主要作用靶器官^[2-3]。反刍动物能将摄入的 DON 迅速转化为毒性极低的脱环氧衍生物——脱环氧脱氧雪腐镰刀菌烯醇(De-epoxy-deoxynivalenol, DOM-1),相比之下,猪对该毒素的转化能力有限,仅少部分 DON 被肠道菌群转化为 DOM-1,大部分会直接穿过小肠上皮进入血液^[4]。DON 暴露对断奶仔猪具有双重危害:一方面会降低采食量以及生长速度,另一方面会损害肝、肠道、肾等多个器官的正常生理功能^[5-7]。

铁死亡(Ferroptosis)是一种区别于细胞自噬、凋亡和坏死的铁依赖性细胞程序性死亡,该过程依赖铁离子催化的芬顿反应,通过将线粒体呼吸产生的过氧化氢(H_2O_2)转化为高反应活性的羟自由基,进而驱动细胞内氧化脂质大量积聚,与此同时,谷胱甘肽过氧化物酶 4(*GPX4*)的活性显著降低,致使其无法有效利用谷胱甘肽(GSH)催化氧化脂质的还原反应,最终引发铁死亡^[8]。在猪个体试验研究中, DON 可增加猪小肠组织和细胞中的铁含量,诱导氧化应激,从而诱导铁死亡的发生;铁死亡进一步导致猪肠道屏障功能受损、炎症反应增强以及肠道形态结构改变(如绒毛缩短、隐窝加深等),最终对猪的生长性能和健康状况产生不利影响。在体外培养的猪小肠上皮细胞模型中, DON 可以上调酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(*ACSL4*)和铁蛋白轻链(*FTL*)的表达,导致细胞内铁离子异常积累,从而诱导细胞发生铁死亡^[9]。

F-box 和 WD 重复结构域蛋白 7(F-box and WD repeat domain containing 7, *FBXW7*)是一种重要的

SCF 型 E3 泛素连接酶,主要通过泛素化修饰介导多种关键蛋白的降解,从而在细胞周期调控、肿瘤抑制、代谢平衡以及细胞死亡等多种生物学过程中发挥重要作用^[10]。更重要的是, *FBXW7* 蛋白可能通过靶向降解多种癌蛋白,进而发挥肿瘤抑制功能^[11-13]。上述研究从分子机制层面揭示了 *FBXW7* 蛋白的重要生物学功能及其在细胞生理、病理过程中的调控作用,为癌症靶向治疗和心血管疾病防治提供了新的潜在靶点。然而,在 DON 诱导猪肠上皮细胞铁死亡过程中, *FBXW7* 基因的具体功能和调控机制尚未明确。因此,本研究通过细胞活力检测、活性氧水平测定和基因表达水平检测等方法,明确 DON 对猪肠上皮细胞的损伤效应及 *FBXW7* 基因的表达特征,并利用基因过表达与干扰技术,探究 *FBXW7* 基因表达是否参与调控 DON 诱导的猪肠上皮细胞铁死亡过程,旨在阐明 *FBXW7* 基因调控 DON 诱导猪肠上皮细胞铁死亡的可能作用机制,进而为从分子水平制定 DON 预防控制新方法提供理论依据与数据支撑。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

本研究中的猪肠上皮细胞系(IPEC-J2, 货号: CL0176)和 DMEM/F12 基础培养基(货号: sj022)均购自湖南丰晖生物科技有限公司。Opti-MEM 无血清培养基(货号: BL1117B)、胰酶(货号: BL1094A)、胎牛血清(货号: BL205A)和青霉素链霉素混合液(双抗, 货号: BL505A)均购自北京兰杰柯科技有限公司。DON(货号: B24150)购自上海源叶生物科技有限公司。Lipofectamine3000 转染试剂(货号: L3000-015)购自美国赛默飞世尔科技有限公司。CCK-8 细胞活力检测试剂盒(货号: 40203ES60)购

自上海翊圣生物科技有限公司。活性氧检测试剂盒(货号:S0033S)购自上海碧云天生物技术有限公司。Trizol 试剂(货号:R401-01)、反转录试剂盒(货号:R323-01)和荧光定量试剂盒(货号:Q311-02)均购自南京诺唯赞生物科技有限公司。质粒提取试剂盒(货号:DP123)和 PCR 产物回收试剂盒(货号:DP214)均购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 DON 处理 IPEC-J2 细胞

使用胰酶消化形态良好且处于对数生长期的 IPEC-J2 细胞,用 DMEM/F12 培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 双抗)重悬并进行细胞计数,随后采用两种接种方式:以 1 孔 2×10^5 个细胞(终体积 1 mL)的密度接种到 3 块 12 孔板中;以 1 孔 5×10^3 个细胞(终体积 100 μL)的密度接种到 3 块 96 孔板中。将上述孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱(含 5% CO_2)中培养过夜。待细胞汇合度达到 80% 时,进行 DON 处理试验。试验采用 4 个 DON 质量浓度梯度(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与 3 个处理时间梯度(12 h、24 h、48 h)的交叉试验设计,共设 12 个处理,每个处理设置 3 个生物学重复。

1.3 细胞活力检测

使用 CCK8 细胞活力检测试剂盒对 DON 处理的 3 块 96 孔板中的 IPEC-J2 细胞活力进行检测,以评估不同处理对 IPEC-J2 细胞活力的影响。所有试验操作均严格遵循试剂盒说明书执行,主要操作步骤如下:取出培养箱中待检测的 96 孔板,每孔加入 CCK8 试剂 10 μL ,轻轻吹打混匀后将细胞放回培养箱,避光孵育 2 h,最后使用酶标仪检测细胞在 450 nm 波长处的吸光度(OD)。细胞活力根据以下公式计算:

$$\text{细胞活力} = (\text{OD}_{\text{样本}} - \text{OD}_{\text{空白}}) / (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}) \times 100\%$$

公式中样本指经不同质量浓度 DON 处理、不同时间孵育的 IPEC-J2 细胞,即试验的核心组。对照指未经 DON 处理(DON 质量浓度为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$),但其他培养条件(如培养基、孵育时间、温度、 CO_2 浓度等)与样本完全一致的 IPEC-J2 细胞。空白指不含任何细胞,仅含等量培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 双抗)和 CCK8 试剂。

1.4 细胞活性氧检测

针对 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DON 处理 24 h 的 IPEC-J2 细胞,采用活性氧(ROS)检测试剂盒测定细胞内 ROS

水平,所有操作均严格按照试剂盒说明书执行。主要操作步骤如下:用无血清 Opti-MEM 培养基轻柔洗涤细胞 2 次,每孔加入 10 μL 活性氧荧光探针 DCFH-DA 溶液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中避光孵育 1 h,随后再用无血清 Opti-MEM 培养基轻柔洗涤细胞 3 次,以充分去除未结合的探针,每孔加入适量无血清 Opti-MEM 培养基以维持细胞活性,通过荧光显微镜观察细胞内荧光信号的强度与分布,以此评估 ROS 水平。荧光信号强度与细胞内 ROS 含量呈正相关,即荧光信号越强,表明细胞内 ROS 积累越多。未经 DON 处理、其余培养条件完全一致的正常细胞作为阴性对照(NC),3 个质量浓度 DON 处理分别是 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DON 处理(DON-0.5)、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DON 处理(DON-1.0)、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DON 处理(DON-2.0),通过比较 DON 处理与对照 ROS 水平的差异,揭示 DON 对细胞造成氧化损伤的程度。

1.5 基因表达水平检测

引物设计与合成:根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)GenBank 数据库中猪 *FBXW7* 等基因的编码序列区(CDS)信息,利用在线软件(<https://primer3.ut.ee/>)设计实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)引物;同时,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)基因为内参基因,设计 qPCR 定量引物。所有引物均委托安徽通用生物技术公司合成,引物的具体信息如表 1 所示。

取方法 1.2 所述经 DON 处理的 3 块 12 孔板 IPEC-J2 细胞,采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,随后以提取的总 RNA 为模板,利用反转录试剂盒合成 cDNA,操作主要分为 2 个阶段。第一阶段为基因组 DNA 清除反应,反应体系(10 μL): 1 μg 总 RNA、2 μL 5 \times gDNA Eraser Buffer、1 μL gDNA Eraser,加 RNase-free 双蒸水(ddH₂O)补足至 10 μL ,42 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴孵育 2 min 完成模板预处理;第二阶段为反转录反应:取 10 μL 预处理液,加入 1 μL PrimeScript RT Enzyme Mix、1 μL RT Primer Mix、4 μL 5 \times PrimeScript Buffer 及 4 μL ddH₂O,反转录程序设置为 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min、85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。最终将获得的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

qPCR 扩增体系(20 μL): 10 μL 2 \times NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus,上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1 μL ,模板 1 μL ,以 ddH₂O 补足至 20 μL 。扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,

60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。以 *GAPDH* 基因作为内参, 各个基因的相对表达水平通

过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法确定^[14]。

表 1 本试验所用引物信息

Table 1 Primer information in this study

基因名称	引物序列	产物长度(bp)	登录号
<i>FBXW7</i>	F: 5'-AAGACAACCAGAGGAGGAGC-3' R: 5'-TGTTCTTCCTGGTTCCCGA-3'	159	XM_021101502.1
<i>LPCAT3</i>	F: 5'-TGACCTTGAAGCTGATCGGT-3' R: 5'-GAAACCAGCAACTCCAGCA-3'	128	XM_003355593.5
<i>NCOA4</i>	F: 5'-TGGAGCTTGCTATTGGTGGA-3' R: 5'-CAGGTGACGACTTATGCAGC-3'	101	XM_005671215.3
<i>GPX4</i>	F: 5'-CATGCACGAATTCTCAGCCA-3' R: 5'-AGGCCAGAATCCGTAAACCA-3'	179	NM_214407.1
<i>SLC7A11</i>	F: 5'-CTCTGGCATTGGACGCTAC-3' R: 5'-GAAAATCTGGATCCGGGCAC-3'	152	XM_021101587.1
<i>RELA</i>	F: 5'-TGCCTACATCAGACAGCACA-3' R: 5'-GCCACTAACGATTCCGTTCC-3'	133	NM_001114281.1
<i>MYC</i>	F: 5'-TGGGCAGCAACTCGAATTTC-3' R: 5'-GCCACTAACGATTCCGTTCC-3'	164	NM_001005154.1
<i>BUB1</i>	F: 5'-ATTGCTCATGTTTCTCCGGC-3' R: 5'-GCCACTAACGATTCCGTTCC-3'	145	XM_021087047.1
<i>MTOR</i>	F: 5'-CCATTCTTCTCTCAGGCGC-3' R: 5'-GCCACTAACGATTCCGTTCC-3'	161	XM_003127584.6
<i>DNMT1</i>	F: 5'-CCCGGAGAAGCAAGTCAGAT-3' R: 5'-TGCAGTGTCTTCTCAGGTT-3'	146	NM_001032355.1
<i>NFKB2</i>	F: 5'-CTGAAGCCGGTTATCTCCCA-3' R: 5'-GCACCTTGTCAAAAGCAGA-3'	136	XM_021072741.1
<i>PER2</i>	F: 5'-CGAACACAATCCGTCCACAA-3' R: 5'-TTGGCTTTCACCTGCTTAC-3'	189	XM_021074887.1
<i>GAPDH</i>	F: 5'-ACATCATCCCTGCTTCTACTGG-3' R: 5'-CTCGGACGCTGCTTAC-3'	188	NM_001206359.1

1.6 *FBXW7* 基因干扰/过表达及对 DON 处理 IPEC-J2 细胞中铁死亡相关基因表达的影响

FBXW7 基因小干扰 RNA (siRNA) 合成与过表达载体构建: 为探究 *FBXW7* 基因在 DON 诱导 IPEC-J2 细胞损伤过程中的调控作用, 本研究针对猪 *FBXW7* 基因编码序列区 (CDS) 的特异性区域, 利用 siRNA 设计工具 (<https://maidesigner.thermofisher.com>) 筛选 3 条特异性 siRNA 序列, 同时设计 1 条无基因靶向性的阴性对照 siRNA, 所有序列委托北京擎科生物技术有限公司合成, 序列信息见表 2。同时委托湖南丰晖生物科技有限公司构建 *FBXW7* 基因过表达 pcD 3.1 重组载体 (*FBXW7*-OE)。以未进行任何转染处理的 IPEC-J2 细胞作为空白对照

(BLANK), 转染阴性对照 siRNA 片段的细胞作为阴性对照 (si-NC), 转染 *FBXW7* 基因 3 条特异性 siRNA 作为转染组 (si-F1、si-F2、si-F3)。

FBXW7 基因过表达效率和干扰效率检测: 将 IPEC-J2 细胞传代培养到 24 孔板中, 当细胞密度达 80% 时进行转染。用 Opti-MEM 无血清培养基分别稀释 0.5 μg *FBXW7*-OE 质粒和 pcD 3.1 空载体质粒, 以及 3 个 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 siRNA 片段和 1 个对照片段, 再用 Opti-MEM 稀释 lip3000 转染试剂, 分别静置 5 min, 将质粒、siRNA 分别与 lip3000 溶液混合, 室温孵育 20 min, 将混合溶液加到细胞孔板中, 6 h 后换液。细胞转染 24 h 后在显微镜下观察, 看到荧光表达后提取细胞总 RNA, 反转录后通过

qPCR 检测不同处理细胞中 *FBXW7* 基因的表达水平。未进行质粒转染的 IPEC-J2 细胞作为空白对照 (NC), 转染 pcDNA3.1 空载体质粒作为空载体对照 (pcD3.1), 转染 *FBXW7*-pcDNA3.1 重组质粒作为 *FBXW7* 基因过表达组 (OE-*FBXW7*)。

FBXW7 基因表达水平对 DON 诱导细胞铁死亡过程的调控作用分析: 为进一步探究 *FBXW7* 基因对 DON 感染 IPEC-J2 细胞的调控作用以及 *FBXW7* 基因与铁死亡通路的关系, 本研究通过 qPCR 检测 DON 感染 *FBXW7* 基因干扰/过表达细胞的铁死亡相关基因溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 基因 (*LP-CAT3*)、核受体辅激活因子 4 基因 (*NCOA4*)、溶质载体家族 7 成员 11 基因 (*SLC7A11*) 和 *GPX4* 的表达水平。以未进行 DON 处理、未进行基因干扰/过表达的 IPEC-J2 细胞作为空白对照 (NC), 仅用 DON 处理的 IPEC-J2 细胞为 DON 处理 (DON), 仅转染 *FBXW7* 基因过表达质粒的细胞为 *FBXW7* 基因过表达处理 (OE-*FBXW7*), 仅转染 *FBXW7* siRNA 的细胞作为 *FBXW7* 基因干扰组 (si-*FBXW7*), 先转染 *FBXW7* 基因过表达质粒, 再用 DON 处理的细胞作为 DON 处理+*FBXW7* 基因过表达处理 (DON+OE), 先转染 *FBXW7* siRNA, 再用 DON 处理的细胞作为 DON 处理+*FBXW7* 干扰处理 (DON+si)。

表 2 siRNA 片段序列信息

Table 2 Information of small interfering RNA (siRNA) sequences

名称	序列
si-F1	F: 5'-GUCUCAGAAUACAAGUA-3'
	R: 5'-UACUUGUAUUAUCUGAGAC-3'
si-F2	F: 5'-GCAAGGACAGUUGGAAGAA-3'
	R: 5'-UUCUCCAACUGUCCUUGC-3'
si-F3	F: 5'-CAGAUGAGAGACAAUAUCA-3'
	R: 5'-UGAUUAUUGUCUCUCAUCUG-3'

1.7 *FBXW7* 蛋白底物预测和底物基因在 DON 暴露 IPEC-J2 细胞中的调控作用

鉴于 *FBXW7* 蛋白是一种重要的 E3 泛素连接酶, 可能通过靶向底物蛋白发挥生物学功能。本研究通过在线软件 UbiBrowser v3 (http://ubibrowser.bio-it.cn/ubibrowser_v3/home/index) 预测 *FBXW7* 蛋白可能靶向的底物, 并通过 qPCR 检测 DON 感染 IPEC-J2 细胞后对底物基因表达水平的影响, 以及 *FBXW7* 基

因过表达和干扰对底物基因表达水平的影响。

1.8 数据统计分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量, 以 *GAPDH* 为内参基因校正样本间 RNA 提取与反转录差异。通过 ImageJ 软件定量分析细胞 ROS 的荧光强度, 利用 SPSS 20 软件的独立样本 *t* 检验比较 NC 和 DON 处理下 ROS 的差异。利用 SPSS 20 软件的单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和一般线性模型 (General Linear Model, GLM) 分析不同处理组细胞中相关基因的差异表达。数据以“平均值±标准差”呈现, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著, 通过 GraphPad Prism 6 软件对所有数据进行可视化处理。

2 结果与分析

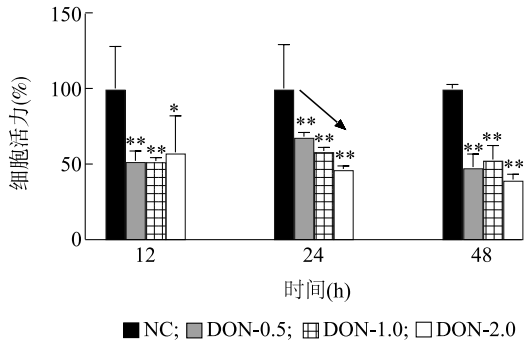
2.1 DON 对 IPEC-J2 细胞的损伤

本研究检测了不同质量浓度 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) DON 处理后 IPEC-J2 细胞在 12 h、24 h、48 h 的活力, 结果 (图 1) 显示, 与 NC 相比, 各质量浓度 DON 处理均能显著或极显著诱导细胞活力下降, 且在各处理时间均显著抑制细胞活力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DON 处理细胞 24 h 时, 细胞活力呈梯度下降趋势, 该条件下细胞状态更适合后续试验操作, 因此本研究选择 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DON 处理 24 h 的细胞样品开展后续试验。显微镜观察结果 (图 2) 显示, 与 NC 相比, DON 处理后的 IPEC-J2 细胞形态异常 (细胞皱缩、死亡脱落), 细胞生长受到抑制, 并且 DON 处理后的 IPEC-J2 细胞 ROS 水平极显著升高 80.35 倍 ($P < 0.01$)。以上结果表明, DON 处理能够诱导 IPEC-J2 细胞损伤, 进而影响细胞活力、细胞结构形态和抗氧化能力。

2.2 *FBXW7* 基因和铁死亡通路基因对 DON 诱导 IPEC-J2 细胞损伤的调控作用

如图 3A 所示, 与 NC 相比, 不同质量浓度 DON 处理后 IPEC-J2 细胞中 *FBXW7* 基因的相对表达量均发生显著或极显著上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且 24 h 时不同质量浓度 DON 处理 *FBXW7* 基因的相对表达量均极显著上升 ($P < 0.01$)。如图 3B 所示, 与 NC 相比, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DON 处理 24 h 后能诱导 IPEC-J2 细胞中铁死亡通路关键激活基因 *LPCAT3* 的转录水平显著升高 ($P < 0.05$), *NCOA4* 的转录水平极显

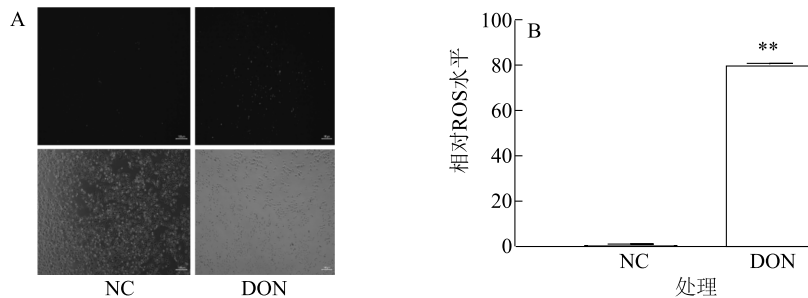
著升高($P<0.01$);铁死亡通路关键抑制基因 *GPX4* 的转录水平显著下降($P<0.05$),*SLC7A11* 的转录水平极显著下降($P<0.01$)。



NC:未添加 DON 的对照;DON-0.5、DON-1.0、DON-2.0 分别代表添加 DON 的质量浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。图柱上 * 表示与 NC 相比差异达显著水平($P<0.05$),图柱上 ** 表示与 NC 相比差异达极显著水平($P<0.01$)。

图 1 不同质量浓度 DON 处理不同时间对 IPEC-J2 细胞活力的影响

Fig.1 Effects of different deoxynivalenol (DON) concentrations on IPEC-J2 cell viability at different time points



A;DON 处理对 IPEC-J2 细胞形态的影响(荧光强度表示细胞中 ROS 水平);B;DON 处理对 IPEC-J2 细胞 ROS 水平的影响。NC:未用 DON 处理的对照组;DON:1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DON 处理 24 h。图柱上 ** 表示 DON 处理与 NC 相比差异达极显著水平($P<0.01$)。

图 2 DON 处理对 IPEC-J2 细胞形态和 ROS 水平的影响

Fig.2 Effects of deoxynivalenol (DON) treatment on cell morphology and reactive oxygen species (ROS) levels in IPEC-J2 cells

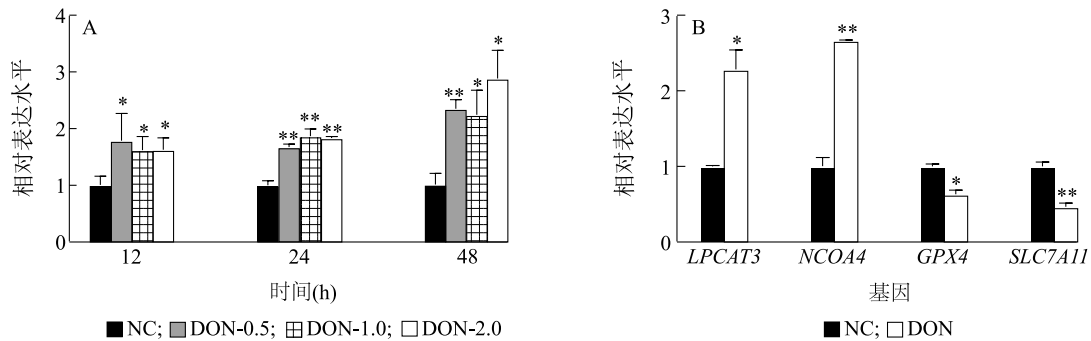
2.4 FBXW7 蛋白底物预测和在 DON 处理导致 IPEC-J2 细胞损伤过程中底物对应编码基因的表达水平

利用在线软件 UbiBrowser v3 预测 FBXW7 蛋白可能靶向的底物,结果如图 5 所示,排名前 20 位的底物对应编码基因包括 *APC2*、*RELA*、*MTOR*、*SPAG6*、*MACROH2A1*、*PRKDC*、*GFER*、*FBXL6*、*SEPTIN12*、*DNMT1*、*NFKB2*、*PER2*、*IL22RA2*、*RCAN1*、*MYC*、*ANKS1A*、*BUB1*、*PI4K2A*、*SPHK2*、*CCNG1* (图 5A)。通过文献检索基因相关功能,对可能与铁死

2.3 FBXW7 基因对铁死亡通路的调控作用

为了进一步探究 *FBXW7* 基因在 DON 处理 IPEC-J2 细胞后的调控作用以及 *FBXW7* 基因与铁死亡通路的关系,本研究通过 RNA 干扰(RNAi)和基因过表达技术对 IPEC-J2 细胞中 *FBXW7* 基因进行干扰和过表达,并检测 DON 处理 IPEC-J2 细胞后相关基因的表达水平。结果(图 4)表明,本研究成功在 IPEC-J2 细胞中对 *FBXW7* 基因进行干扰和过表达,其中 *FBXW7* 基因最高干扰效率达 60%(图 4A),而过表达组 *FBXW7* 基因的表达量是空白对照的 27 倍(图 4B)。DON 处理 IPEC-J2 细胞后,铁死亡激活相关基因 *LPCAT3* 和 *NCOA4* 的表达水平与对照相比极显著上调($P<0.01$),铁死亡抑制相关基因 *SLC7A11* 和 *GPX4* 的表达水平与对照相比极显著下调($P<0.01$)。值得注意的是,*FBXW7* 基因的过表达抑制了 DON 诱导的铁死亡激活基因的表达,并促进了铁死亡抑制基因的表达。相反,*FBXW7* 基因的干扰促进了 DON 诱导的铁死亡激活基因的表达,下调了铁死亡抑制基因的表达(图 4C)。

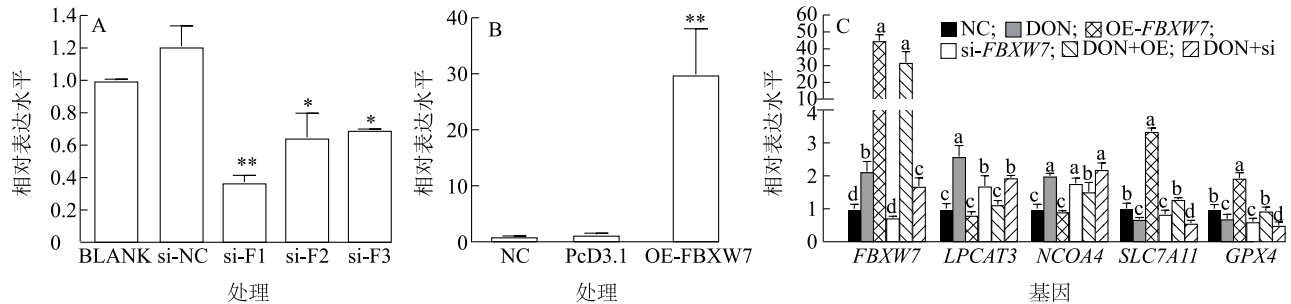
亡有关的 7 个基因(*RELA*、*MYC*、*BUB1*、*MTOR*、*DNMT1*、*NFKB2*、*PER2*)进行 qPCR 分析,结果显示,与 NC 相比,DON 处理 IPEC-J2 细胞后,*RELA*、*MYC*、*BUB1*、*NFKB2*、*PER2* 5 个基因的表达量显著或极显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(图 5B)。*FBXW7* 基因过表达后,*BUB1*、*NFKB2*、*PER2* 3 个基因的表达水平显著或极显著下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$);*FBXW7* 基因干扰后,*BUB1*、*NFKB2* 和 *PER2* 3 个基因的表达水平显著或极显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(图 5C)。值得关注的是,*PER2* 基因在 *FBXW7* 过表达



A:不同质量浓度 DON 处理 IPEC-J2 细胞不同时间后 *FBXW7* 基因的转录水平 (NC、DON-0.5、DON-1.0、DON-2.0 见图 1 注); B: DON 处理 IPEC-J2 细胞后铁死亡相关基因的转录水平 (NC、DON 见图 2 注)。图柱上 * 表示与 NC 相比差异达显著水平 ($P < 0.05$), 图柱上 ** 表示与 NC 相比差异达极显著水平 ($P < 0.01$)。

图 3 DON 处理 IPEC-J2 细胞后 *FBXW7* 和铁死亡相关基因的表达水平

Fig.3 *FBXW7* and ferroptosis-related gene expression in DON-treated IPEC-J2 cells



A 为 *FBXW7* 基因干扰效率检测结果 (BLANK:空白对照, si-NC:转染无干扰片段 siRNA 阴性对照, si-F1、si-F2、si-F3: *FBXW7* 基因的 3 条特异性 siRNA 转染组); B 为 *FBXW7* 基因过表达效率检测结果 (NC:空白对照, pcD3.1:空载体对照, OE-*FBXW7*: *FBXW7* 基因过表达); C 为 *FBXW7* 基因过表达和干扰对 DON 处理 IPEC-J2 细胞后铁死亡相关基因表达的影响 (NC:正常对照, DON: DON 处理, OE-*FBXW7*: *FBXW7* 基因过表达, si-*FBXW7*: *FBXW7* 基因干扰, DON+OE: DON 处理+*FBXW7* 基因过表达, DON+si: DON 处理+*FBXW7* 基因干扰)。图 A 中图柱上 * 表示与 BLANK 相比差异达显著水平 ($P < 0.05$), ** 表示与 BLANK 相比差异达极显著水平 ($P < 0.01$); 图 B 中图柱上 ** 表示与 NC 相比差异达极显著水平 ($P < 0.01$); 图 C 中相同基因图柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 4 *FBXW7* 基因过表达和干扰对 DON 处理 IPEC-J2 细胞后铁死亡相关基因表达的影响

Fig.4 Effects of *FBXW7* overexpression and knockdown on expression levels of ferroptosis-related genes in DON-treated IPEC-J2 cells

时的下调幅度及 *FBXW7* 干扰时的上调幅度均最大,提示 *FBXW7* 蛋白作为一种 E3 泛素连接酶蛋白,可能通过靶向底物蛋白对应编码基因 *PER2* 调控 DON 诱导的 IPEC-J2 细胞铁死亡过程。

3 讨论

本研究通过测定不同质量浓度 DON 在不同培养时间条件下 IPEC-J2 细胞的活力,结果发现,与对照 (NC) 相比,各质量浓度 DON 处理均能诱导细胞活力显著或极显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),这与 Xu 等^[15] 和 Cai 等^[16] 的研究结果一致。尤其是 DON 质量浓度为 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、处理时间为 24 h 时, IPEC-J2 细胞活力下降趋势更符合后续试验操作,

显微镜下能观察到 DON 处理后的 IPEC-J2 细胞形态异常,细胞增殖受到抑制,并且活性氧 (ROS) 水平极显著升高 ($P < 0.01$)。上述结果提示, DON 能够诱导 IPEC-J2 细胞损伤,其作用可能涉及对细胞活力、细胞结构形态和抗氧化能力的调控。

与 NC 相比, $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ DON 处理 24 h 后能诱导 IPEC-J2 细胞中铁死亡通路关键激活基因 *LPCAT3* 和 *NCOA4* 的转录水平显著或极显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),同时铁死亡通路关键抑制基因 *GPX4* 和 *SLC7A11* 的转录水平显著或极显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 *LPCAT3* 基因编码的溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 主要参与磷脂的重塑过程,可将多不饱和脂肪酸嵌入细胞膜磷脂结构,促进铁死

度及 *FBXW7* 基因干扰时的上调幅度均为最大,提示 *PER2* 蛋白与 *FBXW7* 蛋白的靶向关系最强。*PER2* 基因是昼夜节律基因家族成员,在调节昼夜节律和其他昼夜节律基因的表达方面很重要,已有研究结果证实 *PER2* 基因的敲除能够抑制细胞铁死亡^[28]。综上,本研究结果提示 *FBXW7* 蛋白作为一种 E3 泛素连接酶,可能通过靶向底物蛋白 *PER2* 的降解进而抑制 DON 诱导的 IPEC-J2 细胞铁死亡,但具体机制仍有待进一步探讨。

4 结论

本研究结果表明,脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)能够诱导猪肠上皮细胞铁死亡,并且 *FBXW7* 基因过表达抑制了 DON 诱导的铁死亡激活基因的表达,促进了铁死亡抑制基因的表达,最终缓解了 DON 诱导的猪肠上皮细胞铁死亡。另外,本研究通过生物信息学预测结合 qPCR 验证推断,*FBXW7* 蛋白可能通过靶向底物蛋白 *PER2* 的降解进而抑制细胞铁死亡,但具体机制有待进一步探讨。综上,本研究初步揭示了 *FBXW7* 基因在 DON 诱导的猪肠上皮细胞铁死亡过程中的调控作用,过表达 *FBXW7* 基因可能有利于缓解 DON 诱导的猪肠上皮细胞铁死亡,为提升猪对 DON 的抗性提供了潜在调控靶点。本研究结果不仅丰富了 DON 诱导猪肠上皮细胞损伤的分子机制,更为利用抗病育种策略制订 DON 预防和控制方案提供了理论依据。

参考文献:

- [1] FAN J P, ZHANG Y H, ZUO M Y, et al. Novel mechanism by which extracellular vesicles derived from *Lactobacillus murinus* alleviates deoxynivalenol-induced intestinal barrier disruption [J]. *Environment International*, 2024, 185: 108525.
- [2] HOOFT J M, BUREAU D P. Deoxynivalenol; mechanisms of action and its effects on various terrestrial and aquatic species [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 157: 112616.
- [3] 张薇,牛军龙,郭永鹏,等. 呕吐毒素对猪肠道屏障的影响及其营养调控研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2022, 34(10): 6249-6256.
- [4] SUMARAH M W. The deoxynivalenol challenge [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(31): 9619-9624.
- [5] LIU M, ZHANG L, CHU X H, et al. Effects of deoxynivalenol on the porcine growth performance and intestinal microbiota and potential remediation by a modified HSCAS binder [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 141: 111373.
- [6] KANG T H, KANG K S, LEE S I. Deoxynivalenol induces apoptosis via FOXO3a-signaling pathway in small-intestinal cells in pig [J]. *Toxics*, 2022, 10(9): 535.
- [7] 戴超辉,李辉,赵为民,等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对猪毒害作用及毒理机制研究进展 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(1): 24-35.
- [8] DIXON S J, OLZMANN J A. The cell biology of ferroptosis [J]. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2024, 25(6): 424-442.
- [9] LIU M, ZHANG L, MO Y X, et al. Ferroptosis is involved in deoxynivalenol-induced intestinal damage in pigs [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2023, 14(1): 29.
- [10] YE Z, ZHUO Q F, HU Q S, et al. FBW7-NRA41-SCD1 axis synchronously regulates apoptosis and ferroptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Redox Biology*, 2021, 38: 101807.
- [11] ZHANG Z L, GUO M, LI Y J, et al. RNA-binding protein ZFP36/TTP protects against ferroptosis by regulating autophagy signaling pathway in hepatic stellate cells [J]. *Autophagy*, 2020, 16(8): 1482-1505.
- [12] JIMÉNEZ-IZQUIERDO R, MORRUGARES R, SUANES-COBOS L, et al. *FBXW7* tumor suppressor regulation by dual specificity tyrosine-regulated kinase 2 [J]. *Cell Death & Disease*, 2023, 14(3): 202.
- [13] LIU D, CHENG X L, WU H L, et al. CREG1 attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting the ferroptosis of cardiomyocytes [J]. *Redox Biology*, 2024, 75: 103293.
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [15] XU Y F, XIE Y X, WU Z C, et al. Protective effects of melatonin on deoxynivalenol-induced oxidative stress and autophagy in IPEC-J2 cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2023, 177: 113803.
- [16] CAI Z H, CHEN F J, WANG Y S, et al. Lycopene maintains mitochondrial homeostasis to counteract the enterotoxicity of deoxynivalenol [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(11): 1958.
- [17] CUI J T, WANG Y K, TIAN X T, et al. *LPCAT3* is transcriptionally regulated by *YAP/ZEB/EP300* and collaborates with *ACSL4* and *YAP* to determine ferroptosis sensitivity [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2023, 39(7/8/9): 491-511.
- [18] LIU L P, CHE B, ZHANG W M, et al. Mechanistic insights into the role of *FAT10* in modulating *NCOA4*-mediated ferroptosis in pancreatic acinar cells during acute pancreatitis [J]. *Cell Death & Disease*, 2025, 16(1): 385.
- [19] XUE Q, YAN D, CHEN X, et al. Copper-dependent autophagic degradation of *GPX4* drives ferroptosis [J]. *Autophagy*, 2023, 19(7): 1982-1996.
- [20] WANG Z J, SHEN N, WANG Z A, et al. *TRIM3* facilitates ferroptosis in non-small cell lung cancer through promoting *SLC7A11/αCT* K11-linked ubiquitination and degradation [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2024, 31(1): 53-64.
- [21] ZHANG B B, WANG E Z, ZHOU S J, et al. *RELA*-mediated up-

- regulation of *LINC03047* promotes ferroptosis in silica-induced pulmonary fibrosis via *SLC39A14*[J]. *Free Radical Biology and Medicine*,2024,223:250-262.
- [22] VOKSHI B H, DAVIDSON G, SEDEHI N T P, et al. *SMARCB1* regulates a *TFCP2LI-MYC* transcriptional switch promoting renal medullary carcinoma transformation and ferroptosis resistance[J]. *Nature Communications*,2023,14(1):3034.
- [23] WANG W M, ZHOU X, KONG L M, et al. *BUB1* promotes gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by inhibiting ferroptosis[J]. *Cancers*,2024,16(8):1540.
- [24] YI J M, ZHU J J, WU J, et al. Oncogenic activation of *PI3K-AKT-mTOR* signaling suppresses ferroptosis via *SREBP*-mediated lipogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2020,117(49):31189-31197.
- [25] YAN L, GENG Q, CAO Z W, et al. Insights into *DNMT1* and programmed cell death in diseases[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*,2023,168:115753.
- [26] LAN Y F, YANG T, YUE Q, et al. *IRP1* mediated ferroptosis reverses temozolomide resistance in glioblastoma via affecting *LCN2/FPN1* signaling axis depended on *NFKB2*[J]. *Iscience*,2023,26(8):107377.
- [27] HE R Y, ZHANG S J, YU J L, et al. *Per1/Per2* knockout affects spleen immune function in elderly mice via inducing spleen lymphocyte ferroptosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*,2022,23(21):12962.
- [28] SHU Y Y, GAO W K, CHU H K, et al. Attenuation by time-restricted feeding of high-fat and high-fructose diet-Induced NASH in mice is related to *per2* and ferroptosis[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*,2022,2022:8063897.

(责任编辑:黄克玲)