



血红蛋白介导草鱼肾细胞凋亡的机制

秦真东, 杨敏璇, 卢志杰, 施 斐, 李亚男,
詹凡玢, 万全元, 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: 为系统研究草鱼血红蛋白对草鱼肾(CIK)细胞的损伤机制, 实验探究了血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞后的生长情况; 还检测了血红蛋白和血红素刺激对 CIK 细胞内铁代谢相关基因的表达情况。为进一步检测血红蛋白对 CIK 细胞的毒性作用, 实验还检测了血红蛋白刺激 CIK 细胞后, 细胞内铁离子和活性氧(ROS)的变化情况; 以及 CIK 细胞受血红蛋白和血红素刺激后, 细胞凋亡相关基因的表达情况。结果显示, 血红蛋白和血红素明显抑制了 CIK 细胞的正常生长。血红蛋白和血红素的刺激不同程度地上调了铁代谢相关基因的表达。通过检测被血红蛋白和血红素刺激后的 CIK 细胞炎症和抗氧化酶相关基因的表达情况, 发现血红蛋白和血红素可以通过 NF- κ B 途径激活下游炎症因子的表达, 如促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6, 抑炎因子 IL-10 以及趋化因子 IL-4 和 IL-8 等, 同时也激活了超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等抗氧化酶基因的表达水平。血红蛋白的刺激显著增加了细胞内铁离子和 ROS 的含量, 血红蛋白和血红素都在不同程度上显著激活了 CIK 细胞凋亡相关基因的表达水平。研究表明, 高氧化活性的血红蛋白可以激活细胞内铁代谢和炎症因子相关基因的表达, 同时增加细胞内铁离子和 ROS 水平导致 CIK 细胞凋亡基因的高表达。本研究结果丰富了鱼类血液免疫基础理论, 同时也为水产健康养殖提供新的参考。

关键词: 草鱼; 血红蛋白; 氧化损伤; 凋亡

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

近年来, 水产品已成为人们营养结构的重要组成部分, 水产养殖业的迅速发展, 造就了大量的就业机会, 给人们带来了巨大的经济收益^[1-2]。草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国重要的淡水经济养殖鱼类, 据 2020 渔业统计年鉴显示, 2019 年我国草鱼产量达到 550 多万 t, 相较于 2018 增长 0.52%, 其养殖产量长期居我国淡水养殖鱼类之首^[3]。但随着养殖密度和规模的不断扩

大, 养殖水域环境的持续恶化, 大大增加了其疾病的暴发风险, 特别是多种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)病等的频繁感染暴发, 给草鱼养殖产业带来严重威胁, 造成大量的草鱼死亡和巨大的经济损失^[4-6]。

血红蛋白(Hb)是红细胞呼吸作用的结构基础, 是由 2 条 α 样珠蛋白多肽链(141 个氨基酸)和 2

收稿日期: 2021-05-05 修回日期: 2021-05-24

资助项目: 国家自然科学基金(31902409, 31872606); 广州市科技计划(201804010096)

第一作者: 秦真东(照片), 从事水产动物免疫学研究, E-mail: qinzhendongsc@163.com

通信作者: 李军, 从事水产动物免疫学研究, E-mail: jli@lssu.edu;

林鑫, 从事水产动物免疫学研究, E-mail: linli@zhku.edu.cn



条 β 样珠蛋白多肽链(146个氨基酸)构成的四聚体结构($\alpha 2\beta 2$), 每个亚基包含1个珠蛋白和血红素^[7]。由于组织损伤、外伤或溶血性细菌感染而导致红细胞破碎并向血浆中释放血红蛋白^[8-9]。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Hb-Fe^{IV}, 并产生大量的超氧自由基($\cdot O_2^-$)和衍生产物H₂O₂, 血红蛋白通过自氧化产生大量的活性氧(ROS), 这些细菌毒性的ROS可以有效地杀伤入侵的病原微生物^[10-12]。有研究表明, 血红蛋白可以通过TLR4(Toll-like receptor 4)、NF- κ B(nuclear factor κ B)或者PI3K/Akt(phosphoinositide 3-kinase)等信号通路激活下游多种炎症因子表达并促进吞噬细胞的吞噬活性, 从而促进机体的先天免疫反应^[13-15]。虽然血红蛋白通过多种触发因素, 可以在感染期间引发局部抗菌活性, 但是过量的血管内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^[10-11]。高剂量的血红蛋白可以加剧动脉粥样硬化、急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)或者慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)、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^[16-19]。目前, 有关血红蛋白对机体造成的损伤作用相关研究主要集中在哺乳动物, 在水产动物上的研究十分缺乏。

细菌或病毒病暴发, 均可导致草鱼出血病发生, 大量血红蛋白进入组织中, 高剂量的血红蛋白对组织的毒性作用尚不清楚。因此, 本研究以草鱼肾(*Ctenopharyngodon idella* kidney, CIK)细胞为对象, 深入阐明血红蛋白对CIK细胞的毒性作用, 本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

体重为(100±10)g的实验鱼来自广东省广州市渔场, 暂养于实验室1000L循环曝气水缸中, 每天分别于早上和晚上进行投喂和换水, 保持水质良好, 溶解氧充足, 实验鱼在水缸中适应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参考文献^[20]进行。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(34%+51%)的方法分离纯化红细胞, 先在10mL离心管中加入3mL 51% percoll液, 然后缓慢加入3mL 34% percoll液, 保证分层清晰, 随后缓慢加入采集的血液3mL, 在4℃条件下400×g离心30min, 收集底层细胞, 磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤3次后即获得红细胞。将纯化后的红细胞反复冻融后, 4℃条件下, 10000×g离心30min, 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 血红蛋白对CIK细胞生长的影响

将状态良好的CIK细胞传代至12孔板中, 一共设置5个组, 2个血红蛋白处理组(5和10mg/mL)和2个血红素处理组(10和25 μ mol/L), 无菌PSB组为对照组, 每个处理组设置3个重复孔。待细胞密度到达80%~90%时, 分别于孵育后12和24h在光学显微镜下观察细胞形态的变化。观察结束后, 吸尽各孔中的培养基, 每孔细胞中加入1mL TRIzol试剂中, 储存于-80℃冰箱备用。

1.4 RNA提取和cDNA合成

采集各组CIK细胞的总RNA, 提取按照RNAiso Plus试剂盒说明书进行, 采用超微量分光光度计(NanoDrop 2000, 美国)和琼脂糖凝胶电泳方法对提取的总RNA进行浓度和纯度检测。然后使用带有gDNA wiper的HIScript[®] Q Select RT SuperMix for qPCR试剂盒(Vazyme, 南京)合成cDNA, 合成好的cDNA置于-20℃保存备用。

1.5 相关基因的荧光定量PCR(qRT-PCR)分析

通过qRT-PCR方法检测各组CIK细胞中铁代谢及炎症相关基因的表达情况, qRT-PCR反应体系为20 μ L, 包括水6 μ L、上下游引物各0.5 μ L、SYBR酶10 μ L、cDNA模板3 μ L, 引物序列情况见表1。qRT-PCR反应程序参照UltraSTBR Mixture(Vazyme, 南京)试剂盒说明书, 反应在qTOWER3 touch3荧光定量PCR仪中进行, 其中免疫基因及 β -actin内参基因均进行3次重复, 反应程序: 95℃预变性30s, 95℃10s, 60℃30s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 血红蛋白对CIK细胞内Fe和ROS的影响

为进一步探究血红蛋白对CIK细胞的影响,

表 1 实验中用到的引物信息

Tab. 1 List of primers used in the study

引物 primer name	序列 sequences
<i>GcTfR1</i> -RT-F	GATGATGAAATGGAGGCTAACG
<i>GcTfR1</i> -RT-R	GGCAATGACAAATCCGCAG
<i>GcTfR2</i> -RT-F	GAGGAGACTTTGGGAATGTTGG
<i>GcTfR2</i> -RT-R	CAGAGGACTGGAGTAGACGGAGA
<i>Gcferritin</i> -RT-F	TCCTGTGCTTCGTGCGTGT
<i>Gcferritin</i> -RT-R	ACCTTCAGTCCGCTCCTCGTG
<i>GcHepcidin</i> -RT-F	TGAAACACCACAGCAGAACGA
<i>GcHepcidin</i> -RT-R	CAGCCTTTGTTACGACAGCAGTT
<i>GcFPN1</i> -RT-F	ACTCTTCGCTGGCGTCATTG
<i>GcFPN1</i> -RT-R	TGGATTGTTGCGAGGATGA
<i>GcDMT1</i> -RT-F	TTCTCATTGACGAACAGCCAG
<i>GcDMT1</i> -RT-R	CAAAGGAAAAGAGCCACGGAT
<i>GcTNFa</i> -RT-F	GCTGCTGTCTGCTTCACCG
<i>GcTNFa</i> -RT-R	AGCCTGGTCTGGTTCACTCT
<i>GcCaspase3</i> -RT-F	GCATCATCATCAACAACAAA
<i>GcCaspase3</i> -RT-R	GACTGAGCATCACACAAACA
<i>GcCaspase6</i> -F	GTTTCTGTGCATGGACCTGATTC
<i>GcCaspase6</i> -R	CAGCTCTCTTCCACTTCCTCTT
<i>Caspase9</i> -F	GTGGGATAGATGACCAGATGGAC
<i>Caspase9</i> -R	AGACATAGCCTGGAAAGGTTGAG
<i>GcIL-1β</i> -RT-F	GTGTCTGGCCATTTCCAAGAGTA
<i>GcIL-1β</i> -RT-R	GGTGTGAGAGTTTCAGTGACCT
<i>GcIL8</i> -RT-F	GAGTCTTAGAGGTCTGGGTG
<i>GcIL8</i> -RT-R	CAGGTTAAAATATTGTGCAT
<i>GcTLR4</i> -RT-F	GAATAATGGGCAGCCGTAAGTC
<i>GcTLR4</i> -RT-R	TCCTCTCTCCACATCTCCAGA
<i>GcIL-4</i> -RT-F	AATAGGGATCAACGAGAA
<i>GcIL-4</i> -RT-R	TGAATGGTTATGTAGGGT
<i>GcIL10</i> -RT-F	CCCTTTGAGTTGCCACCA
<i>GcIL10</i> -RT-R	CAGCCATCATCCAATCCAC
<i>GcCAT</i> -RT-F	GCCATCTCCAACGGCAACTT
<i>GcCAT</i> -RT-R	CCAGACCTTAGTCAAATCAAACGG
<i>Gcβ-actin</i> -RT-F	ACCCACACCGTGCCCATCTA
<i>Gcβ-actin</i> -RT-R	CGGACAATTTCTCTTTCGGCTG
<i>GcIL-6</i> -RT-F	AGAAATGGTATCTGATGGCA
<i>GcIL-6</i> -RT-R	GAAGGTCTGAGGAGAGGCGT
<i>GcSOD</i> -RT-F	TCCGCACTCAACCCTTACAG
<i>GcSOD</i> -RT-R	ACTTTCCTCATTGCCTCCCTT
<i>GcGSH-Px</i> -F	AGGAGTTCCGAGATGTTGGATTC
<i>GcGSH-Px</i> -R	GTCTCCATTCACATCCACCTTCT
<i>GcNF-κB-p50</i> -RT-F	TCCTGGAGAGGATGTACTCAAT
<i>GcNF-κB-p50</i> -RT-R	TGTCAGTGTGATGTCTACCTTGG
<i>GcNF-κB-p60</i> -RT-F	TATTCCTGAAGCGAAGATCTGGG
<i>GcNF-κB-p60</i> -RT-R	TTGGAGCTCTGTTGTCGTAGATG

本研究分别检测了血红蛋白刺激 CIK 细胞 6 和 12 h 后细胞内 Fe 和 ROS 含量的情况。即在 Hb 刺激 CIK 细胞后, 吸尽培养基, 用 Hank 氏平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) 洗涤 2 次, 加入终浓度为 5 μmol/L 的 FeRhNox-1 和 H₂DCFDA 溶液, 28 °C 孵育 60 min, HBSS 洗涤 2 次后, 于荧光显微镜下观察细胞并拍照。

1.7 数据分析

本实验所有数据均以平均值±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。实验数据使用 Graphpad prism 6 软件进行图形分析。

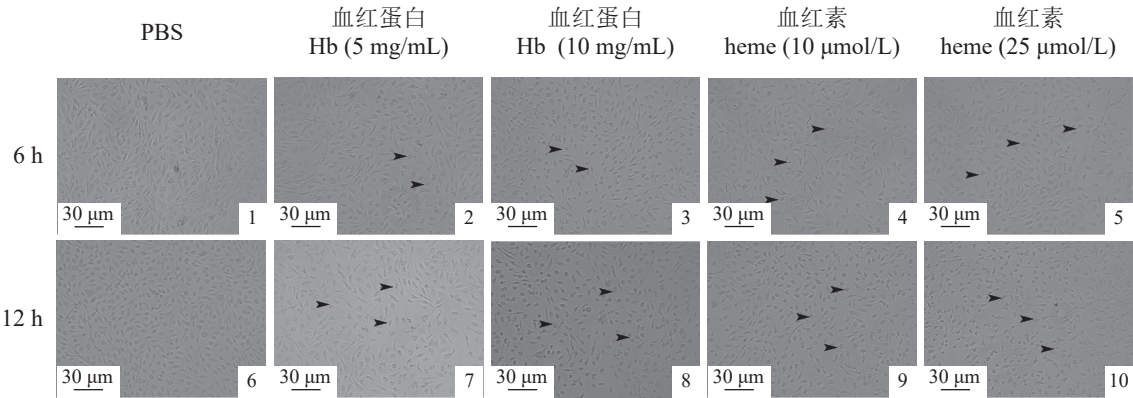
2 结果

2.1 血红蛋白对 CIK 细胞生长的影响

为初步探究血红蛋白对 CIK 细胞生长的影响, 本研究使用了不同浓度的血红蛋白和血红素分别与 CIK 细胞孵育 6 和 12 h。结果显示, 对照组 CIK 细胞呈长条形, 细胞界限清晰, 在低浓度血红蛋白 (5 mg/mL) 刺激 6 h 后, 部分 CIK 细胞变圆, 随着血红蛋白孵育时间延长, CIK 细胞畸形数量显著增加, 且细胞间隙明显增大。当高剂量血红蛋白刺激 CIK 细胞后, CIK 细胞畸形趋势更显著, 刺激 12 h 后, 绝大部分细胞呈圆形, 显示细胞活性受到明显抑制 (图版 I)。在血红素处理组中, 呈现出与血红蛋白处理组相似的结果, 并且细胞形态变化比血红蛋白处理组更显著。

2.2 血红蛋白激活 CIK 细胞铁代谢相关基因的表达

本研究通过 qRT-PCR 方法进一步检测血红蛋白对 CIK 细胞铁代谢相关基因的表达情况。检测结果显示, 在血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞 6 h 后, 当血红蛋白浓度为 5 mg/mL 时, 只有 *TfR1* 的表达量被显著激活 (图 1-a), 当血红蛋白浓度为 10 mg/mL 时, 所有检测的铁代谢相关基因均显著上调表达 (图 1-a~f)。在血红素处理组中, 当血红素浓度为 10 μmol/L 时, 只有铁蛋白基因的表达量显著上调 (图 1-f), 血红素浓度为 25 μmol/L 时, 铁调素和铁蛋白的表达量被显著激活 (图 1-e, f)。当 CIK 细胞被血红蛋白和血红素刺激 12 h 后, 血



图版 I 血红蛋白和血红素对草鱼 CIK 细胞生长的影响

箭头代表发生形态变化的细胞。

Plate I Effects of hemoglobin and heme on the growth of CIK cells

The arrows represent the morphological changed cells.

红蛋白浓度为 5 mg/mL 时, 转铁蛋白受体 2 (图 1-h)、膜转蛋白 (图 1-j) 以及铁蛋白 (图 1-l) 的表达量显著上调。血红蛋白浓度为 10 mg/mL 时, 铁代谢相关基因的表达与对照相比没有显著差异。在血红素处理组中, 当血红素浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 只有铁调素 (图 1-k) 和铁蛋白基因的表达量显著上调, 血红素浓度达到 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 转铁蛋白受体 2 (图 1-h)、二价金属离子转运蛋白 1、膜转铁蛋白 1、铁调素和铁蛋白的表达量均显著上调 (图 1-i~l)。在时序表达过程中, 铁代谢相关基因在血红蛋白处理 6 和 12 h 之间没有显著差异, 而在血红素处理中, 二价金属离子转运蛋白 1、膜转铁蛋白 1、铁调素和铁蛋白在处理 12 h 后, 表达量有所增加, 转铁蛋白受体 1 和受体 2 均没有显著变化 (图 1-g, h)。

2.3 血红蛋白激活 CIK 细胞炎症相关基因的表达

为进一步探究血红蛋白和血红素对 CIK 细胞炎症因子相关基因的表达的影响, 实验对炎症相关基因进行了 qRT-PCR 检测。结果显示, 当血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞 6 h 后, TLR4 和 NF- κB 途径被显著激活 (图 2-a~c), 其中 10 mg/mL 血红蛋白组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 血红素组更明显, 同时激活下游多种炎症因子相关基因的表达, 但是对 *IL-6* 的表达无显著影响 (图 2)。当血红蛋白和血红素处理 CIK 细胞 12 h 后, TLR4 和 NF- κB 途径被显著激活 (图 2-j~l), 特别是 25 $\mu\text{mol/L}$ 血红素处理组, 下游炎症相关因子均不同程度上调表达 (图 2-m~r), 总体表现为浓度越高上调表达趋势越显著。

血红蛋白激活 CIK 细胞抗氧化基因的表达

当组织中存在过量的血红蛋白时, 由于血红蛋白自氧化, 往往对组织细胞造成氧化损伤, 同时组织细胞通过提高自身抗氧化水平来维持微环境平衡。因此, 本研究也检测了血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞 6 和 12 h 后, 细胞内抗氧化相关基因的表达情况。检测结果显示, 当血红蛋白和血红素处理细胞 6 h 后, 血红蛋白 10 mg/mL 组中的 *SOD* 和 *GSH-Px* 表达被极显著激活 (图 3-a, e), *CAT* 的表达无论在血红蛋白还是血红素处理组中, 均无显著变化 (图 3-c)。当血红蛋白和血红素处理 CIK 细胞 12 h 后, *SOD* 和 *CAT* 的表达水平在 25 $\mu\text{mol/L}$ 的血红素处理组中显著上调 (图 3-b, d), *GSH-Px* 的表达在 5 mg/mL 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 血红素处理组中显著上调 (图 3-f)。

2.4 血红蛋白促进 CIK 细胞内铁离子和 ROS 含量增加

为进一步探究血红蛋白对 CIK 细胞胞内铁含量的影响, 本研究通过荧光标记的方式对血红蛋白孵育后 CIK 细胞胞内铁的含量进行了检测。检测结果显示, 当血红蛋白孵育 CIK 细胞 6 h 后, CIK 细胞中的铁含量与对照组相比显著增加, 当孵育时间延长至 12 h 时, CIK 细胞内的铁含量急剧增加, 并且细胞形态出现明显变化 (图版 II -a)。同时探究了 CIK 细胞内铁含量的增加对胞内 ROS 含量的影响, 结果显示, 血红蛋白孵育 12 h 后, CIK 细胞内的 ROS 含量较对照组中显著增加, 并且与铁离子共定位 (图版 II -b)。

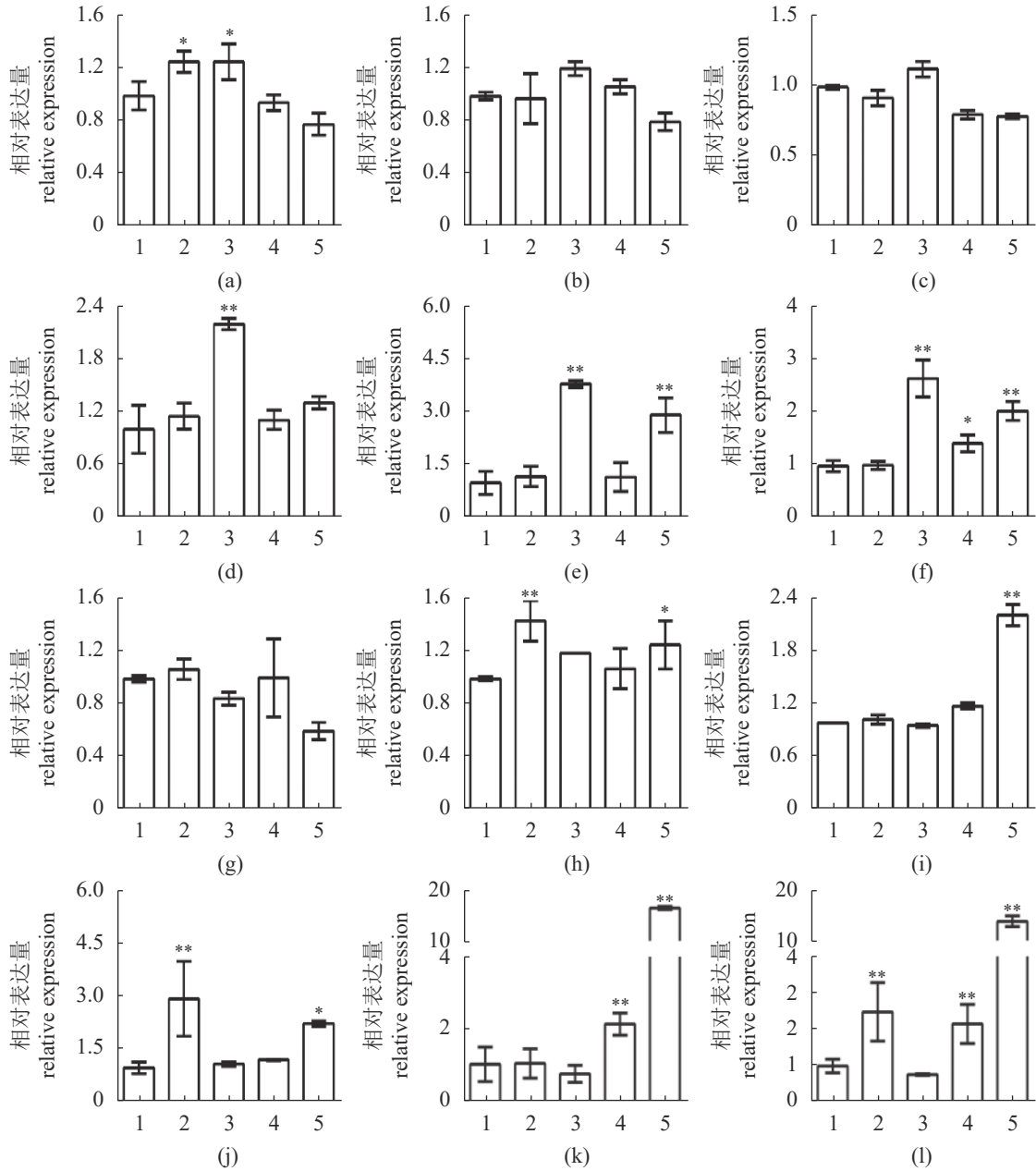


图1 血红蛋白和血红素激活铁代谢相关基因的表达

(a)~(f) 血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞 6 h 后铁代谢相关基因的表达情况, (a) 铁转运蛋白受体 1 基因, (b) 铁转运蛋白受体 2 基因, (c) 二价金属离子转运蛋白 1 基因, (d) 膜铁转运蛋白 1 基因, (e) 铁调素基因, (f) 铁蛋白基因; (g)~(l) 血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞 12 h 后铁代谢相关基因的表达情况, (g) 铁转运蛋白受体 1 基因, (h) 铁转运蛋白受体 2 基因, (i) 二价金属离子转运蛋白 1 基因, (j) 膜铁转运蛋白 1 基因, (k) 铁调素基因, (l) 铁蛋白基因。1. 对照, 2. 血红蛋白-5 mg/mL, 3. 血红蛋白-10 mg/mL, 4. 血红素-10 μmol/L, 5. 血红素-25 μmol/L; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同。

Fig. 1 Expression of iron metabolism-related genes after hemoglobin and heme stimulation

(a)~(f) the expression of genes related to iron metabolism after hemoglobin and heme stimulation of CIK for 6 h, (a) *TFR1*, (b) *TFR2*, (c) *DMT1*, (d) *FPN1*, (e) hepcidin gene, (f) ferritin gene; (g)~(l) the expression of genes related to iron metabolism after hemoglobin and heme stimulation of CIK for 12 h, (g) *TFR1*, (h) *TFR2*, (i) *DMT1*, (j) *FPN1*, (k) hepcidin gene, (l) ferritin gene. 1. control, 2. Hb-5 mg/mL, 3. Hb-10 mg/mL, 4. heme-10 μmol/L, 5. heme-25 μmol/L; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

2.5 血红蛋白促进 CIK 细胞凋亡相关基因的表达情况

过量的 ROS 和炎症容易对组织细胞产生氧化

损伤, 为进一步检测血红蛋白和血红素对 CIK 细胞凋亡的影响, 本研究检测了血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞后, 细胞凋亡相关基因的表达情况。

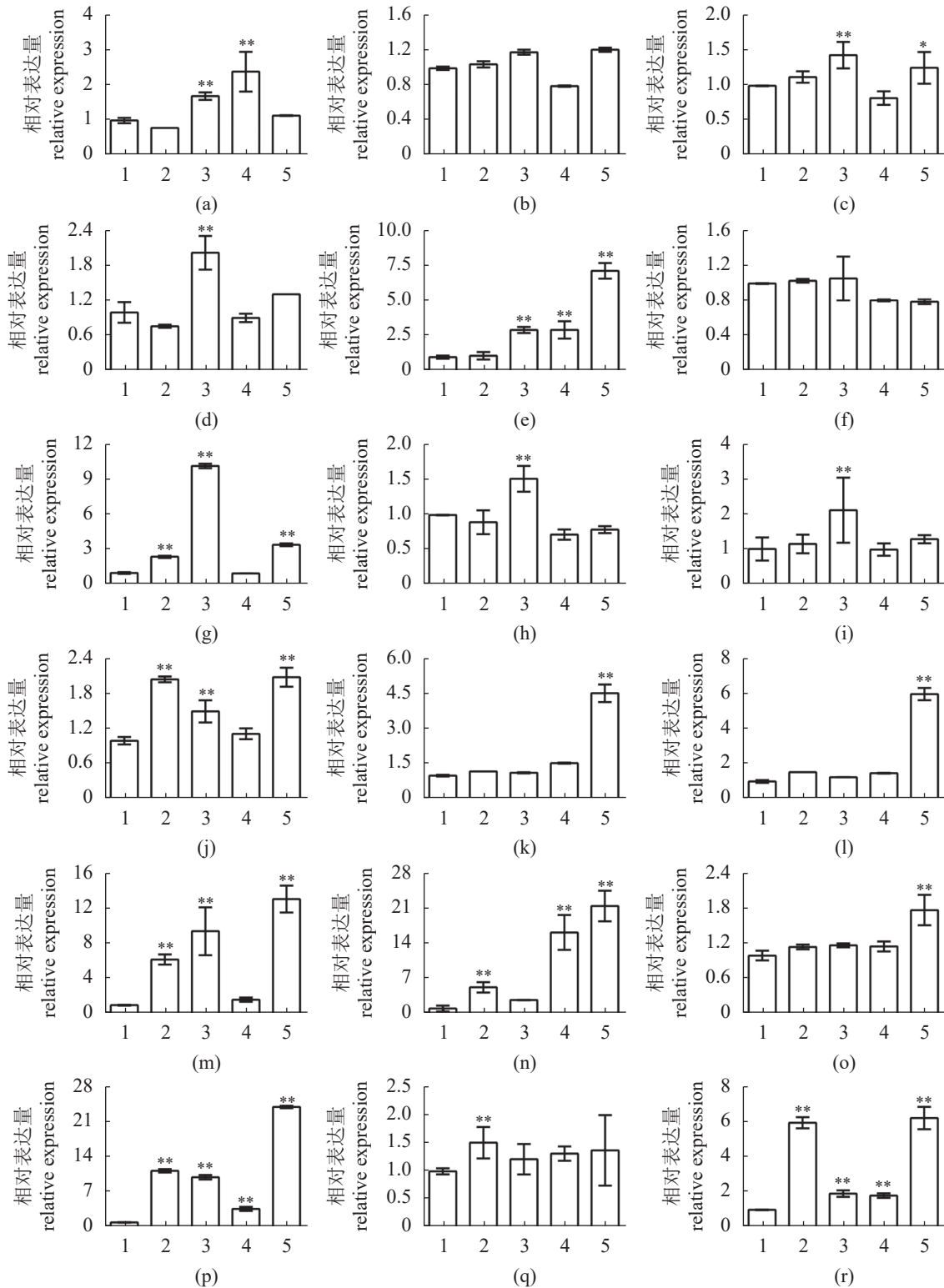


图 2 血红蛋白和血红素激活 CIK 细胞炎症相关基因的表达

(a)~(i) 血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞 6 h 后炎症相关基因的表达情况, (j)~(r) 血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞 12 h 后炎症相关基因的表达情况。(a) (j) *TLR-4*, (b) (k) *NF-κB-p65*, (c) (l) *NF-κB-p50*, (d) (m) *IL-1β*, (e) (n) *TNF-α*, (f) (o) *IL-6*, (g) (p) *IL-8*, (h) (q) *IL-4*, (i) (r) *IL-10*。

Fig. 2 Hemoglobin and heme activated the expression of inflammation-related genes in CIK cells

(a)~(i) the expression of inflammation-related genes after 6 h of hemoglobin and heme stimulation of CIK cell, (j)~(r) the expression of inflammation-related genes after 12 h of hemoglobin and heme stimulation of CIK cell. (a) (j) *TLR-4*, (b) (k) *NF-κB-p65*, (c) (l) *NF-κB-p50*, (d) (m) *IL-1β*, (e) (n) *TNF-α*, (f) (o) *IL-6*, (g) (p) *IL-8*, (h) (q) *IL-4*, (i) (r) *IL-10*.

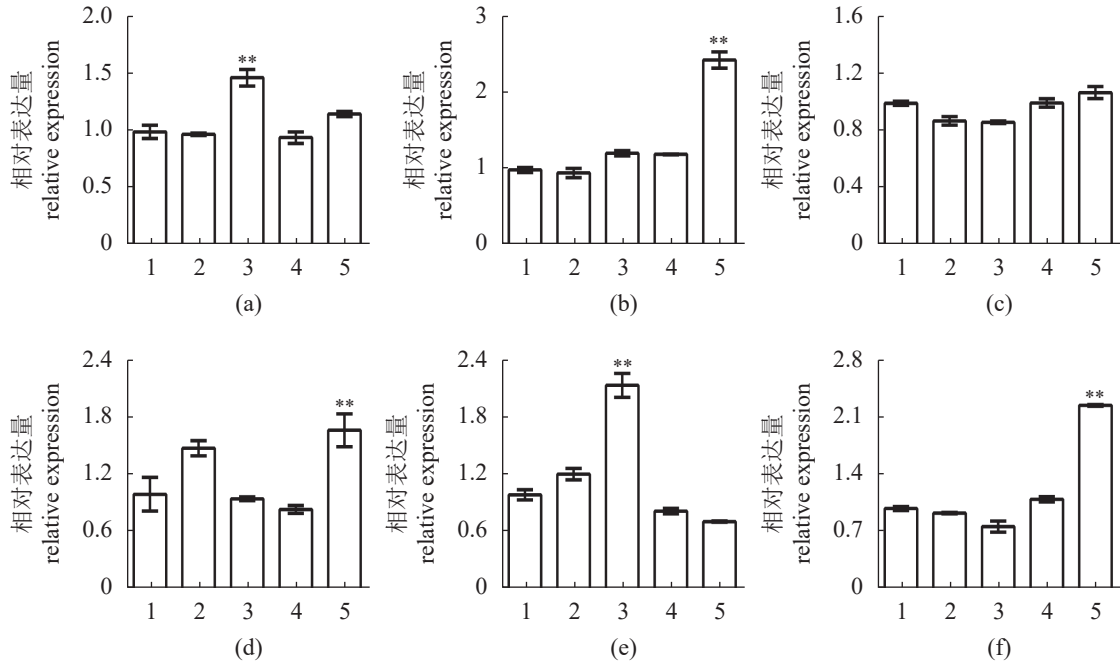


图3 血红蛋白和血红素激活 CIK 细胞抗氧化相关基因的表达

(a) (c) (e) 血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞 6 h 后抗氧化相关基因的表达情况, (b) (d) (f) 血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞 12 h 后抗氧化相关基因的表达情况; (a) (b) *SOD*, (c) (d) *CAT*, (e) (f) *GSH-Px*。

Fig. 3 Hemoglobin and heme activated the expression of inflammation-related genes in CIK cells

(a) (c) (e) the expression of antioxidation-related genes after 6 h of hemoglobin and heme stimulation of CIK cell, (b) (d) (f) the expression of antioxidation-related genes after 12 h of hemoglobin and heme stimulation of CIK cell; (a) (b) *SOD*, (c) (d) *CAT*, (e) (f) *GSH-Px*.

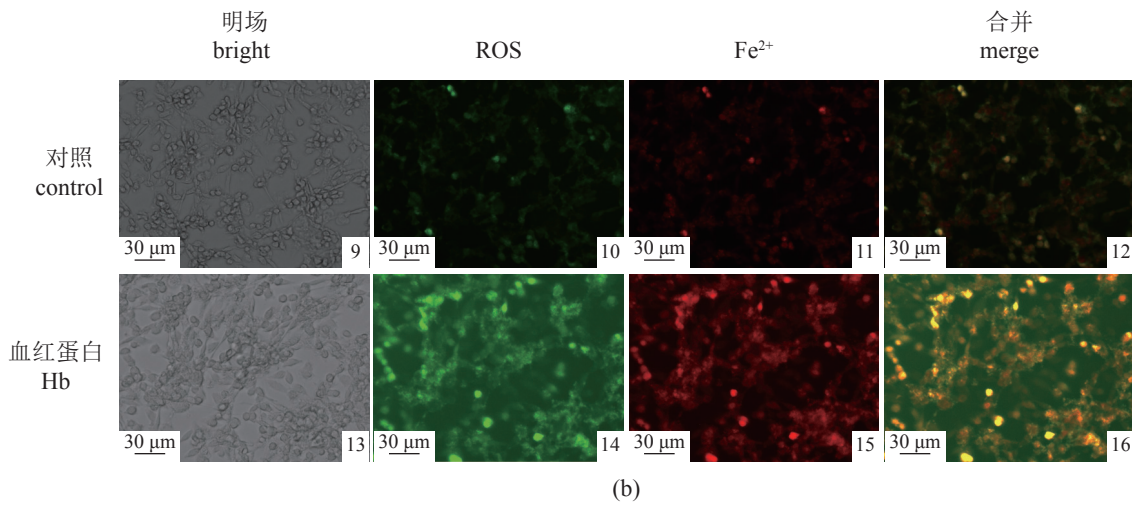
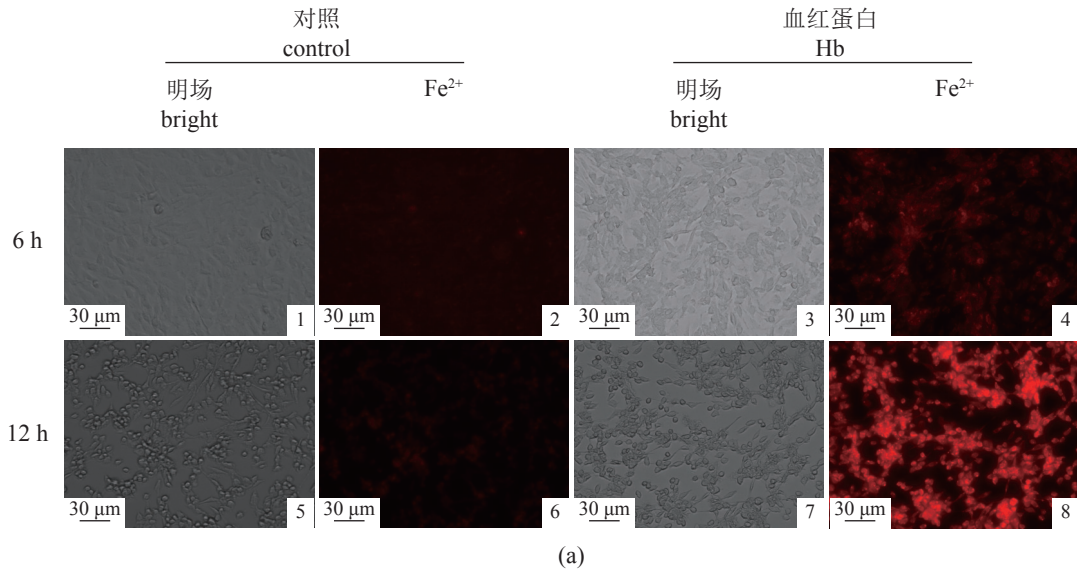
检测结果显示, 当血红蛋白和血红素处理细胞 6 h 后, 10 mg/mL 血红蛋白和 25 $\mu\text{mol/L}$ 血红素处理组中的 *caspase9* 基因的表达被显著激活, *caspase3* 基因的表达量在所有血红蛋白和血红素处理组中均显著上调, *caspase6* 基因变化不显著(图 4-a, c, e)。当血红蛋白和血红素处理 CIK 细胞 12 h 后, 所有检测的凋亡相关基因的表达量均有不同程度的上调, 其中 25 $\mu\text{mol/L}$ 血红素处理组上调表达最为显著(图 4-b, d, f)。

3 讨论

当细菌或病毒病的暴发导致鱼类出血性疾病发生时, 大量血红蛋白进入组织中。当机体发生少量出血时, 血液中的触珠蛋白和血红素结合蛋白可以迅速清除血液中的血红蛋白, 从而保护机体免遭其氧化损伤作用^[19-20]。然而, 当机体内大量出血导致触珠蛋白和血红素结合蛋白被消耗殆尽, 过量的血红蛋白进入组织中, 可引起机体多种病理的发生, 如氧化损伤、细胞毒性、血管收缩等^[21-23]。此外, 游离的血红蛋白迅速发生自氧化, 并产生大量的 ROS, 对机体造成氧化损伤,

同时氧化后的血红蛋白容易导致血红素解离, 释放高氧化活性的血红素进入组织, 对组织细胞造成氧化损伤, 并激活炎症因子的表达, 造成组织细胞的二次损伤^[20, 24-25]。血红素加氧酶 1 是清除血红蛋白毒性的第 3 道防线, 其将血红素分解成胆绿素、CO 和铁离子, 铁离子可以被储存在铁蛋白中, 以被细胞再次利用^[26]。目前, 有关血红蛋白对组织细胞的毒性作用相关研究主要集中在哺乳动物中, 对鱼类的相关研究还未见报道。

本实验首先探究了游离血红蛋白和血红素对 CIK 细胞的毒性作用。分离的血红蛋白和血红素分别与 CIK 细胞孵育 6 和 12 h 后, 在光学显微镜下观察 CIK 细胞的生长情况, 结果显示, 血红蛋白和血红素均对细胞生长具有明显的抑制作用, 并具有一定的浓度和时间依赖作用, 表明血红蛋白和血红素对 CIK 细胞具有毒性作用。研究表明, 游离的血红蛋白可以通过多种机制进入组织细胞中, 在血红素加氧酶的作用下被分解成胆绿素、CO 和铁离子, 铁离子被存储在铁蛋白中, 但是过量的铁离子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 ($\cdot\text{OH}$) 而形成细胞内的氧化应激, 导致细胞对辐射的敏感性增强、



图版 II 血红蛋白促进 CIK 细胞内铁离子和 ROS 含量增加

(a) 血红蛋白孵育 CIK 细胞 6 h 和 12 h 后, 胞内铁含量变化情况; (b) 血红蛋白孵育 CIK 细胞 12 h 后, 细胞内 ROS 的含量变化情况。

Plate II Hemoglobin increased the iron and ROS content in CIK cells

(a) hemoglobin increased the iron content in cells after being incubated for 6 h and 12 h; (b) hemoglobin increased the ROS content in CIK cells after being incubated for 12 h.

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^[16, 27-28]。为进一步验证血红蛋白对 CIK 细胞的毒性作用是否与铁有关, 本研究通过 qRT-PCR 方法检测了血红蛋白和血红素对 CIK 细胞内铁代谢相关基因的表达情况。检测结果显示, 无论是血红蛋白还是血红素, 都不同程度地激活铁代谢相关基因的表达, 揭示过量的血红蛋白和血红素打破了 CIK 细胞内的铁平衡, 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结果相似^[29]。

当机体由于多种因素导致体内出血而释放过量的血红蛋白进入组织时, 由于血红蛋白的自氧

化而导致血红素游离, 血红素具有高氧化活性, 触发氧化还原反应等级联反应而对组织细胞产生氧化损伤, 最终导致组织甚至器官功能失调, 如肾功能失调导致蛋白尿^[20]。本研究中, 检测了血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞后, 细胞内抗氧化酶相关基因的表达情况, 检测结果显示, 血红蛋白和血红素均不同程度地激活了 CIK 细胞内抗氧化酶 SOD、GSH 和 CAT 的表达, 本研究结果与前期研究结果一致^[30-32]。同时, 本研究检测了血红蛋白刺激 CIK 细胞后, 细胞内铁离子和 ROS 含量的变化情况, 检测结果显示, 血红蛋白的刺激可以导致细胞内铁离子和 ROS 含量的增加。

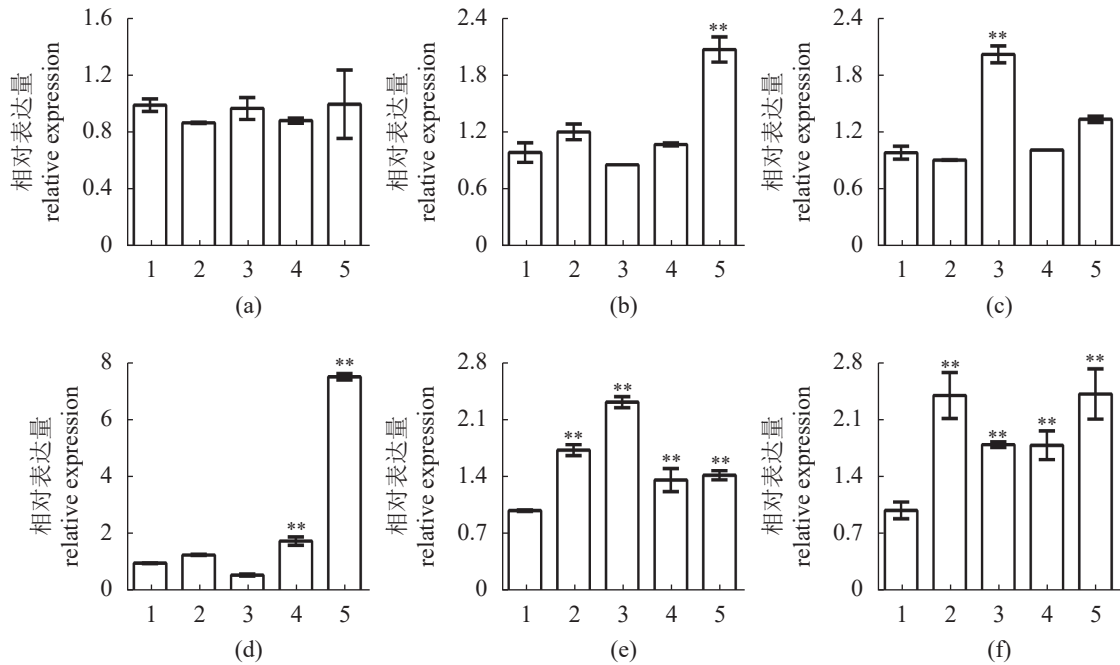


图4 血红蛋白和血红素激活 CIK 细胞凋亡相关基因的表达

(a) (c) (e) 血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞 6 h 后凋亡相关基因的表达情况, (b) (d) (f) 血红蛋白和血红素刺激 CIK 细胞 12 h 后凋亡相关基因的表达情况: (a) (b) *caspase 6*, (c) (d) *caspase 9*, (e) (f) *caspase 3*。

Fig. 4 Hemoglobin and heme activated the expression of apoptosis-related genes in CIK cells

(a) (c) (e) the expression of apoptosis-related genes after 6 h of hemoglobin and heme stimulation of CIK cell, (b) (d) (f) the expression of apoptosis-related genes after 12 h of hemoglobin and heme stimulation of CIK cell, (a) (b) *caspase 6*, (c) (d) *caspase 9*, (e) (f) *caspase 3*。

有研究表明, 游离的血红素通过多种途径激活组织细胞释放炎症因子, 如激活 TLR4 和 NF- κ B 途径、NLRP3 炎症小体途径及 PI3K 途径等^[14,33]。组织细胞长期浸润在炎症环境中也会造成组织细胞的二次损伤。本实验探究了游离的血红蛋白和血红素对 CIK 细胞炎症因子相关基因的表达情况。结果显示, 血红蛋白和血红素可以通过 NF- κ B 途径激活下游的促炎因子 (TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6)、抑炎因子 (IL-10) 和趋化因子 (IL-4 和 IL-8) 的表达。本实验结果与大部分哺乳动物研究模型的结果相一致, 说明鱼体血红蛋白或者血红素也可以激活机体的炎症相关基因的表达。当组织细胞长期处在高 ROS、高炎症的环境中时, 容易导致组织细胞凋亡的发生, 为进一步验证血红蛋白和血红素的刺激是否导致 CIK 细胞凋亡的发生, 实验检测了凋亡相关基因的表达水平, 结果显示, 血红蛋白和血红素的刺激使得细胞内凋亡相关基因 (*caspase6*、*caspase9* 和 *caspase3*) 的表达水平显著增加, 表明血红蛋白可以通过氧化损伤或者炎症导致 CIK 细胞发生凋亡, 该研究结果与前期研究结果相一致^[16,34-35]。

综上所述, 本研究以草鱼 CIK 细胞为对象, 深入探究了血红蛋白对草鱼 CIK 细胞的影响, 研究表明, 血红蛋白可以导致 CIK 细胞氧化损伤, 并同时激活多种炎症因子相关基因的表达水平, 促进细胞凋亡的发生。本研究结果丰富了鱼类体液免疫的基础理论, 可为草鱼养殖业的健康发展提供参考依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Froehlich H E, Runge C A, Gentry R R, *et al.* Comparative terrestrial feed and land use of an aquaculture-dominant world[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(20): 5295-5300.
- [2] Houston R D, Bean T P, Macqueen D J, *et al.* Harnessing genomics to fast-track genetic improvement in aquaculture[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2020, 21(7): 389-409.
- [3] 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.
- [4] Ahmed N, Thompson S, Glaser M. Global aquaculture productivity, environmental sustainability, and climate change adaptability[J]. *Environmental Management*, 2019, 63(2): 159-172.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Yuan Y, Tam M F, Simplaceanu V, *et al.* New look at hemoglobin allostery[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(4): 1702-1724.
- [8] Sadrzadeh S M, Anderson D K, Panter S S, *et al.* Hemoglobin potentiates central nervous system damage[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1987, 79(2): 662-664.
- [9] Skaar E P, Humayun M, Bae T, *et al.* Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections[J]. *Science*, 2004, 305(5690): 1626-1628.
- [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] 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): 632-642.
- [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] Belcher J D, Chen C S, Nguyen J, *et al.* Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease[J]. *Blood*, 2014, 123(3): 377-390.
- [14] 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.
- [15] Nyakundi B B, Tóth A, Balogh E, *et al.* Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 β production upon intravascular hemolysis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2019, 1865(2): 464-475.
- [16] Moreno J A, Martín-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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Van Avondt K, Nur E, Zeerleder S. Mechanisms of haemolysis-induced kidney injury[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2019, 15(11): 671-692.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Jeney V, Balla J, Yachie A, *et al.* Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme[J]. *Blood*, 2002, 100(3): 879-887.
- [25] 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.
- [26] Duvigneau J C, Esterbauer H, Kozlov A V. Role of heme oxygenase as a modulator of heme-mediated pathways[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(10): 475.
- [27] Subramanian K, Du R J, Tan N S, *et al.* CD163 and IgG codefend against cytotoxic hemoglobin via autocrine and paracrine mechanisms[J]. *The Journal of Immunology*, 2013, 190(10): 5267-5278.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Longeville S, Stingaciu L R. Hemoglobin diffusion and the dynamics of oxygen capture by red blood cells[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10448.
- [32] 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.
- [33] Nyakundi B B, Tóth A, Balogh E, *et al.* Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 β production upon intravascular hemolysis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2019, 1865(2): 464-475.
- [34] 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.
- [35] 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 hemoglobin - mediated apoptosis in *Ctenopharyngodon idella* kidney cell line (CIK)

QIN Zhendong, YANG Minxuan, LU Zhijie, SHI Fei, LI Yanan,
ZHAN Fanbin, WAN Quanyuan, 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: This study aims to explore the damage mechanism of hemoglobin on *Ctenopharyngodon idella* kidney (CIK) cells. Firstly, the growth of CIK cells stimulated by hemoglobin and heme was observed, and the results showed that hemoglobin and heme significantly inhibited the growth of CIK cells. Secondly, the expression of iron metabolism-related genes in CIK cells was detected after stimulated by hemoglobin and hem. The results showed that the stimulation of hemoglobin and heme up-regulated the expression of iron metabolism-related genes to different degrees. The expression of inflammation and antioxidant-related enzymes in CIK cells after stimulated by hemoglobin and heme was also examined. The results suggested that hemoglobin and heme could activate the expression of inflammatory factors through NF- κ B pathway, such as pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6, the anti-inflammatory factor IL-10 and chemokines IL-4 and IL-8, and also activate the expression levels of three antioxidant enzymes, including Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione peroxidase (GSH-Px). In order to further detect the toxic effect of hemoglobin on CIK cells, this study also detected the intracellular iron and ROS in CIK cells after hemoglobin stimulation. The results showed that hemoglobin stimulation significantly increased intracellular iron and ROS. Finally, we also examined the expression of apoptosis-related genes in CIK cells after stimulated by hemoglobin and heme, and the results showed that both hemoglobin and heme significantly activated the expression levels of apoptosis-related genes in CIK cells. In conclusion, the results of this study suggest that the high oxidative activity of hemoglobin can activate the expression of iron metabolism- and inflammation-related genes, as well as increasing intracellular iron and ROS levels, leading to up-regulated expression of apoptosis genes in CIK cells.

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

Corresponding authors: LI Jun. E-mail: jli@Issu.edu;

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31902409, 31872606); Science and Technology Program of Guangzhou (201804010096)