



## 草鱼体内溶血对肝脏氧化损伤的机制

秦真东, 卢志杰, 杨敏璇, 黄 垚, 詹凡玢, 李亚男,  
施 斐, 陈少君, 李 军, 林 鑫\*

(仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,  
广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东广州 510225)

**摘要:** 以草鱼为研究对象, 系统研究了溶血对肝脏的损伤机制, 以揭示血红蛋白对机体的损伤作用。首先在体内注射血红蛋白, 通过苏木精-伊红染色 (H.E) 发现注射血红蛋白组的肝脏组织中坏死细胞明显增多, 普鲁士蓝染色揭示肝脏中存在大量的铁沉积, 进一步的实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测结果显示, 注射的血红蛋白激活了铁代谢相关基因的表达。为进一步探究体内出血对肝脏的影响, 实验通过体内注射苯胍模拟体内出血, H.E 和普鲁士蓝染色结果表明, 大量的溶血导致肝脏细胞坏死和铁的沉积增加, 通过检测肝脏中血红蛋白和铁含量发现, 苯胍组中, 肝脏组织血红蛋白和铁含量随着时间延长而显著增加, 而铁含量的增加同时激活了肝脏组织中铁代谢相关基因的表达。其次, 实验检测了注射苯胍后肝脏组织中炎症因子的表达情况, qRT-PCR 结果显示, 高剂量的血红蛋白激活了多种细胞因子的基因表达, 如促炎因子  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$  和  $IL-6$ , 抑炎因子  $IL-10$  以及趋化因子  $IL-4$  和  $IL-8$  等。为进一步探究高氧化活性的血红蛋白对肝脏组织的氧化损伤作用, 实验检测了肝脏组织中丙二醛 (MDA)、脂质过氧化物 (LPO) 以及  $\beta$ -半乳糖苷酶的含量, 检测结果表明, 鱼体内的出血显著增加了肝脏氧化损伤作用, 同时, qRT-PCR 和酶活性检测结果揭示, 血红蛋白的氧化损伤作用促进了肝脏组织细胞凋亡的发生。最后, 实验检测了肝脏组织中抗氧化酶的表达情况, 结果显示, 体内的出血显著激活了肝脏组织中的抗氧化系统。研究表明, 鱼体内大量出血释放的高氧化活性的血红蛋白显著激活了肝脏组织炎症和氧化损伤的发生, 促进了肝脏组织中的细胞凋亡, 同时也激活了机体内的抗氧化系统。

**关键词:** 草鱼; 血红蛋白; 氧化损伤; 溶血

**中图分类号:** S 941.4

**文献标志码:** A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国重要的淡水经济养殖鱼类, 2018 年中国渔业统计年鉴数据显示, 我国草鱼养殖产量达 534.56 万 t, 其养殖产量长期居淡水养殖之首<sup>[1]</sup>。随着养殖规模和密度的不断增加, 水产养殖环境的不断恶

化, 特别是多种病原性疾病的大量暴发, 细菌性疾病如嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 和病毒性疾病如草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 等均导致鱼体大量出血, 均对草鱼养殖产业造成严重影响<sup>[2-3]</sup>。

收稿日期: 2021-02-26 修回日期: 2021-03-19

资助项目: 国家自然科学基金 (31902409, 31872606, 31572657, 31602190, U1701233)

第一作者: 秦真东 (照片), 从事水产动物基础免疫研究, E-mail: qinzhendongsc@163.com

通信作者: 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn



病原性疾病可导致鱼体出血而释放大量的血红蛋白进入组织中, 在正常生理情况下血红蛋白被保护在细胞内而不被氧化<sup>[4-5]</sup>; 游离的血红蛋白快速发生自氧化, 由 Hb-Fe II 氧化成 Hb-Fe III 和 HbFeIV 并产生大量的超氧自由基 ( $\text{HO}_2\cdot$ ) 和衍生产物  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  进一步激活髓过氧化物酶 (pseudo-peroxidase, POX), 催化 Hb-Fe III 氧化成 Hb-Fe IV, 同时催化更多的自由基产生, 如超氧阴离子 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、羟基自由基以及低盐酸<sup>[6-9]</sup>。血红蛋白通过自氧化产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可以有效杀伤入侵的病原微生物<sup>[9-12]</sup>。但是过量的溶血释放高氧化活性的血红蛋白可以诱导氧化应激和组织损伤<sup>[9-10]</sup>。在血管研究模型中, 血红蛋白氧化产生大量的自由基并促使脂质、蛋白质、线粒体、核酸等过氧化导致血管强烈收缩, 动脉管壁出现大量胶原沉淀以及广泛性的凝固性坏死, 加剧动脉粥样硬化<sup>[13-14]</sup>。其次, 在肾脏研究模型中, 肾脏暴露在血红蛋白中, 高氧化活性的血红蛋白通过细胞内吞受体 (megalin-cubilin receptor) 进入足细胞等细胞中, 从而导致细胞内 Hb 分解代谢增加, 过氧化应激以及内源性凋亡途径激活等导致肾小球硬化或者空泡化以及肾小管急性坏死, 最终导致大量的血红蛋白或者红细胞进入尿液, 加剧急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 或者慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD)<sup>[13-16]</sup>, 同时血红蛋白可以通过激活 NF- $\kappa$ B 等途径激活细胞因子, 使肾脏损伤处于持续状态<sup>[14, 17]</sup>。肾复发性和大量血管内溶血导致肾脏 Hb“过载”是多种遗传病和免疫疾病的标致性特征, 包括镰刀状细胞病 (sickle cell disease, SCD)、非典型溶血性尿毒症综合症 (atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS) 以及阵发性睡眠血红蛋白尿 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) 等<sup>[15, 18]</sup>。血红蛋白的高氧化活性和致炎性对其他组织也会造成多种氧化损伤, 比如造成小鼠脾脏肿胀坏死, 肝脏的代谢紊乱和坏死<sup>[5, 19]</sup>。大量研究表明, 高氧化活性的血红蛋白大量或者长期存在于组织中将会对机体造成严重损伤, 因此, 血红蛋白也是极其危险的因素。

目前有关血红蛋白对组织氧化损伤的研究主要集中在哺乳动物中, 有关鱼类血红蛋白对组织中的影响相关研究还十分缺乏。在本团队

的前期研究中发现, 草鱼红细胞具有广泛的抗菌活性, 并且其抗菌活性主要通过血红蛋白自氧化产生的 ROS 体现, 而 ROS 往往是一把双刃剑, 在病原入侵时通过杀伤病原菌体现有益作用, 而过量的 ROS 会对机体本身造成氧化损伤<sup>[12]</sup>。由病原性疾病引起鱼体大量出血而导致的血红蛋白释放对鱼体组织的影响尚未有详细研究。因此, 本研究以草鱼为实验对象, 通过注射血红蛋白和苯胂模拟其体内出血, 检测过量血红蛋白对肝脏造成的氧化损伤作用机制进行探究。研究结果将为鱼类血液免疫学提供基础资料, 同时也为鱼类健康养殖提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

实验用草鱼 ( $100\pm 10$ ) g 来自广东省广州市某渔场, 运回实验室暂养于 1 000 L 循环曝气水缸中, 保持溶解氧充足, 水质干净。每天分别于早上和晚上进行投喂和换水, 实验鱼在实验室适应 2 周后开展实验。

### 1.2 血红蛋白的分离纯化

血红蛋白的分离纯化按照本实验前期方法进行<sup>[12]</sup>。使用含有肝素钠的注射器从鱼体尾柄静脉采血, 采集的血液通过梯度 percoll 液的方法分离纯化红细胞, 将纯化后的红细胞进行反复冻融后, 4 °C 条件下, 10 000×g 离心 30 min, 收集上清液。通过 Bradford 方法测定纯化后血红蛋白的浓度, 15% SDS-PAGE 检测血红蛋白纯度。

### 1.3 血红蛋白和苯胂注射实验

实验鱼随机分为 3 组, 血红蛋白组腹腔注射 2 mL 浓度为 5 mg/mL 的血红蛋白, 苯胂组腹腔注射 2 mL 苯胂 (注射量为 25 mg/kg), 对照组腹腔注射等体积的无菌生理盐水。分别在注射后 0、12、24、48 和 96 h 采集肝脏, 采集的样品一部分固定于 4% 的多聚甲醛中, 并送谷歌生物科技有限公司进行 H.E 和普鲁士蓝染色; 一部分样品分装 RNAiso Plus 试剂放进液氮, 用于后续 RNA 提取和 qRT-PCR 检测; 一部分样品直接冻存于液氮中, 用于后续酶活性相关检测实验。

### 1.4 RNA 提取和 cDNA 合成

采集肝脏的总 RNA 提取按照 RNAiso Plus

试剂盒说明书进行提取, 提取的总 RNA 浓度及纯度用超微量分光光度计 (NanoDrop2000, 美国) 和琼脂糖凝胶电泳进行检测, 然后使用带有 gDNA wiper 的 HiScript<sup>®</sup> Q Select RT SuperMix for qPCR 试剂盒 (Vazyme) 合成 cDNA, 在 -20 °C 保存备用。

### 1.5 相关基因的 qRT-PCR 分析

通过 qRT-PCR 方法检测肝脏组织中铁代谢及相关基因的表达情况, qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu$ L: 水 6  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, SYBR 酶 10  $\mu$ L, cDNA 模板 3  $\mu$ L, 引物序列情况见表 1。qRT-PCR 反应程序参照 UltraSTBR Mixture (Vazyme 公司, 南京) 试剂说明书, 反应在 qTOWER3 touch3 荧光定量 PCR 仪中进行, 其中免疫基因及  $\beta$ -actin 内参基因均进行 3 次重复, 反应程序: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 并采集荧光信号, 通过熔解曲线验证引物特异性, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的相对表达量。

### 1.6 肝脏组织中血红蛋白含量检测

为检测注射苯胂后肝脏组织中血红蛋白的含量变化情况, 实验按照<sup>[12]</sup> 方法进行检测。具体方法: 将采集的肝脏组织通过组织破碎仪充分破碎后, 4 °C 条件下, 8 000 $\times$ g 离心 30 min, 吸取 200  $\mu$ L 上清液至 96 孔板中, 利用酶标仪检测 404 nm 处吸光值。

### 1.7 肝脏组织中 Fe 含量检测

鱼体内的大量出血释放高氧化活性的血红蛋白进入组织, 氧化型血红蛋白容易释放血红素, 血红素在血红素加氧酶作用下释放游离 Fe 进入组织中。为进一步检测肝脏组织中 Fe 的含量, 本研究利用组织铁检测试剂盒 (索莱宝科技有限公司, 中国) 进行检测。具体检测方法按照试剂盒说明书进行。

### 1.8 组织氧化损伤相关检测

为进一步探究鱼体大量出血后, 细胞毒性血红蛋白对肝脏组织的损伤作用。实验测定了注射苯胂后肝脏组织中丙二醛 (MDA)、脂质过氧化物 (LPO)、 $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -GAL) 和 caspase 3 的酶活性。所有检测试剂盒均购置于索莱宝生物科技有限公司, 测定方法按照试剂盒说明书进行。

表 1 实验所用引物

引物名 primers	序列 sequence
<i>GcTf</i> -RT-F	AGTTACTATGTCGTGGCGGTTG
<i>GcTf</i> -RT-R	ATCCAGCGTTGCGGTTC
<i>GcTfR1</i> -RT-F	GATGATGAAATGGAGGCTAACG
<i>GcTfR1</i> -RT-R	GGCAATGACAAATCCGCAG
<i>Gcferritin</i> -RT-F	TCCTGTCTTCGTGCGTGT
<i>Gcferritin</i> -RT-R	ACCTTCAGTCCGTCCTCGTG
<i>GcHepcidin</i> -RT-F	TGAAACACCACAGCAGAACGA
<i>GcHepcidin</i> -RT-R	CAGCCTTTGTTACGACAGCAGTT
<i>GcFPN1</i> -RT-F	ACTCTTCGCTGGCGTCAATTG
<i>GcFPN1</i> -RT-R	TGGATTTGGTGCAGGATGA
<i>GcDMT1</i> -RT-F	TTCTCATTGACGAACAGCCAG
<i>GcDMT1</i> -RT-R	CAAAGGAAAAGACCCACGGAT
<i>GcCAT</i> -RT-F	GCCATCTCCAACGGCAACTT
<i>GcCAT</i> -RT-R	CCAGACCTTAGTCAAATCAAACGG
<i>GcSOD</i> -RT-F	TCCGCACCTTCAACCCCTTACAG
<i>GcSOD</i> -RT-R	ACTTTCCTCATTGCCTCCCTT
<i>GcGSH</i> -RT-F	AGGAGTTCGAGATGTTGGATTG
<i>GcGSH</i> -RT-R	GTCTCCATTCACATCCACCTTCT
<i>GcIL6</i> -RT-F	ACAGCAGAATGGGGGAGTTATC
<i>GcIL6</i> -RT-R	CTCGCAGAGTCTTGACATCCTT
<i>GcTNF<math>\alpha</math></i> -RT-F	GCTGCTGTCTGCTTCACGC
<i>GcTNF<math>\alpha</math></i> -RT-R	AGCCTGGTCTGGTTCACCTT
<i>Gccaspase3</i> -RT-F	GCATCATCATCAACAACAAA
<i>Gccaspase3</i> -RT-R	GACTGAGCATCACACAAACA
<i>Gccaspase8</i> -RT-F	GTTTCTGTGCATGGACCTGATTC
<i>Gccaspase8</i> -RT-R	CAGCTCTCTTCCACTTCTCTT
<i>Gccaspase9</i> -RT-F	GTGGGATAGATGACCAGATGGAC
<i>Gccaspase9</i> -RT-R	AGACATAGCCTGGAAAGGTTGAG
<i>GcIL-1<math>\beta</math></i> -F	GTGTCTGGCCATTTCCAAGAGTA
<i>GcIL-1<math>\beta</math></i> -R	GGTGTGAGAGTTTTCAGTGACCT
<i>GcIL8</i> -F	GAGTCTTAGAGGTCTGGGTG
<i>GcIL8</i> -R	CAGGTTAAAAATATTGTGCAT
$\beta$ -actin-F	ACCCACACCGTGCCCATCTA
$\beta$ -actin-R	CGGACAATTTCTCTTTCCGGCTG
<i>GcIL-10</i> -F	CCCTTTGAGTTTGCCACCA
<i>GcIL-10</i> -R	CAGCCATCATCCAATCCAC
<i>GcIL-4</i> -F	AATAGGGATCAACGAGAA
<i>GcIL-4</i> -R	TGAATGGTTATGTAGGGT
<i>GcHap</i> -F	CTCTCTGTGGCTGTGCTGCT
<i>GcHap</i> -R	TCAGTACCACGCGCTGCGCT



## 1.9 数据分析

实验数据均以平均值±标准差 (mean±SD) 表示 ( $n=6$ ), 显著性差异分析采用 SPSS 26.0 软件的单因素方差分析 (One-Way ANOVA),  $P<0.05$  为差异显著,  $P<0.01$  为差异极显著。最终结果用 Graphpad prism 6 软件进行作图。

## 2 结果

### 2.1 体内注射血红蛋白对肝脏的影响

为初步探究体内出血后对肝脏组织的影响, 本实验在鱼体中直接注射分离纯化后的血红蛋白。通过 H.E 染色发现, 随着注射时间的延长, 肝脏组织中出现明显的细胞空泡化 (黑色箭头), 并且有白细胞聚集出现 (图版)。为了观察肝脏中铁的累积情况, 通过普鲁士蓝染色发现, 注射血红蛋白后, 肝脏组织中出现了蓝色聚集, 表明肝脏组织中的铁含量显著增加 (图版)。

### 2.2 体内注射血红蛋白激活肝脏中铁代谢相关基因的表达

由于体内注射后增加了肝脏中铁含量的积累, 为了探究是否会激活肝脏中铁代谢相关基因的表达。本实验通过荧光定量 PCR 方法检测了铁代谢相关基因的表达。结果发现, 注射血红蛋白后, 二价金属离子转运蛋白 1 的表达量 (DMT1) 在注射 12 h 后极显著增加 ( $P<0.01$ ), 但是在 96 h 后回到正常水平 (图 1-a), 转铁蛋白的表达量在 12 和 96 h 显著下调 ( $P<0.05$ , 图 1-b); 转铁蛋白受体在注射 12 h 显著增加, 而在 24 h 极显著下调 ( $P<0.01$ ), 其他时间点变化不显著 (图 1-c); 铁蛋白的表达水平在 12 h 极显著下调

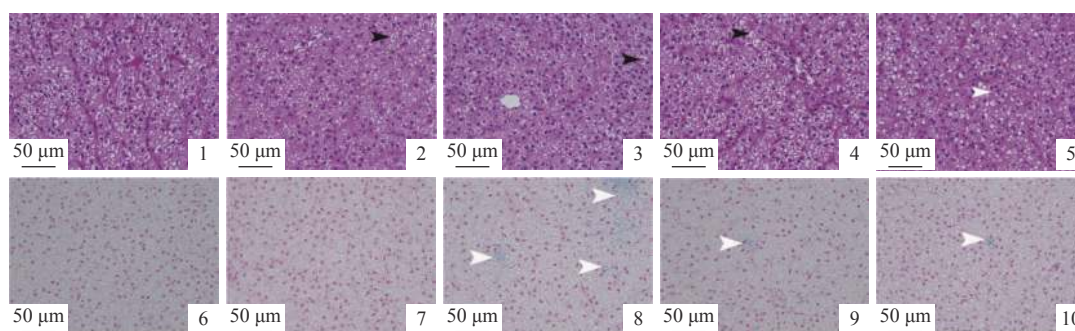
( $P<0.01$ , 图 1-d); 膜铁转运蛋白 1 (FPN1) 的表达量在 12 h 极显著上调, 96 h 极显著下降 ( $P<0.01$ , 图 1-e), 铁调素 (图 1-f) 和触珠蛋白 (图 1-g) 的表达量在注射后的所有时间点均显著上调表达。

### 2.3 体内出血对肝脏的影响

为进一步研究体内出血对肝脏的影响, 实验通过注射苯胍来模拟体内出血。研究发现, 注射苯胍后, 肝脏组织中出现明显的细胞空泡化和细胞肿胀 (黑色箭头), 随着时间延长而增多, 同时, 注射 24 后, 可以明显看到视野中出现大量的细胞核碎片, 并在 48 和 96 h 看到大量小空泡 (红色箭头); 肝脏中的铁的积累也随着注射时间延长而增加 (图 2-a)。实验也检测了注射苯胍后, 肝脏组织中血红蛋白和铁离子含量的变化情况, 结果显示, 注射苯胍后, 肝脏中游离的血红蛋白极显著增加 ( $P<0.01$ , 图 2-a), 同时铁离子的含量也随之极显著增加 ( $P<0.01$ , 图 2-b)。

### 2.4 体内出血激活肝脏中铁代谢相关基因的表达

体内的出血释放出大量的血红蛋白进入肝脏组织中, 同时释放出大量的铁离子沉积在肝脏中。为了探究体内出血是否会激活肝脏中铁代谢相关基因的表达。本研究通过荧光定量 PCR 方法检测了铁代谢相关基因的表达。结果发现, DMT1 在注射 12 和 24 h 后的表达量极显著增加 ( $P<0.01$ ), 但是在 48 h 后回到正常水平 (图 3-a), 转铁蛋白的表达量在 12、24 和 96 h 显著上调 (图 3-b); 转铁蛋白受体的表达量在注射 12 和 24 h 极显著增加 ( $P<0.01$ ), 而在 48 h 后逐渐恢复到正常水平 (图 3-c); 铁蛋白的表达水平在



图版 体内注射血红蛋白后对肝脏的影响

1~5. H.E 染色, 分别表示 0、12、24、48 和 96 h; 6~10. 普鲁士蓝染色, 分别表示 0、12、24、48 和 96 h, 下同

#### Plate Effects of *in vivo* hemoglobin injection on the liver

1-5. H.E stain, represents 0, 12, 24, 48 and 96 h, respectively; 6-10. Prussian blue, represents 0, 12, 24, 48 and 96 h, respectively, the same below

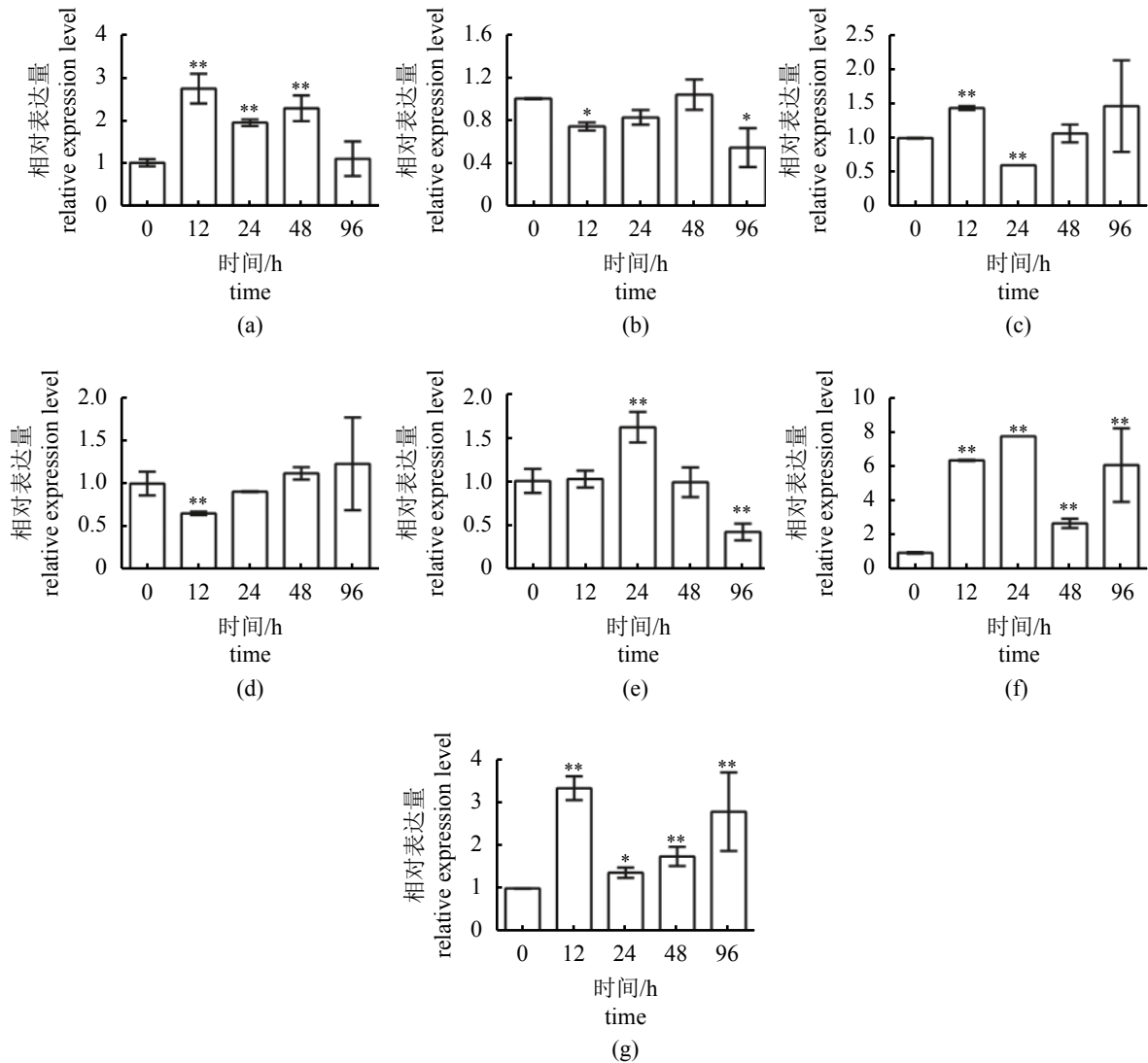


图 1 注射血红蛋白后肝脏组织中铁代谢相关基因的表达情况

(a) 二价金属离子转运蛋白 1, (b) 铁转运蛋白, (c) 铁转运蛋白受体 1, (d) 铁蛋白, (e) 膜铁转运蛋白 1, (f) 铁调素, (g) 触珠蛋白, 图 3 同。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 下同

Fig. 1 Expression of iron metabolism-related genes in liver after hemoglobin injection

(a) *DMT1*, (b) *Tf*, (c) *TfR1*, (d) *Ferritin*, (e) *FPN1*, (f) *hepcidin*, (g) *Hap*, the same as Fig.3. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , the same below

12~48 h 极显著下调 ( $P < 0.01$ , 图 3-d); 膜铁转运蛋白 1 (FPN1) 的表达量在 12 和 24 h 极显著下调 ( $P < 0.01$ ), 48 h 恢复到正常水平 (图 3-e), 铁调素的表达量除了在 48 h 表达量无差异外, 其他均上调表达 ( $P < 0.01$ , 图 3-f), 触珠蛋白 (图 3-g) 的表达量在注射后 12 h 极显著上调表达 ( $P < 0.01$ )。

## 2.5 体内出血激活肝脏组织中炎症因子的表达

为进一步探究体内出血对肝脏组织的影响, 本研究检测了注射苯胂后肝脏组织中炎症因子的表达情况。研究结果显示, 注射苯胂后可以显著激活 *TNF- $\alpha$*  (图 4-a), *IL-1 $\beta$*  (图 4-b) 和 *IL-6* (图 4-e)

促炎因子的表达, 其中 *TNF- $\alpha$*  随着时间延长而增加 (图 4-a), *IL-1 $\beta$*  (图 4-b) 和 *IL-6* (图 4-e) 在注射 12 h 后达到最高峰, 之后逐渐降低。同时, 体内出血也显著激活了抑因子 *IL-10* (图 4-f) 和趋化因子 *IL-4* (图 4-c) 和 *IL-8* (图 4-d) 的表达水平。

## 2.6 体内出血引起肝脏氧化损伤和细胞凋亡

过量高氧化活性的血红蛋白往往容易对机体造成氧化损伤, 为了研究草鱼体内出血后释放的血红蛋白对肝脏的影响, 本研究测定了注射苯胂后肝脏组织中丙二醛和脂质过氧化物的含量。结果显示, 注射苯胂组肝脏组织中的丙

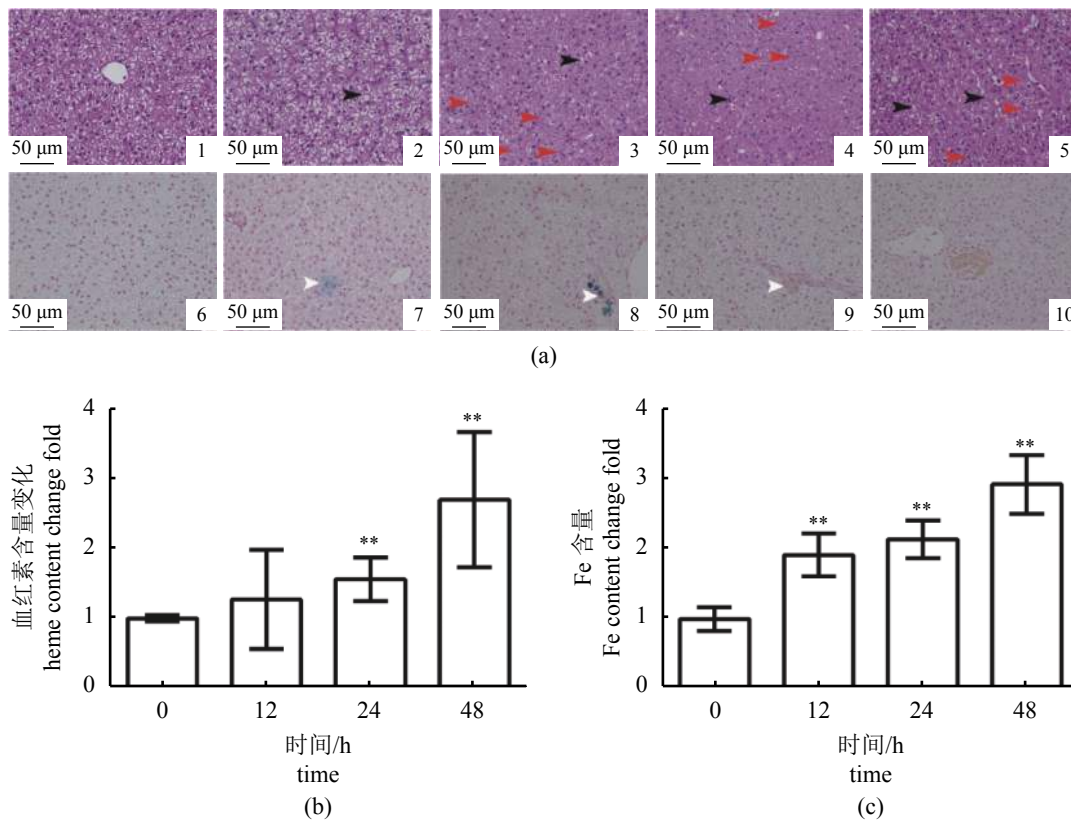


图 2 体内注射苯胂后对肝脏组织的影响

(a) H.E 染色和普鲁士蓝染色, (b) 血红蛋白含量变化情况, (c) 铁离子含量变化情况

Fig. 2 Effects of *in vivo* hydrazinobenzene injection on the liver

(a) H.E and Prussian blue stain, (b) heme content detection, (c) Fe content detection

二醛和脂质过氧化物的含量显著增加(图 5-a, b)。同时检测了肝脏中 $\beta$ -半乳糖苷酶的含量情况, 结果表明, 体内的出血极显著增加了肝脏中 $\beta$ -半乳糖苷酶的含量( $P < 0.01$ , 图 5-c)。上述结果表明, 过量的血红蛋白容易对肝脏组织造成氧化损伤, 而氧化损伤的结果容易导致组织细胞凋亡的增加, 因此本研究也检测了凋亡相关基因的表达情况, 结果显示肝脏中过量的血红蛋白激活了 caspase8、caspase9 和 caspase3 的表达水平(图 5-d~f)。为进一步探究体内出血对肝脏凋亡的影响, 本研究也检测了 caspase3 的酶活性, 检测结果显示, 注射苯胂后, 肝脏中 caspase3 的酶活性极显著增加( $P < 0.01$ , 图 5-g)。

### 2.7 体内出血激活肝脏抗氧化系统

由外界因素导致机体氧化损伤的同时, 机体往往通过激活自身的抗氧化系统以清除氧化物。为了探究体内出血是否也会激活肝脏中的抗氧化系统, 实验检测了肝脏中的抗氧化酶,

包括超氧化物歧化酶、谷胱甘肽酶和过氧化氢酶, 检测结果显示, 体内的出血均显著上调了 SOD(图 6-a)、GSH(图 6-b)和 CAT(图 6-c)的表达水平。本研究进一步表明, 体内出血释放的高氧化活性的血红蛋白可以激活肝脏组织中的抗氧化系统, 以维持机体微环境平衡。

### 3 讨论

红细胞(red blood cells, RBCs)结构简单, 没有类似其他细胞的细胞器, 哺乳动物成熟红细胞没有细胞核, 过去一直被广泛认为仅仅是运送气体的工具。随着研究不断深入, 陆续发现红细胞可以广泛参与到先天免疫调控中, 比如参与机体补体系统的调控、细菌的吞噬和黏附等<sup>[12, 20-22]</sup>。由于分类地位相对较低, 鱼类红细胞存在细胞核, 主要负责鱼体各组织气体运输, 本团队前期研究中发现, 草鱼体内红细胞存在一些细胞器, 并且可以参与抗菌免疫<sup>[23]</sup>。而血红蛋白(hemoglobin, Hb)是红细胞呼吸作用的结构

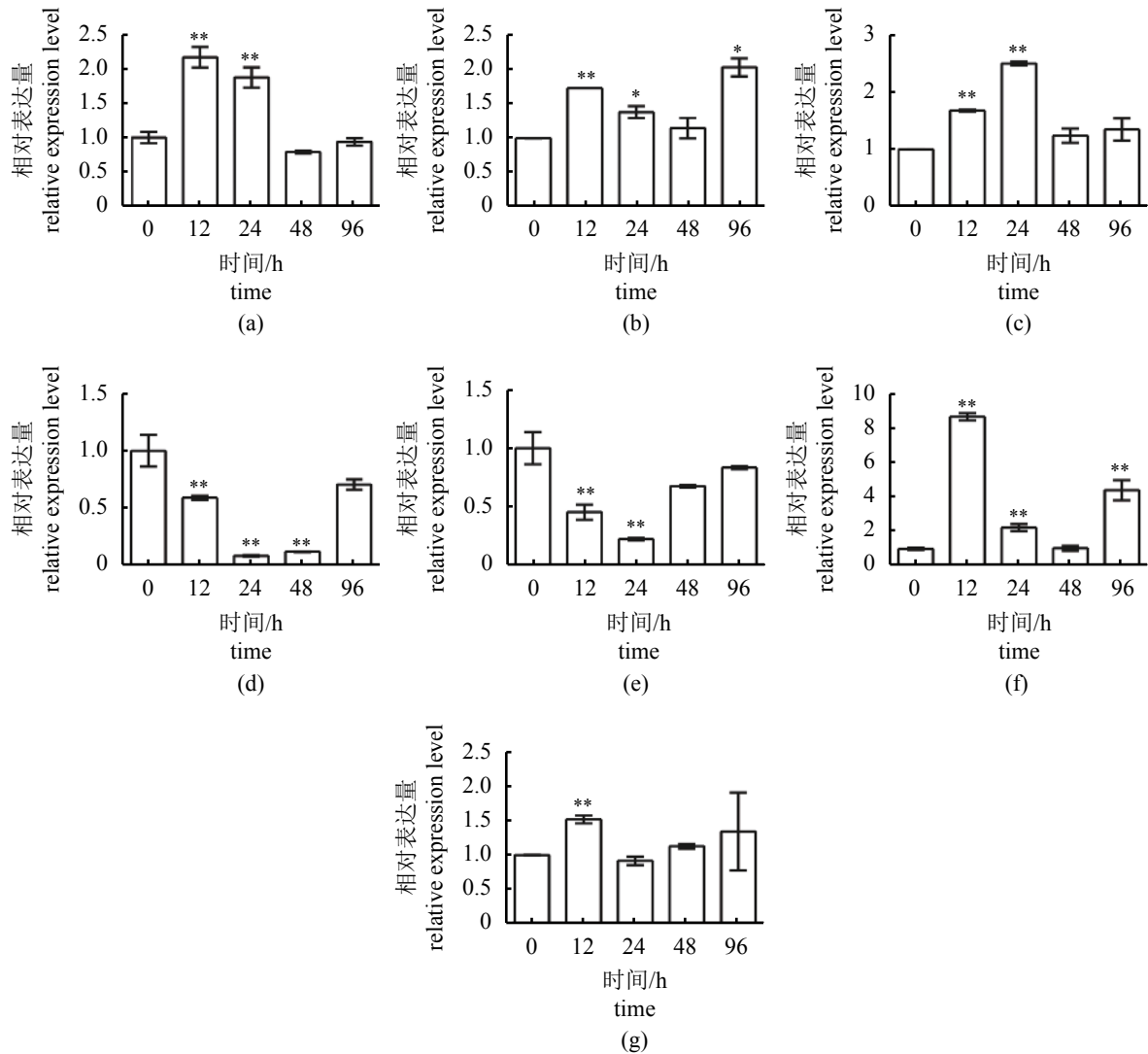


图3 注射苯肼后肝脏组织中铁代谢相关基因的表达情况

Fig. 3 Expression of iron metabolism-related genes in liver after hydrazinobenzene injection

基础,是由2条 $\alpha$ 样珠蛋白多肽链(141氨基酸)和2条 $\beta$ 样珠蛋白多肽链(146氨基酸)构成的四聚体结构( $\alpha_2\beta_2$ ),每个亚基包含一个珠蛋白和血红素<sup>[24-25]</sup>。血红蛋白占红细胞干重的96%以上,由于红细胞中存在大量抗氧化酶,比如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽和过氧化物酶等,因此,在正常生理情况下被保护在细胞内而不被氧化<sup>[4-5]</sup>。当少量的红细胞溶血释放的血红蛋白进入血液中,首先通过触珠蛋白和血红素结合蛋白参与清除作用<sup>[26-27]</sup>,在急性和慢性血管内溶血过程中,结合珠蛋白和血红素结合蛋白复合物通过它们的同源受体消耗,促进了许多病理生理学结果,包括血红蛋白二聚体的外渗<sup>[28-29]</sup>和通过产生ROS的氧化应激,引起细

胞损伤和细胞毒性<sup>[30-32]</sup>,以及由于无消耗导致的血管收缩<sup>[13]</sup>。已有研究表明,血红蛋白在氧化状态容易游离血红素,血红素容易直接参与氧化损伤作用,同时也可以激活宿主细胞的炎症反应来产生二次损伤,此外,游离的血红素在血红素加氧酶的作用下释放游离铁离子,而铁离子的沉积也会导致组织细胞氧化损伤和炎症激活<sup>[26,33-34]</sup>。目前,已经发现多种疾病与血红蛋白氧化损伤作用直接相关,比如镰刀状细胞病(sickle cell disease, SCD)、非典型溶血性尿毒症综合征(atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS)以及阵发性睡眠血红蛋白尿(paroxysmal nocturnal Hemoglobinuria, PNH)等<sup>[15,18]</sup>。同样,多种细菌或者病毒等引起的疾病均可以导致大量的鱼类出



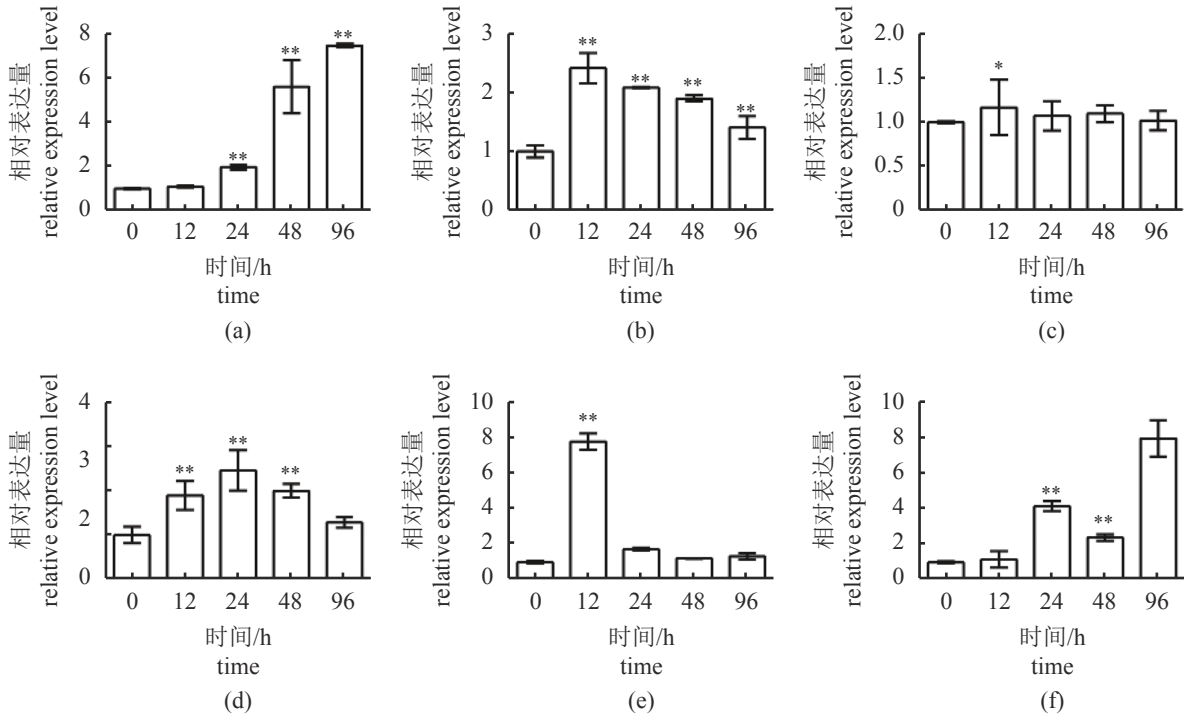


图 4 体内出血对肝脏组织炎症因子的表达情况

Fig. 4 Hemolysis activating the expression of inflammatory cytokines in liver

(a) *TNF-α*, (b) *IL-1β*, (c) *IL-4*, (d) *IL-8*, (e) *IL-6*, (f) *IL-10*

血, 比如嗜水气单胞菌或者草鱼呼肠孤病毒等, 然而目前有关鱼类血红蛋白对机体的损伤作用尚不清楚。

为了模拟由病原导致的出血, 本实验直接在体内注射血红蛋白或者通过注射苯胂方式模拟体内出血。首先通过 H.E 和普鲁士蓝染色检测肝脏组织的病理变化及铁积累情况, H.E 结果显示, 无论是注射血红蛋白还是苯胂, 肝脏细胞明显出现干细胞肿胀、坏死和空泡化现象。普鲁士蓝染色结果显示, 蓝色开始时显著增加, 48 h 后显著减少, 主要的原因可能是肝脏中的吞噬系统吞噬过多的血红蛋白后, 在血红素加氧酶 1(HO-1) 的作用下水解为 CO、胆绿素和铁离子, 铁离子可以储存在铁蛋白中。该研究结果与人类肾脏模型研究中的结果相一致<sup>[13,27]</sup>。其次, 通过测定肝脏中血红蛋白和铁离子的含量发现, 肝脏中的游离血红蛋白和游离铁的含量均显著增加, 与之前普鲁士蓝染色结果相一致, 本研究结果与 Back 等<sup>[13]</sup> 以及 Schaer 等<sup>[27]</sup> 研究结果相一致。

血红素加氧酶 1 是清除血红蛋白毒性的第三道防线, 其将血红素分解成胆绿素、CO 和铁

离子, 一方面铁离子可以被储存在铁蛋白中, 另外一方面铁离子可以被细胞再次利用。然而, 细胞内过量的铁也存在一定的危害作用。铁可以催化细胞内的过氧化氢, 通过芬顿效应产生大量的羟基自由基而形成细胞内的氧化应激, 从而导致细胞对辐射的敏感性增强、突变、脂质过氧化、多糖类解聚和酶类失活, 进而造成细胞退化和死亡<sup>[14,35]</sup>。组织中的铁离子重吸收和释放与细胞中的铁代谢相关基因有关, 因此, 为了验证草鱼出血释放的血红蛋白是否激活肝脏中的铁代谢相关基因, 本研究通过荧光定量 PCR 方法进行检测, 结果显示, 无论是注射血红蛋白或者苯胂均可以导致铁代谢基因相关表达发生显著变化, 结果表明过量的血红蛋白可以激活草鱼肝脏组织中铁代谢相关基因的表达, 与草鱼呼肠孤病毒感染导致大量出血而激活的铁代谢相关基因的研究相一致<sup>[36]</sup>。

部分研究已经表明, 血红素通过激活巨噬细胞中 TLR4 和 NF-κB, 从而激活下游的炎症因子释放。也有研究表明, 血红素通过激活巨噬细胞中的 NLRP3 炎症小体, 诱导 IL-1 分泌, 从而启动炎症级联反应<sup>[37,5]</sup>。此外, 有研究发现,



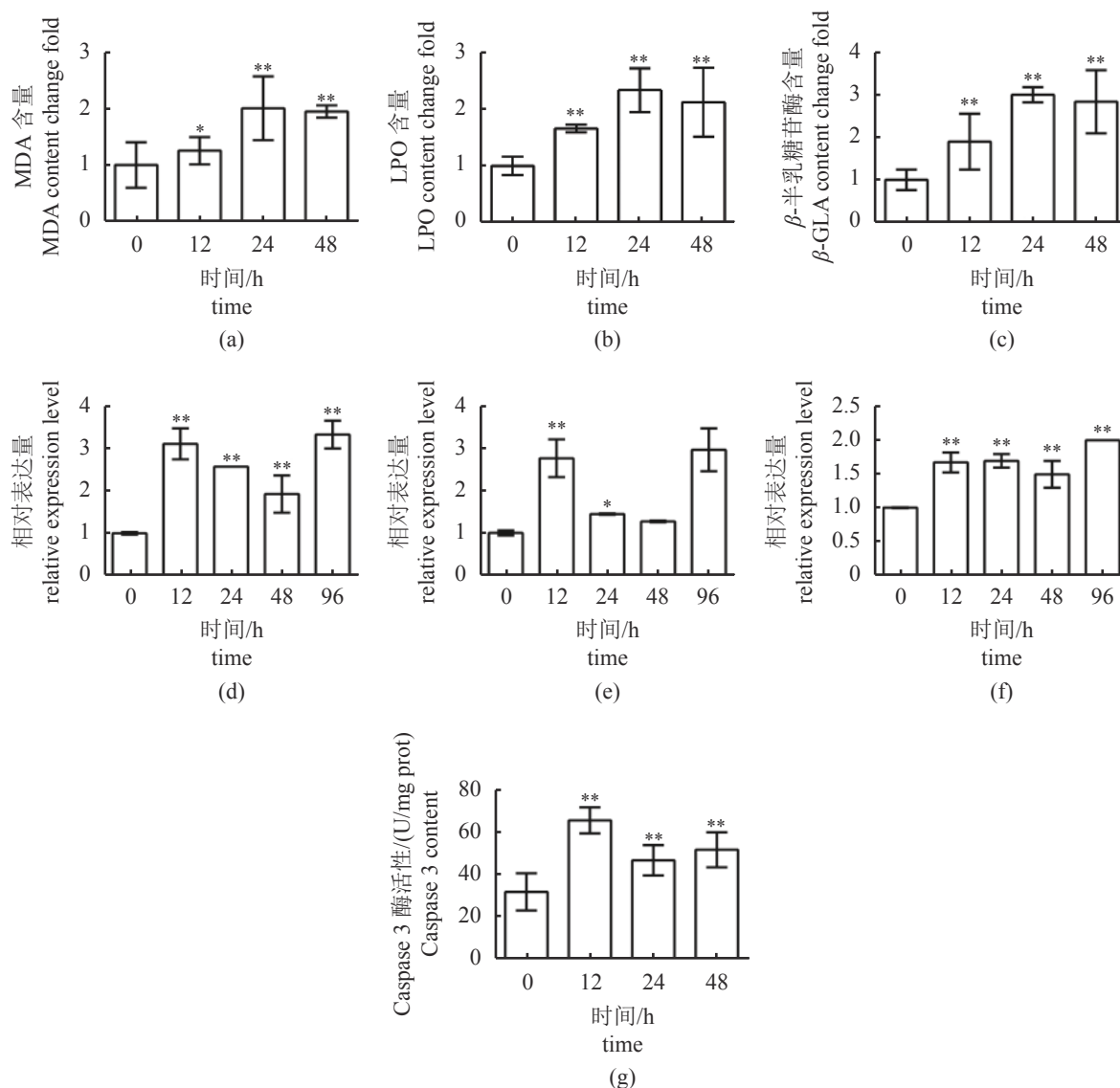


图 5 草鱼体内出血引起肝脏组织氧化损伤和细胞凋亡

(d) *caspase8* 表达水平, (e) *caspase9* 表达水平, (f) *caspase3* 表达水平, (g) Caspase3 酶活性

Fig. 5 Hemolysis causing oxidative damage and apoptosis of liver in *C. idella*

(d) expression of *caspase8*, (e) expression of *caspase9*, (f) expression of *caspase3*, (g) Caspase3 enzyme activity detection

血红蛋白可以通过 PI3K 通路激活下游炎症因子的表达。越来越多的研究表明, 血红蛋白可以广泛激活多种炎症因子的表达<sup>[38-41]</sup>。当机体炎症长期存在, 也会对组织造成二次损伤作用, 为了探究草鱼出血后炎症因子相关基因的表达情况, 本研究检测了注射苯胍后肝脏中多种炎症相关基因的表达, 研究表明出血可以显著激活肝脏组织中促炎因子 (*TNF- $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$*  和 *IL-6*), 抑炎因子 *IL-10* 和趋化因子 (*IL-4* 和 *IL-8*) 的表达水平。本研究结果与大部分哺乳动物研究模型的结果相一致, 说明鱼体大量出血释放的血红蛋

白也可以激活机体炎症相关基因的表达。

过量的血红蛋白存在于组织中, 由于血红素和铁的氧化性质, 容易发生芬顿反应, 触发了氧化还原反应级联反应, 可导致广泛的脂质过氧化和细胞损伤, 特别是在肾脏中, 这也是血红蛋白毒性作用的主要体现<sup>[26]</sup>。因此, 本研究同样检测了草鱼出血后对肝脏组织的氧化损伤的影响, 结果显示, 注射苯胍组中的 MDA、LPO 以及  $\beta$ -GAL 含量均显著增加, 为维持组织中微环境平衡, 往往通过抗氧化酶清除由过氧化产生的氧化损伤, 结果显示, 草鱼体内出血, 显

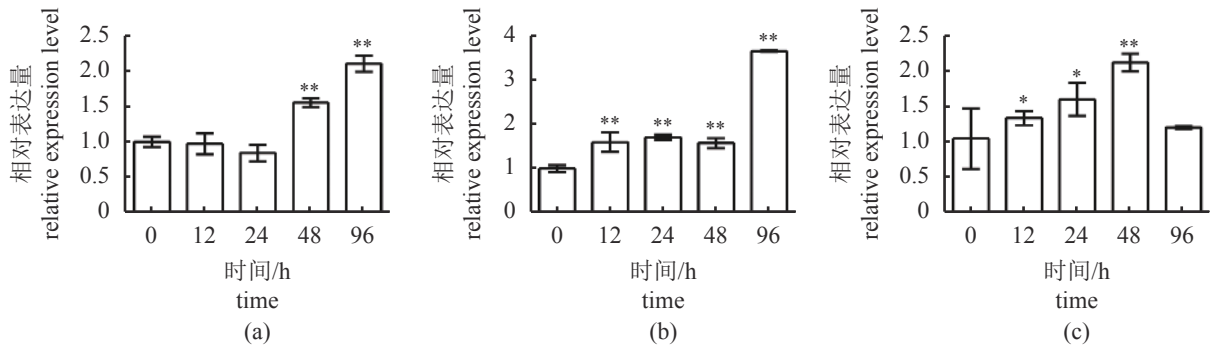


图 6 草鱼体内出血激活了肝脏组织中的抗氧化系统

(a) SOD 表达水平, (b) GSH, (c) CAT

Fig. 6 Hemolysis in *C. idella* activating the antioxidant system in liver

(a) SOD, (b) GSH, (c) CAT

著激活了肝脏中抗氧化酶 SOD、GSH 和 CAT 的表达水平, 本研究结果与前期研究结果相一致<sup>[41-43]</sup>。研究表明, 氧化损伤和炎症长期存在容易导致组织细胞凋亡发生, 为了进一步探究草鱼出血后, 血红蛋白是否会导致肝脏细胞凋亡发生, 本研究通过定量 PCR 和测定酶活性检测了肝脏组织的凋亡情况, 结果显示, 草鱼出血后, 肝脏组织凋亡相关基因如 *caspase8*、*caspase9* 和 *caspase3* 的表达水平显著增加, 同时 Caspase3 酶活水平也显著上调, 结果表明, 草鱼体内出血可以通过氧化损伤而导致肝脏组织细胞凋亡发生<sup>[14-15, 18, 44]</sup>。

综上所述, 以草鱼为实验对象, 首次发现草鱼体内出血后释放的血红蛋白可以对肝脏组织造成氧化损伤, 同时激活多种炎症因子相关基因的表达水平并随之促进肝脏细胞凋亡发生, 肝脏组织也可以通过激活抗氧化酶系统以减轻损伤。实验结果丰富了鱼类血液免疫的基础理论, 并为草鱼养殖产业的健康发展提供一定的参考。

#### 参考文献 (References):

- [1] Shen Y B, Wang L, Fu J J, *et al.* Population structure, demographic history and local adaptation of the grass carp[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 467.
- [2] Rao Y L, Su J G. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp[J]. *Journal of Immunology Research*, 2015, 2015: 670437.
- [3] Xu X Y, Shen Y B, Fu J J, *et al.* Characterization of

*MMP-9* gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): an *Aeromonas hydrophila*-inducible factor in grass carp immune system[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 801-807.

- [4] Jeney V, Eaton J W, Balla G, *et al.* Natural history of the bruise: formation, elimination, and biological effects of oxidized hemoglobin[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 2013: 703571.
- [5] Nyakundi B B, Tóth A, Balogh E, *et al.* Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 $\beta$  production upon intravascular hemolysis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2019, 1865(2): 464-475.
- [6] Puppo A, Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent?[J]. *Biochemical Journal*, 1988, 249(1): 185-190.
- [7] Giulivi C, Davies K J. A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(32): 19453-19460.
- [8] Kawano T, Pinontoan R, Hosoya H, *et al.* Monoamine-dependent production of reactive oxygen species catalyzed by pseudoperoxidase activity of human hemoglobin[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, 66(6): 1224-1232.
- [9] Du R J, Ho B, Ding J L. Rapid reprogramming of haemoglobin structure-function exposes multiple dual-antimicrobial potencies[J]. *The EMBO Journal*, 2010, 29(3): 632-42.

- [10] Jiang N X, Tan N S, Ho B, *et al.* Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy[J]. *Nature Immunology*, 2007, 8(10): 1114-1122.
- [11] Bahl N, Du R J, Winarsih I, *et al.* Delineation of lipopolysaccharide (LPS)-binding sites on hemoglobin: from in silico predictions to biophysical characterization[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(43): 37793-37803.
- [12] Qin Z D, Vijayaraman S B, Lin H Z, *et al.* Antibacterial activity of erythrocyte from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with phagocytosis and reactive oxygen species generation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 331-340.
- [13] Baek J H, D'Agnillo F, Vallelian F, *et al.* Hemoglobin-driven pathophysiology is an *in vivo* consequence of the red blood cell storage lesion that can be attenuated in guinea pigs by haptoglobin therapy[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(4): 1444-1458.
- [14] Moreno J A, Martin-Cleary C, Gutiérrez E, *et al.* AKI associated with macroscopic glomerular hematuria: clinical and pathophysiologic consequences[J]. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2012, 7(1): 175-184.
- [15] Rubio-Navarro A, Sanchez-Niño M D, Guerrero-Hue M, *et al.* Podocytes are new cellular targets of haemoglobin-mediated renal damage[J]. *The Journal of Pathology*, 2018, 244(3): 296-310.
- [16] Naik R P, Derebail V K, Grams M E, *et al.* Association of sickle cell trait with chronic kidney disease and albuminuria in African Americans[J]. *JAMA*, 2014, 312(20): 2115-2125.
- [17] Tracz M J, Alam J, Nath K A. Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007, 18(2): 414-420.
- [18] Ballarín J, Arce Y, Balcells R T, *et al.* Acute renal failure associated to paroxysmal nocturnal haemoglobinuria leads to intratubular haemosiderin accumulation and CD163 expression[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2011, 26(10): 3408-3411.
- [19] Deuel J W, Schaer C A, Boretti F S, *et al.* Hemoglobinuria-related acute kidney injury is driven by intrarenal oxidative reactions triggering a heme toxicity response[J]. *Cell Death & Disease*, 2016, 7(1): e2064.
- [20] Minasyan H. Erythrocyte and blood antibacterial defense[J]. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2014, 4(2): 138-43.
- [21] Yin W, Cui J Y, Jiang J B, *et al.* The immune adherence receptor CR1-like existed on porcine erythrocytes membrane[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13290.
- [22] Sun B, Sun Y Y, Li X P, *et al.* Particle and bacteria uptake by Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) red blood cells: size dependence and pathway specificity[J]. *Tissue and Cell*, 2019, 61: 79-88.
- [23] Yang M X, Lu Z J, Li F L, *et al.* *Escherichia coli* induced ferroptosis in red blood cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 112: 159-167.
- [24] Yuan Y, Tam M F, Simplaceanu V, *et al.* New look at hemoglobin allostery[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(4): 1702-1724.
- [25] Coates C J, Decker H. Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(2): 293-317.
- [26] Van Avondt K, Nur E, Zeerleder S. Mechanisms of haemolysis-induced kidney injury[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2019, 15(11): 671-692.
- [27] Schaer D J, Buehler P W, Alayash A I, *et al.* Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins[J]. *Blood*, 2013, 121(8): 1276-1284.
- [28] Matheson B, Razynska A, Kwansa H, *et al.* Appearance of dissociable and cross-linked hemoglobins in the renal hilar lymph[J]. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2000, 135(6): 459-464.
- [29] Nakai K, Sakuma I, Ohta T, *et al.* Permeability characteristics of hemoglobin derivatives across cultured endothelial cell monolayers[J]. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1998, 132(4): 313-319.
- [30] Boutaud O, Moore K P, Reeder B J, *et al.* Acetaminophen inhibits hemoprotein-catalyzed lipid peroxidation and attenuates rhabdomyolysis-induced renal failure[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(6):

- 2699-2704.
- [31] Vercellotti G M, Balla G, Balla J, *et al.* Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium[J]. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 1994, 22(2): 207-213.
- [32] Tolosano E, Fagoonee S, Morello N, *et al.* Heme scavenging and the other facets of hemopexin[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010, 12(2): 305-320.
- [33] Jeney V, Balla J, Yachie A, *et al.* Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme[J]. *Blood*, 2002, 100(3): 879-887.
- [34] Lipiski M, Deuel J W, Baek J H, *et al.* Human Hp1-1 and Hp2-2 phenotype-specific haptoglobin therapeutics are both effective *in vitro* and in guinea pigs to attenuate hemoglobin toxicity[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 19(14): 1619-1633.
- [35] Walter P B, Knutson M D, Paler-Martinez A, *et al.* Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(4): 2264-2269.
- [36] Wan Q Y, Liao Z W, Rao Y L, *et al.* Transferrin receptor 1-associated iron accumulation and oxidative stress provides a way for grass carp to fight against reovirus infection[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(23): 5857.
- [37] Figueiredo R T, Fernandez P L, Mourao-Sa D S, *et al.* Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(28): 20221-20229.
- [38] Sankar S B, Donegan R K, Shah K J, *et al.* Heme and hemoglobin suppress amyloid  $\beta$ -mediated inflammatory activation of mouse astrocytes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(29): 11358-11373.
- [39] Thomas A M, Gerogianni A, McAdam M B, *et al.* Complement component C5 and TLR molecule CD14 mediate heme-induced thromboinflammation in human blood[J]. *The Journal of Immunology*, 2019, 203(6): 1571-1578.
- [40] Graça-Souza A V, Arruda M A B, De Freitas M S, *et al.* Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes[J]. *Blood*, 2002, 99(11): 4160-4165.
- [41] Fang W X, Chi Z X, Li W G, *et al.* Comparative study on the toxic mechanisms of medical nanosilver and silver ions on the antioxidant system of erythrocytes: from the aspects of antioxidant enzyme activities and molecular interaction mechanisms[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2019, 17(1): 66.
- [42] Longeville S, Stingaciu L R. Hemoglobin diffusion and the dynamics of oxygen capture by red blood cells[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10448.
- [43] Du R J, Winarsih I, Ho B, *et al.* Lipid-free apolipoprotein A-I exerts an antioxidative role against cell-free hemoglobin[J]. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, 2012, 1(1): 33-48.
- [44] Jain S, Bose A, Bastia B, *et al.* Oxidized hemoglobin is antigenic and immunogenic in lupus[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 732.



## Mechanism of liver oxidative damage induced by hemolysis in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

QIN Zhendong, LU Zhijie, YANG Minxuan, HUANG Yao, ZHAN Fanbin, LI Yanan, SHI Fei, CHEN Shaojun, LI Jun, LIN Li\*

(Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** A variety of bacterial or viral diseases usually cause massive hemolysis in fish, and release a large amount of cytotoxic hemoglobin into the tissues. However, the damage mechanism of hemolysis to fish tissues is still not well known. Therefore, to explore the damage mechanism of hemolysis in fish to the tissues, *Ctenopharyngodon idella* was used to systematically study the damage mechanism of hemolysis to the liver. Firstly, the hemoglobin was injected into the *C. idella*, hematoxylin eosin (H.E) staining assay results showed that injection of hemoglobin caused the dead cells to increase obviously in liver, and Prussian blue staining revealed that more iron deposited in liver. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) detection results showed that the injection of hemoglobin activated the expression of iron metabolism related genes. In order to further explore the damage of hemolysis to the liver, we injected phenylhydrazine into *C. idella*, H.E and Prussian blue staining results showed that the hemolysis caused the liver cell necrosis and iron deposits to increase, and the content of hemoglobin and iron in the liver all significantly increased with time. Furthermore, the increase of iron also activated the expression of iron metabolism related genes. Then, we detected the expression of inflammatory cytokines in liver after the injection of phenylhydrazine, and qRT-PCR results showed that high dose of hemoglobin activated the expression of various cytokines, such as pro-inflammatory cytokines *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  and *IL-6*, anti-inflammatory cytokines *IL-10*, and chemokines *IL-4* and *IL-8*. In order to further explore the oxidation damage of hemoglobin in liver, we tested the content of malondialdehyde (MDA) and lipid peroxide (LPO) and  $\beta$ -galactose glucoside enzyme in liver, and the results showed that the hemolysis significantly increased liver oxidative damage effect, at the same time, the qRT-PCR and enzyme activity test results revealed that the oxidative damage of hemolysis induced the occurrence of liver cell apoptosis. Finally, we also examined the expression of antioxidant enzymes in liver, and the results showed that *in vivo* hemolysis significantly activated the antioxidant system in liver. In conclusion, the present study revealed that massive hemorrhage in fish released the high oxidative activity of hemoglobin which activated the occurrence of inflammation, oxidative damage and apoptosis in liver, and simultaneously up-regulated the expression of antioxidant system. The results of this study will enrich the blood immunology of fish, and also provide theoretical reference for the healthy culture of *C. idella*.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; oxidative damage; hemoglobin; hemolysis

**Corresponding author:** LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

**Funding project:** National Natural Science Foundation of China (31902409, 31872606, 31572657, 31602190, U1701233)