



联苯菊酯对皱纹盘鲍血细胞胞外陷阱形成的影响

化少蒙^{1,2,3}, 陈丽竹², 杨顶珑^{3*}, 吕晓静³,
刘相全², 何金霞², 李旋²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006;

3. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 为探究贝类细胞胞外陷阱对联苯菊酯 (BF) 胁迫的响应, 实验以皱纹盘鲍血细胞为研究对象, 探讨不同浓度 BF (0、0.01、0.10、1.00 mg/L) 对血细胞细胞活力、胞外陷阱 (ETs)、活性氧 (ROS) 产量以及 ROS、糖酵解相关基因表达量的影响。结果显示, 皱纹盘鲍血细胞的细胞活力随着 BF 浓度升高分别降低至 90.40%、80.22% 和 72.28%, 具有一定的剂量依赖性特征。BF 降低了皱纹盘鲍血细胞活力, 且具有一定的剂量依赖性特征。不同浓度 BF 刺激后, *pi3k* 表达量极显著上调, 分别为对照的 2.16、3.32 和 3.32 倍。在 0.01 mg/L BF 刺激下, *akt* 表达量极显著上调, 在 1.00 mg/L BF 刺激下达到最高, 为对照的 5.34 倍。在 0.01 mg/L BF 刺激下, *hif-1 α* 的表达量与对照组无显著差异, 在 1.00 mg/L BF 刺激时升高最为显著, 为对照的 11.63 倍。在 BF 诱导形成 ETs 过程中, 血细胞 ROS 产量增加, 且 ROS 相关基因表达量显著上调。通过添加烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶抑制剂 (DPI), 发现 ETs 的形成受到抑制, 表明 ROS 参与了 ETs 形成过程。同时, 在 ETs 形成的过程中, 糖酵解相关基因表达量显著提升, 初步表明糖酵解反应参与到 ETs 的形成过程。与对照组相比, *pk* 的表达量显著升高, 在 BF 浓度为 1.00 mg/L 时表达量最高; *hk* 的表达量在所有刺激浓度下均极显著升高, 且在 BF 浓度为 1.00 mg/L 时表达量最高。研究表明, ROS 和糖酵解反应参与了 BF 诱导的皱纹盘鲍细胞胞外陷阱发生过程, BF 可能会通过干扰血细胞发挥正常的细胞免疫反应, 继而对细胞造成一定的免疫毒害作用。

关键词: 皱纹盘鲍; 基因表达; 活性氧; 联苯菊酯; 胞外陷阱; 细胞免疫

中图分类号: Q 786; S 944.4⁺⁵

文献标志码: A

随着社会发展和工业进步, 人类对于农药安全性的要求越来越高, 高毒性农药逐渐被禁止或替代。由于拟除虫菊酯 (pyrethroids, Pys) 具有良好的环境稳定性和杀虫活性, 在林业、园艺和农业生产中已取代有机磷、氨基甲酸酯等传统农药而被广泛使用^[1-2]。据统计, 拟除虫菊酯的使用量在全球杀虫剂市场上超过 25%^[3]。随着拟除虫菊酯

类杀虫剂生产和使用规模的不断扩大, 其在环境中已无处不在。目前, 拟除虫菊酯的检出率和残留量呈持续上升趋势^[4-5]。当拟除虫菊酯吸附于土壤、悬浮颗粒或沉积物后, 会作为吸附络合物或沉降颗粒持续存在数月^[6]。之后, 通过降雨、地表径流等途径迁移至湖泊、河流和海洋环境。联苯菊酯 (bifenthrin, BF) 是第 3 代拟除虫菊酯中的

收稿日期: 2022-12-06 修回日期: 2023-03-22

资助项目: 山东省农业良种工程 (2017LZGC009); 山东省自然科学基金 (ZR2020QD097); 国家自然科学基金 (42176141, 41806196)

第一作者: 化少蒙 (照片), 从事水生态毒理学研究, E-mail: Huashaomeng@163.com

通信作者: 杨顶珑, 从事海岸带逆境生物学与渔业投入品研究, E-mail: dlyang@yic.ac.cn



一员, 使用更为广泛^[7], 在国内外水环境中被频繁检出^[8-13]。与哺乳动物和鸟类相比, BF 对水生生物的毒性作用更高, 会严重损伤水生生物的内分泌系统^[14]、免疫系统^[15]、神经系统^[16]、组织形态^[17]和运动能力^[1]等。

胞外陷阱 (extracellular traps, ETs) 是一种重要的细胞免疫方式, 一般以细胞内核酸为骨架, 搭载多种免疫多肽组成纤维网状结构, 对病原菌具有较高的抓捕和抑杀活性^[18-19]。目前已有研究表明, 除了病原菌以外, 环境污染物亦可诱导水生生物 ETs 的形成。例如, 二嗪农 (diazinon) 暴露能够诱导尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中性粒细胞形成 ETs^[20]。纳米氧化锌诱导鲫 (*Carassius auratus*) 血细胞形成 ETs 的过程会受到 NADPH、ERK1/2、P38 和糖酵解反应的影响^[21]。三氯二苯脲可通过激活 ROS/ERK1/2/P38 信号, 触发鲤 (*Cyprinus carpio*) 血细胞生成 ETs^[22]。此外, 在软体动物中也发现了 ETs 现象, 但大多研究关注的是 ETs 的抗菌活性^[23-27], 针对环境污染物对贝类血细胞 ETs 影响的研究较少, 仍缺乏系统深入的研究。

皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 是我国沿海地区重要的水产养殖经济物种。由于其具有开放的循环系统, 很容易受到水环境中胁迫物质的影响^[28]。ETs 作为一种应对病原菌入侵的细胞响应方式, 在贝类免疫反应过程中发挥积极作用^[23]。为研究拟除虫菊酯对皱纹盘鲍的细胞毒害作用, 本研究从胞外陷阱入手, 使用 BF 对皱纹盘鲍血细胞进行刺激, 通过检测细胞活力以及 ETs、活性氧 (ROS) 的生成及其之间的关系, 初步探讨皱纹盘鲍在 BF 胁迫下 ETs 的响应规律。研究结果有助于了解环境 BF 的危害, 丰富皱纹盘鲍血细胞 ETs 形成机制的研究, 并拓展环境农药残留对细胞免疫毒性的认识。

1 材料与方法

1.1 皱纹盘鲍血细胞采集

皱纹盘鲍购自山东省烟台市本地养殖场, 平均壳长为 60 mm。在海水中暂养 1 周 (温度 20~22 °C, 盐度 28~30), 随机选取健康皱纹盘鲍, 用 5 mL 注射器抽取血淋巴与抗凝剂 (27 mmol/L 柠檬酸钠、336 mmol/L 氯化钠、115 mmol/L 葡萄糖、9 mmol/L EDTA、pH 7.5) 1:1 混匀 (体积比), 600×g 离心 10 min, 弃上清液, 获取血细胞。使

用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 重悬血细胞至浓度为 1×10^6 个/mL, 置于冰上备用。实验过程中, 实验人员严格遵守实验动物伦理规范, 并按照相应的规章制度执行。

1.2 血细胞活力测定

使用 CCK-8 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 测定 BF 对血细胞活力的影响。向 96 孔板中加入 2×10^5 个血细胞, 每个处理设置 6 个复孔, 随后加入终浓度为 0、0.01、0.10 和 1.00 mg/L 的 BF (99.8%) 和 20 μ L CCK-8 试剂, 孵育 1 h 后, 使用酶标仪 (TECAN, Infinite M2000 PRO) 测定 OD₄₅₀ 数值, 并计算血细胞活力。

1.3 ETs 定性定量分析

参照 Han 等^[23]的方法, 对 BF 暴露后的血细胞 ETs 进行定性定量分析。以 1×10^6 个/mL 的密度接入至无菌培养皿 (60 mm) 中, 再加入终浓度为 0、0.01、0.10 和 1.00 mg/L 的 BF 并刺激 1 h, 随后加入终浓度为 5 μ mol/L SytoX 荧光染料 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 孵育 10 min, 并用荧光显微镜 (DMi8, Leica, 德国) 进行 ETs 现象观察与拍摄。

向黑色 96 孔板中接入 2×10^5 个血细胞, 加入终浓度为 0、0.01、0.10、1.00 mg/L 的 BF 并刺激 1 h, 以未加 BF 刺激的血细胞作为对照。随后, 加入 5 μ mol/L SytoX 荧光染料并孵育 10 min。使用荧光酶标仪 (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, 美国) 在 485 nm 激发波长和 525 nm 发射波长下测量荧光强度, 并进行 ETs 定量分析。

1.4 RNA 提取和相关基因表达分析

选取重悬后的血细胞, 分别加入终浓度为 0.01、0.10、1.00 mg/L 的 BF 刺激 1 h, 以未加入 BF 处理的血细胞作为对照组。使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 从血细胞中提取总 RNA, 并根据反转录试剂盒 (Promega, 美国) 合成 cDNA, 以 *gapdh* 为内参基因, 使用 7500 Fast Real Time PCR 系统 (Applied Biosystems, 美国) 对 ROS 相关基因 [磷脂酰肌醇-3-激酶 (*pi3k*), 蛋白激酶 B (*akt*) 和缺氧诱导因子-1 α (*hif-1 α*)] 和糖酵解途径基因 (己糖激酶, *hk*; 丙酮酸激酶, *pk*) 进行荧光定量 PCR (qRT-PCR)。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算上述基因的相对表达量。本研究使用的引物信息见表 1。

表 1 本实验所用引物序列

Tab. 1 Primers used in this study		
基因名称 genes		引物序列 primer sequence (5'-3')
<i>gapdh</i>	forward	ACGAAGATGTTGCTGCGTTGGTT
	reverse	TCGATGGGGTACTTGAGGGTGAG
<i>pi3k</i>	forward	TTGTGGCATACTTAGTGGGCTAG
	reverse	TGTGCTATGGGAAGTGGAGAAT
<i>akt</i>	forward	GGCACGGGAGTGGTAATGTATG
	reverse	ACAGTAAATGTTTCATCAAAGTAGCG
<i>hif-1α</i>	forward	CTTGAACGGCACTGAGGACATA
	reverse	ATCCAGGACCTGATTGGCTACA
<i>hk</i>	forward	ATGCCAAACCTTCCTTCTCAA
	reverse	TGAGGCATCAACCACGACCA
<i>pk</i>	forward	CGAGTCACGGCAATGATAGGA
	reverse	AGGCTGCCATCTACCACTTGC

1.5 活性氧 (ROS) 检测

参照 Patel 等^[29]的方法, 使用流式细胞术检测 BF 刺激后血细胞 ROS 的生成量。向 1.5 mL 离心管中接入 4×10^5 个血细胞, 加入终浓度为 0.01、0.10 和 1.00 mg/L 的 BF 并刺激 1 h, 以未刺激的血细胞作为对照。根据活性氧检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)说明操作, 使用流式细胞仪(FACS Aria, Becton-Dickinson, 美国)检测血细胞中 ROS, 结果用 FlowJo 软件进行分析, 以荧光强度的平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。

1.6 ROS 抑制剂对 ETs 发生的影响

向 1.5 mL 离心管中接入 4×10^5 个血细胞, 使用 NADPH 氧化酶抑制剂 (DPI, Sigma, 美国) 预处理 30 min, 之后加入终浓度为 1.00 mg/L 的 BF 刺激 1 h。根据活性氧检测试剂盒说明书, 使用流式细胞仪检测 ROS 生成量。

2 结果

2.1 BF 对血细胞活力的影响

用 CCK-8 试剂盒测定了 BF 刺激后血细胞的活力, 结果显示, 当使用 1 mg/L BF 刺激 1 h 后, 与对照组相比, 细胞活力显著下降 ($P < 0.05$) (图 1)。此外, 随着刺激浓度的增加, 细胞活力也表现出下降的趋势, BF 浓度越高, 血细胞活力越低, 对血细胞的毒害作用越强, 初步表明 BF 对鲍的血细胞毒性呈一定的剂量依赖性。

2.2 ETs 的形成与定量

SytoX Green 可将释放到胞外的 DNA 染成绿

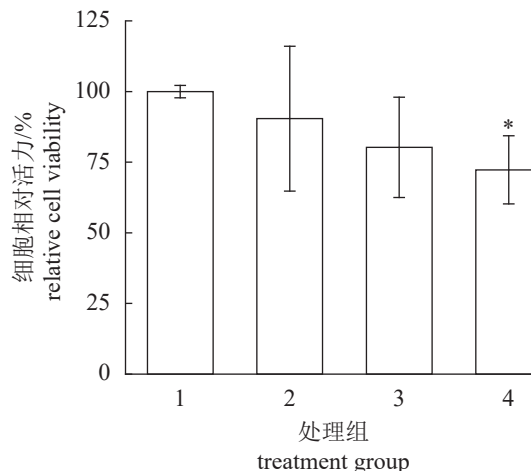


图 1 联苯菊酯诱导后皱纹盘鲍血细胞活力

1. 对照组, 2. 0.01 mg/L BF 组, 3. 0.10 mg/L BF 组, 4. 1.00 mg/L BF 组。与对照组相比, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, 下同。

Fig. 1 Cell viability of *H. discus hannai* hemocytes after bifenthrin stimulation

1. control group, 2. 0.01 mg/L BF group, 3. 0.10 mg/L BF group, 4. 1.00 mg/L BF group. Compared with control group, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, the same below.

色, 在不同浓度 BF 刺激下, 均可观察到细长纤维状绿色荧光结构 (图 2-a), 表明 BF 可诱导皱纹盘鲍血细胞释放 ETs。与对照组相比, 随着 BF 浓度增加, 绿色荧光结构有增多趋势 (图 2-b)。通过对 ETs 进行荧光强度定量分析, 发现 BF 可显著诱导 ETs 的产生, 且具有一定的剂量依赖关系。

2.3 ROS 相关基因表达分析

不同浓度 BF 刺激后, *pi3k* 表达量极显著上调, 分别为对照的 2.16 倍 ($P < 0.01$)、3.32 倍 ($P < 0.01$) 和 3.32 倍 ($P < 0.01$) (图 3-a)。在 0.01 mg/L BF 刺激下, *akt* 表达量极显著上调 ($P < 0.05$), 随着 BF 浓度的升高, *akt* 表达量进一步上调, 在 1.00 mg/L BF 刺激下达到最高, 为对照的 5.34 倍 ($P < 0.01$) (图 3-b)。在 0.01 mg/L BF 刺激下, *hif-1α* 的表达量与对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 但随着 BF 浓度的增加, *hif-1α* 表达量极显著升高 ($P < 0.01$), 且同样在 1.00 mg/L 刺激时升高最为显著, 为对照的 11.63 倍 (图 3-c)。

2.4 对 ROS 生成量的影响

通过流式细胞术检测皱纹盘鲍血细胞 ROS 的生成量。与对照组相比, 在 BF 刺激血细胞形成 ETs 的过程中, ROS 的生成量有升高的趋势 (图 4-a)。通过对 ROS 的荧光强度进行定量分析, 发现随着

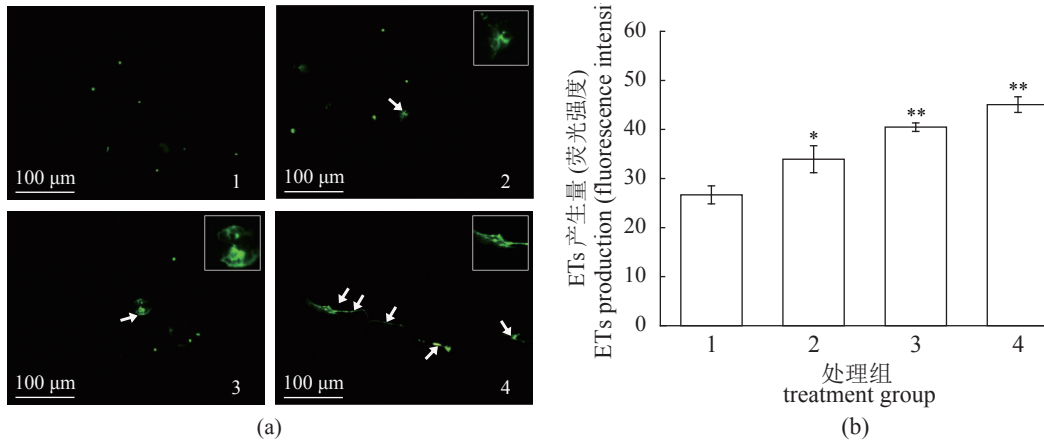


图 2 联苯菊酯诱导血细胞释放 ETs

(a) 联苯菊酯诱导血细胞 ETs 生成量, 箭头表示 ETs 的纤维状结构。(b) 联苯菊酯诱导血细胞 ETs 生成量定量分析。

Fig. 2 Hemocytes release ETs induced by bifenthrin

(a) ETs production of hemocytes induced by bifenthrin, arrows indicated the fibrous structure of ET. (b) quantitative analysis of ET production in hemocytes induced by bifenthrins.

BF 刺激浓度的增加, ROS 的生成量显著升高, 且具有一定的剂量依赖关系 (图 4-b)。

2.5 ROS 抑制剂对 ETs 发生的影响

在未加入 ROS 抑制剂 DPI 的情况下, ETs 的生成量极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。在抑制剂处理组中, 虽然 BF 刺激后 ETs 的生成量同样高于对照组 ($P < 0.05$), 但与未使用 DPI 处理组相比, 血细胞 ETs 的生成量显著降低 ($P < 0.05$) (图 5)。

2.6 *pk* 和 *hk* 的基因表达分析

与对照组相比, 当 BF 刺激浓度为 0.01 和 0.10 mg/L 时, *pk* 的表达量显著升高 ($P < 0.05$), 在 1.00 mg/L 刺激下表达量最高 ($P < 0.01$) (图 6-a)。*hk* 的表达量在所有刺激浓度下均极显著升高 ($P < 0.01$), 且在 1.00 mg/L 刺激下表达量最高 (图 6-b)。

3 讨论

3.1 联苯菊酯对皱纹盘鲍血细胞活力的影响

已有大量研究表明, 在水生脊椎动物中, BF 可以对斑马鱼 (*Danio rerio*)、尼罗罗非鱼、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 造成毒害作用^[30-32]。然而, BF 对软体动物影响所知甚少, 仅有关于 BF 对河蚬 (*Corbicula fluminea*) 的毒性效应研究^[33]。关于 BF 是否会对皱纹盘鲍造成毒害作用及其应对机制还未见报道。皱纹盘鲍拥有半开放式的循环系统, 其中血细胞作为免疫系统的主要效应组织, 在抵御外来物质的侵袭和免疫应答中发挥重要作用。

当受到外来污染物侵袭时, 血细胞就会发挥免疫功能进行清除, 而超出其承受范围时就会导致血细胞密度下降, 细胞形态受损, 进而影响细胞活力^[34-35]。在本研究中, 皱纹盘鲍血细胞在受到 BF 刺激后细胞活力下降, 表明 BF 可能会破坏皱纹盘鲍血细胞的完整性, 从而对血细胞及细胞免疫造成一定的毒害作用。

3.2 联苯菊酯诱导皱纹盘鲍血细胞形成胞外陷阱

ETs 是机体免疫系统抵御外界不利环境刺激的细胞响应方式, 在脊椎动物中已经得到广泛的研究^[21-22]。近年来, 在长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、欧洲鲍 (*H. tuberculata*)、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 中也相继报道了 ETs 的存在, 然而多数研究仅限于 ETs 的功能与活性方面^[27, 36-37], 缺乏环境污染物影响贝类 ETs 形成的相关研究。在本实验中, 不同浓度 BF 对皱纹盘鲍血细胞进行体外胁迫时, 血细胞可以形成 ETs。这与杀虫剂二嗪农和除草剂阿特拉津诱导鲤中性粒细胞释放 ETs 的结果相似^[20, 38]。此外, 在对小鼠 (*Mus musculus*) 的研究中发现, ETs 的形成扰乱先天免疫反应, 从而增加肺部损伤和纤维化的风险^[39]。在使用不同浓度 BF 刺激时, ETs 的形成随着刺激浓度升高而加剧, 表现出一定的剂量依赖效应。上述结果表明, BF 可能通过干扰贝类细胞胞外陷阱的形成, 从而影响细胞免疫反应过程。

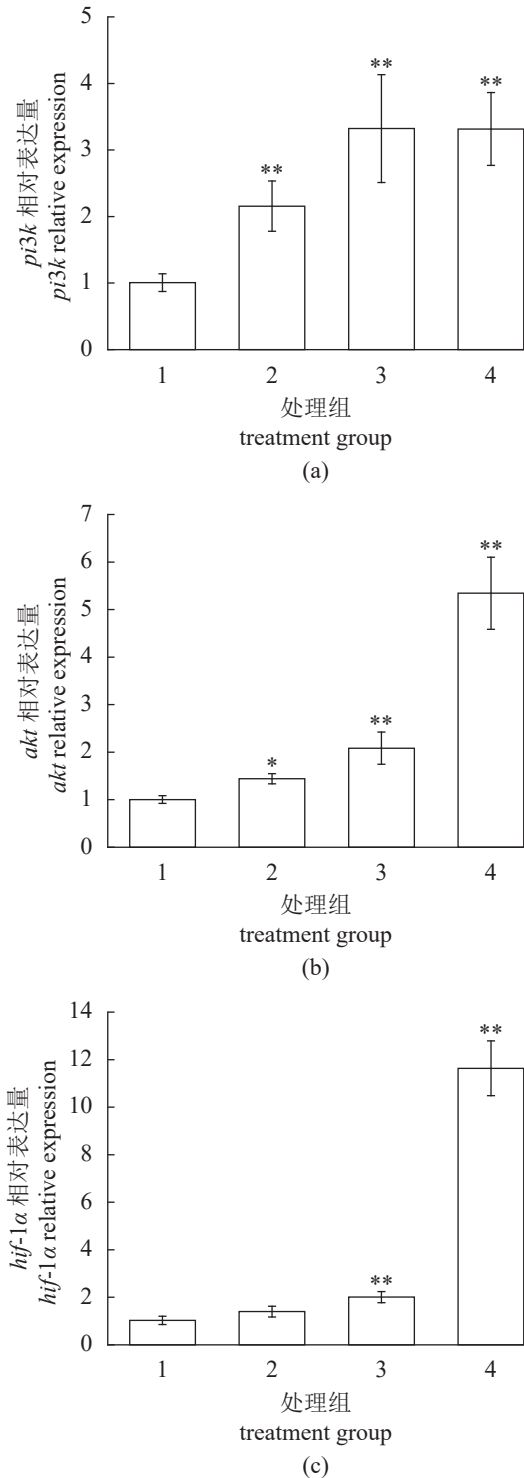


图3 联苯菊酯诱导的血细胞中 ROS 相关基因表达
Fig. 3 Expression of ROS-related genes in hemocytes induced by bifenthrin

(a) *pi3k*, (b) *akt*, (c) *hif-1α*.

3.3 ROS 对胞外陷阱发生的影响

作为氧化应激的重要指标之一, ROS 已被广

泛用于外源有毒污染物引起的氧化损伤研究^[40]。正常情况下, 生物体内的 ROS 水平维持在一个动态平衡状态, 这对维持细胞生理功能和免疫功能至关重要^[41]。然而, 当细胞受到外源刺激时, ROS 水平会升高^[42]。在河蚬的研究中发现, 当在 25 μg/L 的 BF 中暴露时, 消化腺中 ROS 水平显著升高^[33]。同样, 本实验中皱纹盘鲍血细胞在 BF 刺激下 ROS 水平也显著升高, 初步表明 BF 会对皱纹盘鲍血细胞造成一定的氧化损伤。

磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 通路在细胞增殖、凋亡等方面发挥重要作用^[43]。如, 染料木素通过抑制 ROS 依赖的 PI3K/AKT 信号转导途径诱导 T24 细胞的细胞周期停滞和凋亡^[44]。PI3K/AKT 途径在缺氧条件下通过增强糖酵解促进成纤维细胞增殖^[45]。在抑制剂作用下, PI3K/AKT 信号通路被抑制后, 肿瘤细胞的增殖被抑制, 并诱导细胞凋亡^[46]。研究表明, ROS 被认为是能够上调 PI3K/AKT 信号通路的细胞内第二信使^[47], 而 PI3K/AKT 通路的激活可以促进 ETs 的形成^[48]。本实验推测, 在 BF 刺激下, ROS 水平的升高激活 PI3K/AKT 通路, 导致 PI3K 和 AKT 表达量升高, 进而促进 ETs 的形成。综上, 推测 PI3K/AKT 通路可能参与到 BF 诱导的皱纹盘鲍血细胞 ETs 的形成。此外, ROS 水平升高会激活雷帕霉素靶蛋白 (mTOR), 进而对下游信号 HIF-1α 进行调节^[49]。在人 (*Homo sapiens*) 和小鼠肥大细胞的研究中发现, HIF-1α 可以促进 ETs 形成^[50]。本实验中, *hif-1α* 表达量随 BF 刺激浓度的增加而显著升高, 推测 HIF-1α 也参与到 BF 诱导 ETs 的形成。

ROS 的生成受到 NADPH 氧化酶的严格调控^[51], 在污染物的刺激下, NADPH 氧化酶的活化会导致机体内 ROS 水平升高^[52]。基于 NADPH 氧化酶参与调控与否, 将 ETs 形成机制分为两类, 即 NADPH 氧化酶依赖型和非 NADPH 氧化酶依赖型^[53]。例如, 人中性粒细胞在细菌的刺激下, 依赖 NADPH 氧化酶形成 ETs, 但在离子霉素刺激下, 无需 NADPH 氧化酶参与就可形成 ETs^[54]。在对菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)^[23]、紫贻贝 (*Mytilus edulis*)^[55] 的研究中发现, 当使用 DPI 抑制 NADPH 氧化酶后, ROS 和 ETs 的生成均显著降低。这与本研究中加入 DPI 后 ETs 的生成量显著降低的结果一致。综上所述, BF 诱导下

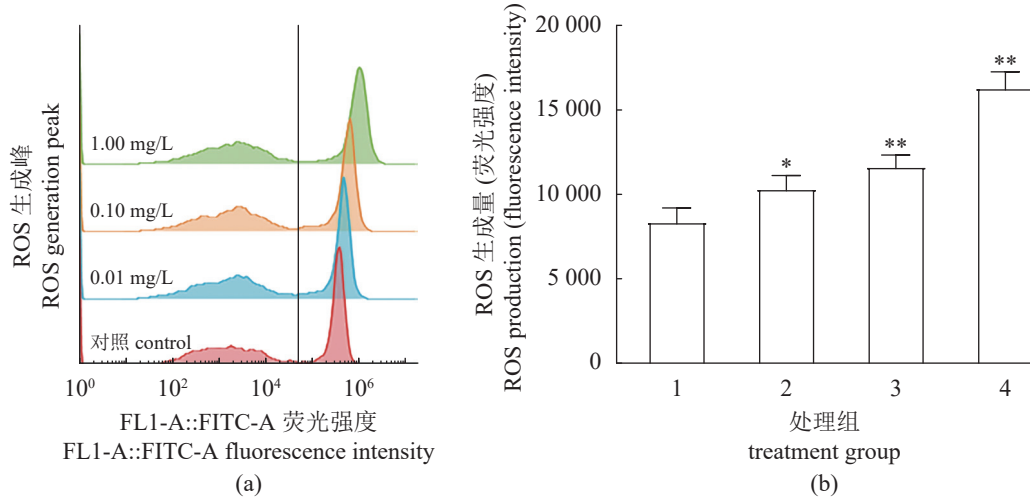


图 4 联苯菊酯对血细胞中 ROS 生成量的影响

(a) ROS 生成量峰面积, (b) ROS 定量分析。

Fig. 4 Effect of bifenthrin on ROS production in hemocytes

(a) ROS generation peak area, (b) quantitative analysis of ROS.

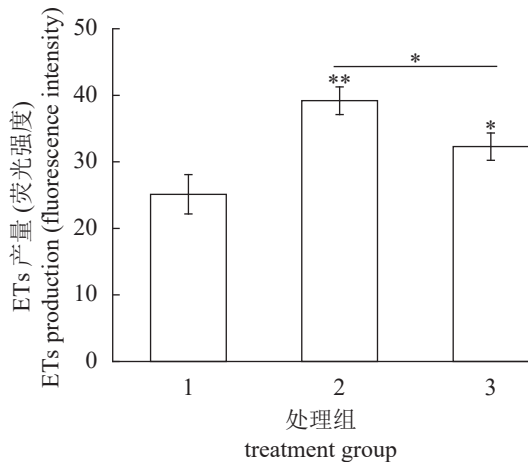


图 5 ROS 抑制剂 DPI 对联苯菊酯诱导的血细胞 ETs 的抑制作用

1. 对照组, 2. 1.00 mg/L BF 组, 3. 1.00 mg/L BF+DPI 组。

Fig. 5 Effect of ROS inhibitor DPI on hemocyte ETs induced by bifenthrin

1. control group, 2. 1.00 mg/L BF group, 3. 1.00 mg/L BF+DPI group.

的皱纹盘鲍 ETs 依赖于 NADPH 氧化酶活化后 ROS 水平的提高。

3.4 糖酵解反应可能参与联苯菊酯诱导的胞外陷阱发生过程

ETs 在释放过程中一般伴随着能量的消耗, 且严格依赖于外源葡萄糖^[56]。在哺乳动物中, ETs 形成时所需的能量主要来自糖酵解反应^[57]。在菲律宾蛤仔^[23]中, 糖酵解反应也参与了胞外陷

阱的发生过程。一般而言, PK、HK 是糖酵解途径的两个限速酶^[38], 决定了糖酵解过程中能量的释放。本实验结果发现, 在 BF 刺激后皱纹盘鲍血细胞中 *pk*、*hk* 基因的表达量随着刺激浓度的增加而显著升高, 说明糖酵解反应可能是 BF 诱导的贝类胞外陷阱的能量来源之一。此外, ROS 暴发会加速糖酵解反应以维持底物供应。在本研究中, 随着 BF 胁迫浓度的提高, ROS 生成量及 ROS 相关基因表达量的变化与糖酵解相关基因的变化相似, 这与在菲律宾蛤仔^[21]中的研究结果一致, 表明糖酵解反应与 ROS 共同参与 BF 诱导下的胞外陷阱发生, 至于二者之间是否存在协同关系以及之间的内在关联尚需深入研究。

4 结论

本研究表明, BF 胁迫会对皱纹盘鲍血细胞造成一定的毒害作用。BF 可以诱导血细胞胞外陷阱现象发生, 且具有一定的剂量依赖性。此外, 与对照组相比, BF 显著诱导血细胞 ROS 水平升高, 同时, 随着 BF 浓度的升高, *pi3k* 表达量分别上调 2.16、3.32、3.32 倍, *akt* 表达量分别上调 1.44、2.08、5.34 倍, *hif-1α* 表达量分别上调 1.40、2.01 和 11.64 倍。在进一步的抑制实验中, 使用 DPI 抑制 ROS 的生成, 发现胞外陷阱的形成显著下降, 表明 BF 刺激下皱纹盘鲍血细胞胞外陷阱的形成依赖于 ROS 的产生。此外, 糖酵解相关基因表达

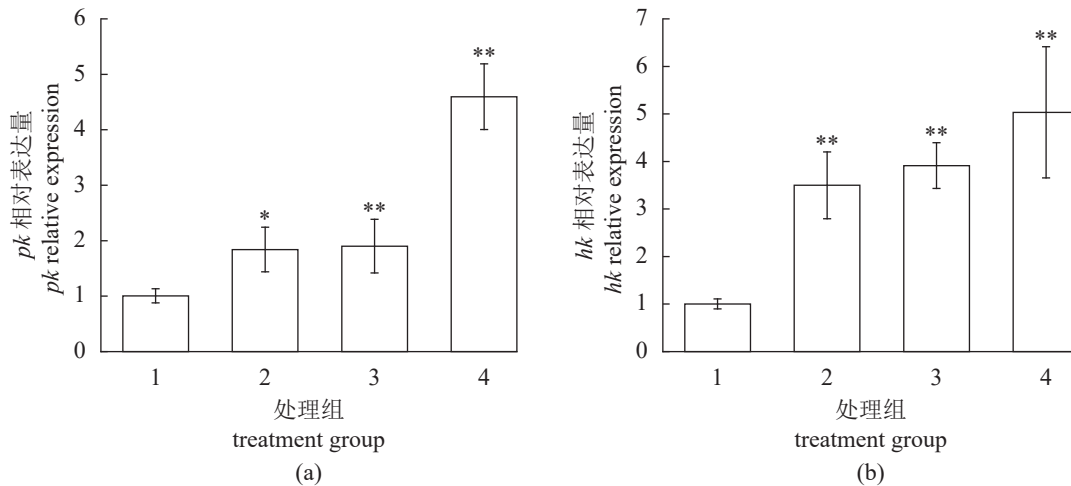


图 6 联苯菊酯诱导的血细胞中糖酵解相关基因的表达

Fig. 6 Expression of glycolysis related genes in hemocytes induced by bifenthrin

(a) *pk*, (b) *hk*.

量随着 BF 刺激浓度的增加而升高, 表明胞外陷阱在形成过程中, 部分能量可能通过糖酵解途径进行供能。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Awoyemi O M, Kumar N, Schmitt C, *et al.* Behavioral, molecular and physiological responses of embryo-larval zebrafish exposed to types I and II pyrethroids[J]. *Chemosphere*, 2019, 219: 526-537.
- [2] Guardiola F A, González-Párraga P, Meseguer J, *et al.* Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 120-129.
- [3] Farag M R, Alagawany M, Khalil S R, *et al.* Effect of parsley essential oil on digestive enzymes, intestinal morphometry, blood chemistry and stress-related genes in liver of Nile tilapia fish exposed to bifenthrin[J]. *Aquaculture*, 2022, 546: 737322.
- [4] Tang W X, Wang D, Wang J Q, *et al.* Pyrethroid pesticide residues in the global environment: an overview[J]. *Chemosphere*, 2018, 191: 990-1007.
- [5] Nkya T E, Akhouayri I, Kisinza W, *et al.* Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43(4): 407-416.
- [6] Gan J, Lee S J, Liu W P, *et al.* Distribution and persistence of pyrethroids in runoff sediments[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2005, 34(3): 836-841.
- [7] Yang Y, Wu N X, Wang C L. Toxicity of the pyrethroid bifenthrin insecticide[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2018, 16(4): 1377-1391.
- [8] Zheng S L, Chen B, Qiu X Y, *et al.* Distribution and risk assessment of 82 pesticides in Jiulong River and estuary in South China[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 1177-1192.
- [9] Fernández-Ramos C, Šatínský D, Solich P. New method for the determination of carbamate and pyrethroid insecticides in water samples using on-line SPE fused core column chromatography[J]. *Talanta*, 2014, 129: 579-585.
- [10] Hladik M L, Kuivila K M. Pyrethroid insecticides in bed sediments from urban and agricultural streams across the United States[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, 14(7): 1838-1845.
- [11] Vryzas Z, Alexoudis C, Vassiliou G, *et al.* Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece[J]. *Eco-toxicology and Environmental Safety*, 2011, 74(2): 174-181.
- [12] Li H Z, Mehler W T, Lydy M J, *et al.* Occurrence and distribution of sediment-associated insecticides in urban waterways in the Pearl River Delta, China[J]. *Chemosphere*, 2011, 82(10): 1373-1379.
- [13] Feo M L, Ginebreda A, Eljarrat E, *et al.* Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta[J]. *Journal of Hydrology*, 2010, 393(3-4): 156-162.
- [14] Brander S M, Jeffries K M, Cole B J, *et al.* Transcriptional changes underlie altered egg protein production and reduced fecundity in an estuarine model fish exposed to bifenthrin[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 174: 247-260.
- [15] Han J J, Ji C, Guo Y C, *et al.* Mechanisms underlying

- melatonin-mediated prevention of fenvalerate-induced behavioral and oxidative toxicity in zebrafish[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2017, 80(23-24): 1331-1341.
- [16] Magnuson J T, Hartz K E H, Fulton C A, *et al.* Transcriptomic and histopathological effects of bifenthrin to the brain of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Toxics*, 2021, 9(3): 48.
- [17] Velisek J, Svobodova Z, Machova J. Effects of bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2009, 35(4): 583-590.
- [18] Bhattacharya M, Berends E T M, Chan R, *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(28): 7416-7421.
- [19] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1532-1535.
- [20] Covantes-Rosales C E, Toledo-Ibarra G A, González-Navarro I, *et al.* Diazinon acute exposure induces neutrophil extracellular traps in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2020, 31(1): 1004-1013.
- [21] Hong H R, Liu Z Y, Li S Q, *et al.* Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) exhibit immune toxicity to crucian carp (*Carassius carassius*) by neutrophil extracellular traps (NETs) release and oxidative stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 129: 22-29.
- [22] Li S W, Wang Y L, Yu D K, *et al.* Triclocarban evoked neutrophil extracellular trap formation in common carp (*Cyprinus carpio* L.) by modulating SIRT3-mediated ROS crosstalk with ERK1/2/p38 signaling[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 129: 85-95.
- [23] Han Y J, Chen L Z, Zhang Q Q, *et al.* Hemocyte extracellular traps of Manila clam *Ruditapes philippinarum*: production characteristics and antibacterial effects[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 116: 103953.
- [24] Zhou L Q, Zhao D, Wu B, *et al.* Ark shell *Scapharca broughtonii* hemocyte response against *Vibrio anguillarum* challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 304-311.
- [25] Huang Q S, Yu M J, Chen H M, *et al.* LRFN (leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein) recognizes bacteria and promotes hemocytic phagocytosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 622-628.
- [26] Tame A, Yoshida T, Ohishi K, *et al.* Phagocytic activities of hemocytes from the deep-sea symbiotic mussels *Bathymodiolus japonicus*, *B. platifrons*, and *B. septemdiarium*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(1): 146-156.
- [27] Poirier A C, Schmitt P, Rosa R D, *et al.* Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(36): 24821-24831.
- [28] 邓钦有, 杨顶珑, 何金霞, 等. 皱纹盘鲍稚鲍对海水酸化与溴氰菊酯复合胁迫的响应 [J]. *水产学报*, 2022, 46(11): 2097-2106.
- [29] Deng Q Y, Yang D L, He J X, *et al.* Response of juvenile abalone of *Haliotis discus hannai* to the combined stress of ocean acidification and deltamethrin[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(11): 2097-2106 (in Chinese).
- [30] Patel S, Kumar S, Jyoti A, *et al.* Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation[J]. *Nitric Oxide*, 2010, 22(3): 226-234.
- [31] Ji C Y, Tanabe P, Shi Q Y, *et al.* Stage dependent enantioselective metabolism of bifenthrin in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(13): 9087-9096.
- [32] Farag M R, Alagawany M, Taha H S A, *et al.* Immune response and susceptibility of Nile tilapia fish to *Aeromonas hydrophila* infection following the exposure to bifenthrin and/or supplementation with *Petroselinum crispum* essential oil[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 216: 112205.
- [33] Crago J, Schlenk D. The effect of bifenthrin on the dopaminergic pathway in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 162: 66-72.
- [34] Zhang H, Hong X S, Yan S H, *et al.* Environmentally relevant concentrations of bifenthrin induce changes in behaviour, biomarkers, histological characteristics, and the transcriptome in *Corbicula fluminea*[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 728: 138821.
- [35] Kumar A, Sasmal D, Bhaskar A, *et al.* Deltamethrin-induced oxidative stress and mitochondrial caspase-dependent signaling pathways in murine splenocytes[J]. *Environmental Toxicology*, 2016, 31(7): 808-819.
- [36] Ray M, Bhunia A S, Bhunia N S, *et al.* Density shift, morphological damage, lysosomal fragility and apoptosis of hemocytes of Indian molluscs exposed to pyrethroid pesticides[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 622-628.

- 2013, 35(2): 499-512.
- [36] Mottier A, Serpentine A, Dallas L, *et al.* *In vitro* effects of glyphosate-based herbicides and related adjuvants on primary culture of hemocytes from *Haliotis tuberculata*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 100: 1-8.
- [37] Koiwai K, Alenton R R R, Kondo H, *et al.* Extracellular trap formation in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) hemocytes is coupled with c-type lysozyme[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 52: 206-209.
- [38] Wang S C, Zheng S F, Zhang Q J, *et al.* Atrazine hinders PMA-induced neutrophil extracellular traps in carp via the promotion of apoptosis and inhibition of ROS burst, autophagy and glycolysis[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 243: 282-291.
- [39] Wang W L, Liu Z Y, Zhang Y, *et al.* Benzyl butyl phthalate (BBP) induces lung injury and fibrosis through neutrophil extracellular traps[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 309: 119743.
- [40] Aouey B, Derbali M, Chtourou Y, *et al.* Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(6): 5841-5856.
- [41] Redza-Dutordoir M, Averill-Bates D A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2016, 1863(12): 2977-2992.
- [42] Zhou D H, Shao L J, Spitz D R. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells[J]. *Advances in Cancer Research*, 2014, 122: 1-67.
- [43] Zhang J X, Wang X L, Vikash V, *et al.* ROS and ROS-mediated cellular signaling[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016: 4350965.
- [44] Park C, Cha H J, Lee H, *et al.* Induction of G2/M Cell cycle arrest and apoptosis by genistein in human bladder cancer T24 cells through inhibition of the ROS-dependent PI3k/Akt signal transduction pathway[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(9): 327.
- [45] Wang Q F, Yang X, Ma J X, *et al.* PI3K/AKT pathway promotes keloid fibroblasts proliferation by enhancing glycolysis under hypoxia[J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2023, 31(2): 139-155.
- [46] Zhu L, Derijard B, Chakrabandhu K, *et al.* Synergism of PI3K/Akt inhibition and Fas activation on colon cancer cell death[J]. *Cancer Letters*, 2014, 354(2): 355-364.
- [47] Fojtík P, Beckerová D, Holomková K, *et al.* Both hypoxia-inducible factor 1 and MAPK signaling pathway attenuate PI3K/AKT via suppression of reactive oxygen species in human pluripotent stem cells[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 8: 607444.
- [48] Zha C J, Meng X Q, Li L L, *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate the crosstalk between glioma progression and the tumor microenvironment via the HMGB1/RAGE/IL-8 axis[J]. *Cancer Biology & Medicine*, 2020, 17(1): 154-168.
- [49] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini D M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 12(1): 21-35.
- [50] Branitzki-Heinemann K, Okumura C Y, Vollger L, *et al.* A novel role for the transcription factor HIF-1 α in the formation of mast cell extracellular traps[J]. *Biochemical Journal*, 2012, 446(1): 159-163.
- [51] Papayannopoulos V, Metzler K D, Hakkim A, *et al.* Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 191(3): 677-691.
- [52] Li S W, Ma Y, Ye S Z, *et al.* ERK/p38/ROS burst responses to environmentally relevant concentrations of diphenyl phosphate-evoked neutrophil extracellular traps formation: assessing the role of autophagy[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 421: 126758.
- [53] Cubillo-Martínez A A, Pereyra M A, Garfias Y, *et al.* Extracellular traps involved in invertebrate immune mechanisms[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 121: 380-386.
- [54] Parker H, Dragunow M, Hampton M B, *et al.* Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2012, 92(4): 841-849.
- [55] Robb C T, Dyrinda E A, Gray R D, *et al.* Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4627.
- [56] Rodríguez-Espinosa O, Rojas-Espinosa O, Moreno-Altamirano M M B, *et al.* Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation[J]. *Immunology*, 2015, 145(2): 213-224.
- [57] Chacko B K, Wall S B, Kramer P A, *et al.* Pleiotropic effects of 4-hydroxynonenal on oxidative burst and phagocytosis in neutrophils[J]. *Redox Biology*, 2016, 9: 57-66.

Effects of bifenthrin on the formation of extracellular traps in hemocytes of *Haliotis discus hannai*

HUA Shaomeng^{1,2,3}, CHEN Lizhu², YANG Dinglong^{3*}, LÜ Xiaojing³,
LIU Xiangquan², HE Jinxia², LI Xuan²

(1. College of Fishers and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology,

Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China;

3. Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract: Bifenthrin (BF) is widely used in agricultural production due to its excellent environmental stability and insecticidal activity, resulting in its widespread residue in the environment. In recent years, BF has been frequently detected in coastal areas of China, which would harm aquatic organisms. Extracellular traps play an important role in innate immunity in molluscs. However, knowledge of the formation of ETs is still limited in the marine mollusks induced by environmental contaminants so far. This study aimed to investigate the effects of bifenthrin on the formation of extracellular traps in hemocytes of *Haliotis discus hannai*. Here, *H. discus hannai*, with an average shell length of approximately 60 mm, was collected from a local farm and maintained in aerated seawater (temperature 20-22 °C; salinity 28-30) for a week before processing. Then hemocytes were obtained and stimulated by BF (0, 0.01, 0.10 and 1.00 mg/L) for an hour. The results showed that the cell viability of hemocytes decreased to 90.40%, 80.22% and 72.28%, respectively, in a dose-dependent manner. Meanwhile, observed formation of ETs outside hemocytes induced by BF, quantitative analysis revealed the amount of ETs formation significantly increases in a dose-dependent manner, compared to the control group. A more abundant structure of ETs could be induced by 1 mg/L BF. Furthermore, the mRNA expressions of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and protein kinase B (Akt) were significantly upregulated in a similar trend in response to the BF-induced reactive oxygen species (ROS) burst and hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) increased significantly (except 0.10 mg/L). Notably, we detected an increase of ROS production during ETs. Quantitative analysis revealed that ROS production increased significantly with the increased BF concentration, as well as in a dose-dependent manner. Furthermore, the formation of ETs was blocked with the inhibition of ROS production by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase inhibitor (DPI). Meanwhile, the mRNA expression of pyruvate kinase (PK) and hexokinase (HK) was significantly elevated, indicating that during the formation of extracellular traps, part of the energy was supplied by the glycolytic pathway. In summary, stimulation by bifenthrin causes toxic effects on *H. discus hannai* hemocytes, which in turn exert immune functions through the formation of ETs. The ROS-mediated mediates the formation of ETs, and the PI3K/AKT signaling pathway. HIF-1 α , is involved in the formation of ETs, meanwhile energetically supplied by glycolysis. This study preliminarily explored the response of hemocytes of *H. discus hannai* under BF stress to ETs, to provide a reference for further research on the immune response of hemocytes in shellfish and expand the understanding of environmental pesticide residues on cellular immune toxicity.

Key words: *Haliotis discus hannai*; gene expression; ROS; bifenthrin; extracellular traps; cellular immune

Corresponding author: YANG Dinglong. E-mail: dlyang@yic.ac.cn

Funding projects: Shandong Provincial Thoroughbred Project (2017LZGC009); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020QD097); National Natural Science Foundation of China (42176141, 41806196)