水产学报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA
DOI: 10.11964/jfc.20241014717
Science Press

黄晓曼, 李宁静, 杨琰, 等. 食源性铁过载诱导草鱼肝细胞的损伤机制 [J]. 水产学报, 2026, 50(1): 019415.
Huang X M, Li N J, Yang Y, *et al*. Mechanism of dietary iron overload inducing hepatocyte damage in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2026, 50(1): 019415 (in Chinese).

食源性铁过载诱导草鱼肝细胞的损伤机制

黄晓曼，李宁静，杨　琰，宋佳玲，田　野，林　鑫*，秦真东*
(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：【目的】探讨食源性铁过载对草鱼肝脏的损失机制，揭示其在铁代谢紊乱、氧化应激及炎症反应中的作用。**【方法】**选取体重为 50~80 g 的健康草鱼，分别在基础饲料中添加 0、400 和 800 mg/kg 的富马酸亚铁，连续投喂 60 d。其间测定鱼体生长性能、血清和肝脏中铁含量，以及红细胞压积、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 活性。采用 qRT-PCR 检测铁代谢及抗氧化相关基因表达变化。同时开展体外实验，以柠檬酸铁铵 (III)(FAC) 处理 L8824 细胞，检测细胞内铁和 ROS 水平及炎症、抗氧化等相关基因表达。**【结果】**富马酸亚铁过量摄入显著抑制草鱼体长增长，血清和肝脏中铁含量显著升高。ELISA 结果显示，红细胞压积、ALT、AST 和 GPX4 活性明显增加。qRT-PCR 结果表明，*tf*、*dmt*1、*hepcidin*、*fpn* 和 *ncoa*4 基因表达量显著上调，而 *tfR*1 和 *ferritin* 表达下调。抗氧化相关基因 *ho*-1、*gpx*4 和 *nrf*2 也在铁添加组中显著上调。体外实验中，FAC 处理导致细胞内铁和 ROS 水平升高，炎症相关基因如 *p*65、*tnf-α*、*nf-κb*、*tlr*4 等显著上调，同时氧化应激相关基因 *keap*1*a*、*nrf*2 和 *ho*-1 的表达量也显著上升。**【结论】**食源性铁过载可导致草鱼肝脏铁代谢紊乱、氧化应激增强并引发炎症反应。研究结果为草鱼铁代谢相关疾病及防控策略提供了理论支持。

关键词：草鱼；铁过载；铁代谢；氧化应激；炎症反应
中图分类号：S 943　　**文献标志码：**A

铁是一种多功能金属，是生物体必需的微量元素，能够通过含铁或与铁结合的蛋白质和酶参与细胞的生长与死亡机制。作为多种酶的辅助因子，铁主要以 4 种形式存在于蛋白质中，包括含铁非酶血红蛋白、参与 DNA 合成的铁硫簇蛋白、血红素蛋白酶以及非铁硫簇或血红素的含铁蛋白酶[1-3]。生物体内大部分生物活性铁会与红细胞中的血红蛋白结合，这种具有氧化还原活性的金属能够在不同价态之间转换。当铁以游离状态存在于机体内时，能够通过电子转移在二价和三价之间转变。Fe^{2+}虽然能与血红蛋白和许多酶形成活性化合物，但同时也能通过芬顿反应在细胞内产生自由基，从而引起细胞毒性。芬顿反应是指 Fe^{2+} 与 H_2O_2 反应生成 Fe^{3+}和羟基自由基 (·OH) 的过

收稿日期：2024-10-12　　**修回日期：**2025-07-02
资助项目：广东省基础与应用基础研究基金面上项目 (2023A1515012784)
第一作者：黄晓曼，从事水产动物铁代谢研究，E-mail：1468346942@qq.com
通信作者：林鑫，从事水产动物免疫学研究，E-mail：linli@zhku.edu.cn；
秦真东，从事水产动物基础免疫研究，E-mail：qinzhendongsc@163.com

程。·OH 能够与细胞质膜中的多不饱和脂肪酸反应，生成脂质过氧化物，最终导致细胞铁死亡和组织损伤[4-6]。

铁参与 DNA 修复、细胞线粒体呼吸、细胞生长和红细胞生成等生物过程，还助力免疫防御和细胞信号传递[7-8]。为了满足体内对铁的需求，机体一般通过两种途径获取铁：一种是从食物中摄入，另一种是通过脾脏、肝脏和骨髓中的巨噬细胞回收红细胞中 90%~95% 的铁[8-9]。摄入或储存的铁需要通过机体的铁代谢进行调控，以实现正常利用和代谢。铁代谢主要包括 5 个阶段：肠道吸收、体内转运、利用 (参与各种生化过程)、储存 (主要储存在肝脏和巨噬细胞) 以及肾脏排泄[1, 10-11]。机体摄入的食源性铁主要以血红素铁和非血红素铁两种形式存在。其中，非血红素铁 (Fe^{3+}) 在被吸收之前需要通过肠道十二指肠的细胞色素 B(DCYTB) 还原为 Fe^{2+}，然后在二价金属转运蛋白 (DMT1) 的帮助下转运至循环系统[12]。到达循环系统的 Fe^{2+}会被亚铁氧化酶 (HP) 和铜蓝蛋白氧化为 Fe^{3+}，与转铁蛋白 (Tf) 结合形成转铁蛋白结合铁。转铁蛋白结合铁再与转铁蛋白受体 (TfR1) 结合，从胞外进入细胞。进入细胞的铁由金属还原酶 (STEAP3) 还原为 Fe^{2+}，部分铁进入线粒体参与各种生化反应，另一部分以铁蛋白的形式稳定储存，还有一部分通过膜铁转运蛋白 (FPN1) 排出细胞[13-15]。当摄入过量的铁时，体内的铁含量可能超出转铁蛋白的结合能力，出现非转铁蛋白结合铁 (NTBI)。NTBI 中含有氧化还原活性成分，即不稳定性血浆铁 (LPI)，LPI 容易被组织吸收，导致铁的沉积并产生毒性效果。过量进入细胞的铁可能形成不稳定铁池 (LIP)，从而引发芬顿反应，产生大量活性氧 (ROS)，严重时可能导致细胞铁死亡[16-17]。

铁调素 (Hepcidin) 是铁代谢调节的核心，它是一种富含半胱氨酸的抗菌肽，主要在肝脏中合成和分泌[11]。Hepcidin 通过两种机制与唯一的铁输出蛋白 (FPN1) 相互作用：一是阻断 FPN1 的外部开放，二是诱导 FPN1 的内吞和降解，最终导致细胞内铁的滞留，从而减少体内铁的循环量[18-20]。Hepcidin 异常升高会导致全身性缺铁和阻碍红细胞生成，而全身性缺铁在缺铁或铁过载期间无法得到有效调节。循环铁浓度的稳定需要通过食源性铁的吸收、储存和再循环来维持[17]。当机体处于铁过载状态时，肝脏合成 Hepcidin 的量增加，从而抑制膜铁转运蛋白的功能，使体内铁循环量减少。由于肝脏是主要的铁储存场所，未与转铁蛋白结合的铁以 NTBI 的形式被肝脏迅速吸收，形成铁沉积，而铁的积累则可能引起肝脏的氧化损伤[21-22]。

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国重要的淡水养殖品种，其产量长期位居我国淡水鱼产量之首。某些养殖户为盲目追求产量，会在实际养殖过程中添加过量饲料，饲料中过量的铁会引起血液和组织的氧化应激[23-25]。但是目前关于食源性铁过载对草鱼生长及组织的损伤作用相关研究尚不清楚。因此，本研究以草鱼为对象，通过在饲料中添加不同含量的富马酸亚铁，从体内体外探究食源性铁过载对草鱼的影响作用。本研究结果将丰富水产养殖动物中铁代谢生物学基础，也为草鱼的健康养殖提供一定的依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

基础饲料购自中国通威股份有限公司；富马酸亚铁购自中国科伦多食品配料有限公司；柠檬酸铁铵 (III)(FAC)、DCFH-DA 购自美国 Sigma-Aldrich 公司；M199 培养基购自美国 Gibco 公司；胎牛血清 (FBS) 购自美国 Cytiva 公司；FeRhoNox-1 购自日本 GORYO Chemical 公司；4% 多甲醛购自美国 Biosharp Life Sciences 公司。

1.2　实验对象

草鱼幼鱼 [(50.0±5.0) g，(17.0±0.5) cm)] 购自广东某养鱼场。实验前，将鱼在装有过滤和充气淡水的水槽中，在 (29±1.0) ℃ 的温度下驯化 2 周。将鱼随机分为 3 组，每组 9 尾。使用富马酸亚铁作为日粮中的额外铁源，制备额外添加不同浓度富马酸亚铁 (0、400、800 mg/kg) 的日粮，分别对应低、中、高铁浓度组。持续投喂草鱼，在投喂至 60 d 时采集血液和肝脏样品。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范，并按照仲恺农业工程学院动物科技学院伦理委员会制定的规章制度执行。

1.3　生长性能

记录草鱼的体重和体长，通过计算增重率 (WGR)、特定生长率 (SGR)、长度生长率 (LGR) 分析其生长性能，计算公式：

$$WGR(\%) = (W_t - W_0)/W_0 \times 100\%$$

$$SGR(\%) = \ln(W_t - W_0)/t \times 100\%$$

$$LGR(\%) = (L_t - L_0)/L_0 \times 100\%$$

式中，t 为投喂天数，W_0 为初始体重 (g)，W_t 为实验第 t 天的体重 (g)；L_0 为初始体长 (cm)，L_t 为实验第 t 天的体长 (cm)。

1.4　组织学观察

为了解食源性铁过载对草鱼肝脏的影响，分别从 0、400、800 mg/kg 组中采集肝脏组织，并用 4% 多聚甲醛固定至少 12 h。随后，送塞维尔生物科技有限公司进行石蜡包埋以及苏木精-伊红 (H.E) 染色，在显微镜下观察肝脏组织的结构变化情况，使用 Adobe Illustrator 软件标出损伤部位。

1.5　细胞系和细胞培养

草鱼肝细胞 L8824 由华中农业大学苏建国教授捐赠。细胞于含 10% 胎牛血清、100 μmol/L 青霉素和 100 μmol/L 链霉素的 M199 培养基中培养，并置于含有 5% CO_2 的 28 ℃ 培养箱中。

1.6　总 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 分析

根据 SYBR 实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)，使用定量实时聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测所收集样品中相关基因的表达情况。简言之，在 12 孔板中过夜培养的 L8824 细胞，分别用不同浓度的 FAC (0、250、500 μmol/L) 处理 6 和 12 h 后收集。随后，通过 RNAiso 试剂 (TaKaRa，大连) 从处理过的 L8824 细胞和肝脏组织中提取总 RNA，以检测靶 mRNA 的表达水平。根据制造商说明书 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)，将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA，接着对所得的 cDNA 进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 循环程序：95 °C 5 min，随后进行 95 °C 15 s 和 60 °C 30 s 的 40 次循环。所有反应设置 3 个重复，以 β-actin 作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因表达差异。

1.7　细胞 Fe^{2+}、总 ROS 的检测

经过 FAC 孵育后，检测 L8824 细胞中的 Fe^{2+} 和 ROS 水平，包括总 ROS、脂质过氧化和线粒体 ROS。将 L8824 细胞 (4×10^5 个/mL) 接种于 6 孔板中，过夜培养，之后分别用 FAC (0、250、500 μmol/L) 孵育 6 和 12 h。使用荧光探针 DCFH-DA 和 FeRhoNox-1 孵育 30 min，并通过荧光显微镜记录结果；最后使用 ImageJ 软件分析荧光显微镜图像的平均荧光强度。

1.8　数据分析

使用 GraphPad Prism 8.1 和 SPSS 17.0 软件对数据进行单因素方差分析 (ANOVA)。所示数据代表了 3 个独立实验的平均值。

2　结果

2.1　日粮中富马酸亚铁的增加对草鱼生长性能和肝脏的影响

为研究不同浓度富马酸亚铁对草鱼生长的影响，在饲喂持续 60 d 后，记录草鱼的体重和体长，并分别计算各组在实验结束时的 WGR、SGR 和 LGR。中铁浓度组和高铁浓度组与低铁浓度组相比，WGR 和 SGR 没有显著性变化，但高铁浓度组的 LGR 显著降低 ($P < 0.05$) (图 1)。H.E 染色结果显示，低铁浓度组的草鱼肝脏结构完好，细胞排列有序；中铁浓度组开始出现细胞空泡化现象，而高铁浓度组的细胞空泡化现象更加严重，肝脏组织结构受到明显损伤 (图版 Ⅰ)。

2.2　高浓度富马酸亚铁诱导草鱼肝脏的氧化损伤

为了探究日粮中添加过量富马酸亚铁对草鱼体内铁含量及氧化应激的影响，首先检测了鱼的血清铁含量、总铁结合力 (TIBC) 和红细胞压积 (PCV) 的变化，随后检测了血清和肝脏中的相关损伤指标及抗氧化酶活性。结果显示，虽然血清铁含量无显著性差异 ($P > 0.05$)，但呈上升趋势 (图 2-a)。TIBC 随富马酸亚铁浓度增加先上升后下降，且与低铁浓度组相比差异极显著 ($P < 0.01$，图 2-b)。PCV 在高铁浓度组与低铁浓度组存在极显著差异 ($P < 0.01$)，而中铁浓度组则无显著性差异 ($P > 0.05$，图 2-c)。图 2-d~f 显示，随着日粮中铁浓度的升高，血清中的脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 含量显著降低，谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 的活性极显著升高 ($P < 0.01$)。高铁浓度组血清中过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX4) 活性极显著升高 ($P < 0.01$)，而中铁浓度组则无显著性差异 ($P > 0.05$)(图 2-g~h)。随着日粮中富马酸亚铁含量的增加，草鱼肝脏中的铁含量极显著升高 ($P < 0.01$，图 2-i)。肝脏中的 MDA 含量随铁浓度增加而升高，高铁浓度组差异

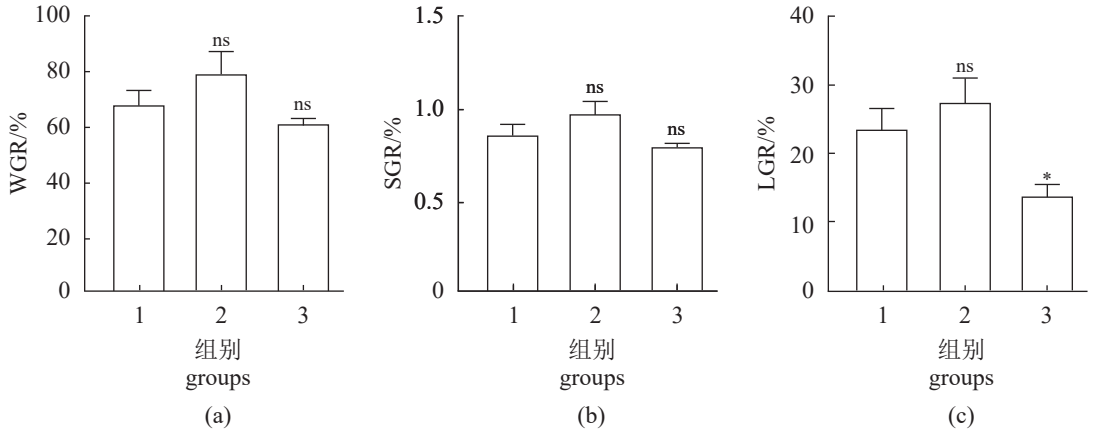
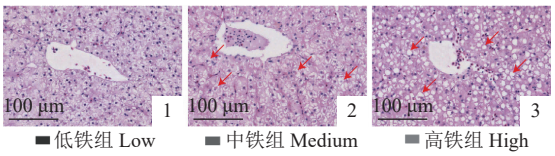


图 1　投喂富马酸亚铁对草鱼生长指标的影响

1.低铁组，2.中铁组，3.高铁组，图 2 和图 3 同。*. $P<0.05$，**. $P<0.01$，ns. $P>0.05$，下同。

Fig. 1　Effect of feeding ferrous fumarate on the growth performance of *C. idella*

1. low iron group, 2. medium iron group, 3. high iron group, the same as Fig.2 and Fig.3. *. $P<0.05$，**. $P<0.01$, ns. $P>0.05$, the same below.



图版 Ⅰ　投喂富马酸亚铁对草鱼肝脏组织学的影响

1.低铁组，2.中铁组，3.高铁组。红色箭头指示空泡化细胞。

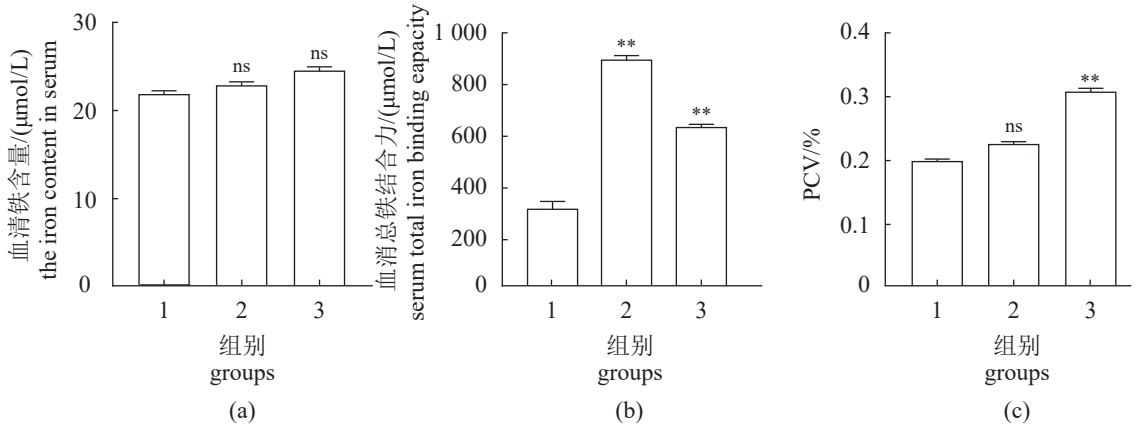
Plate Ⅰ　Effect of feeding ferrous fumarate on histology in liver of *C. idella*

1. low iron group, 2. medium iron group, 3. high iron group. The red arrow indicates a vacuolated cell.

极显著 ($P<0.01$，图 2-j)。此外，肝脏中 ALT 和 AST 的活性在高铁浓度组显著升高，中铁浓度组的 ALT 和 AST 无显著性变化 (图 2-k~l)。肝脏中 CAT 活性随着铁浓度升高而极显著降低 ($P<0.01$)，GPX4 活性在中铁浓度组和高铁浓度组中均极显著升高 ($P<0.01$) (图 2-m~n)。

2.3　铁过载使肝脏铁代谢紊乱并激活抗氧化系统

随着日粮中铁含量的增加，草鱼肝脏逐渐处于铁过载状态 (图 2-i)。为进一步研究铁过载对草鱼肝脏的影响，实验检测了铁代谢相关基因和抗氧化相关基因的转录水平。在高铁浓度组中，*tf* 和 *dmt*1 的 mRNA 转录水平极显著上调 ($P<0.01$)，而 *tfR*1 的 mRNA 转录水平则随铁浓度增加显著下调 (图 3-a~c)；*hepcidin* 的 mRNA 转录水平随着铁浓度的升高呈现极显著上调 ($P<0.01$，图 3-d)；*fpn*1 在中铁浓度组和高铁浓度组中均极显著上调 ($P<0.01$，图 3-e)；*ferritin* 的转录水平则随着铁浓度的增加极显著下调 ($P<0.01$)。此外，介导铁蛋白自噬的核受体共激活因子 4 (*ncoa*4) 在高铁浓度组极显著上调 ($P<0.01$)，中铁浓度组则无显著差异 ($P>0.05$，图 3-f~g)。由于日粮中铁含量的增加对草鱼肝脏造成损伤并影响酶活性，因此实验进



(图 2　Fig . 2)

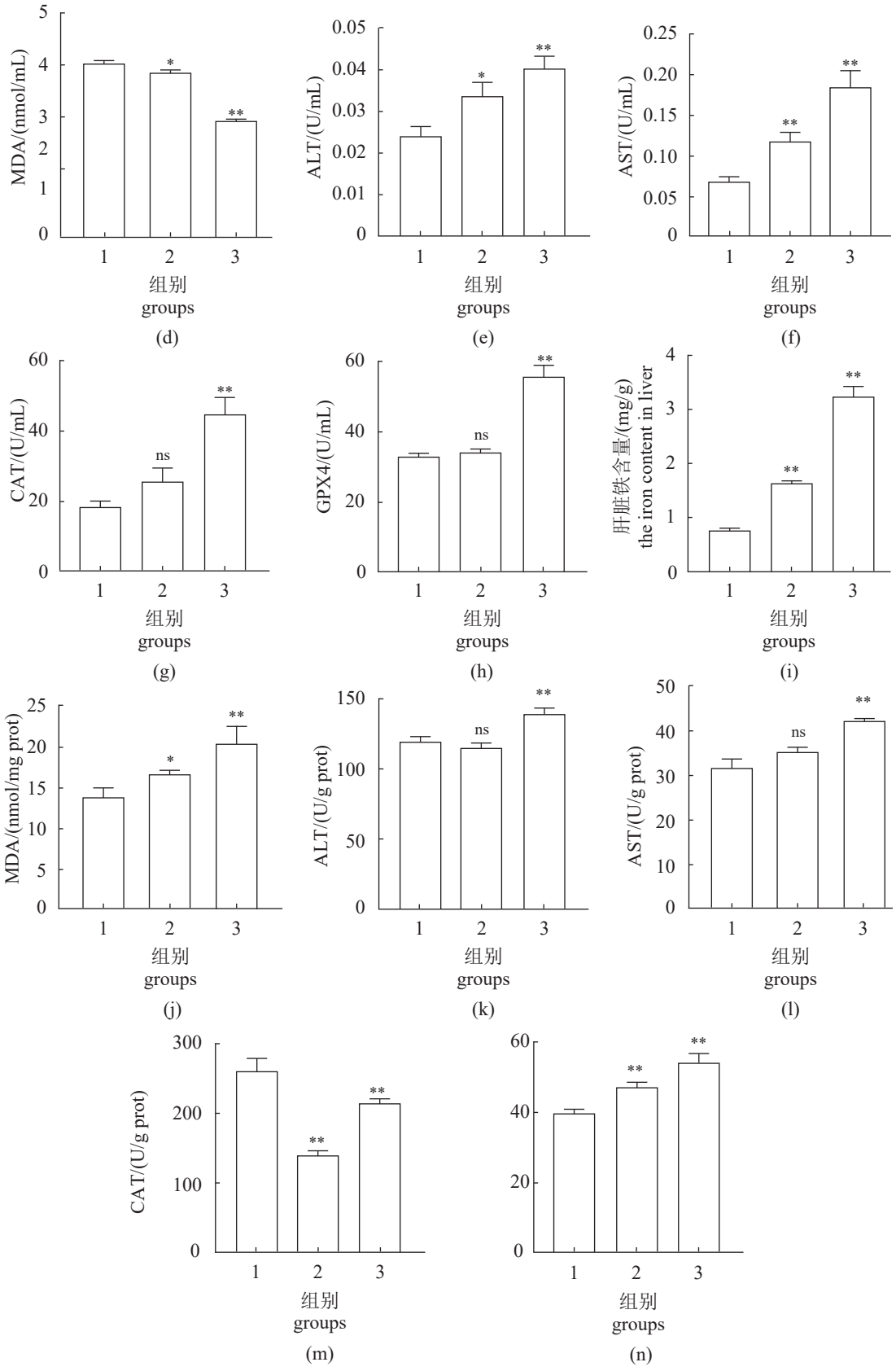


图 2　投喂富马酸亚铁对草鱼血清 (a~h) 和肝脏 (i~n) 的影响

Fig. 2　Effects of ferros fumarate on serum (a-h) and livers (i-n) of *C. idella*

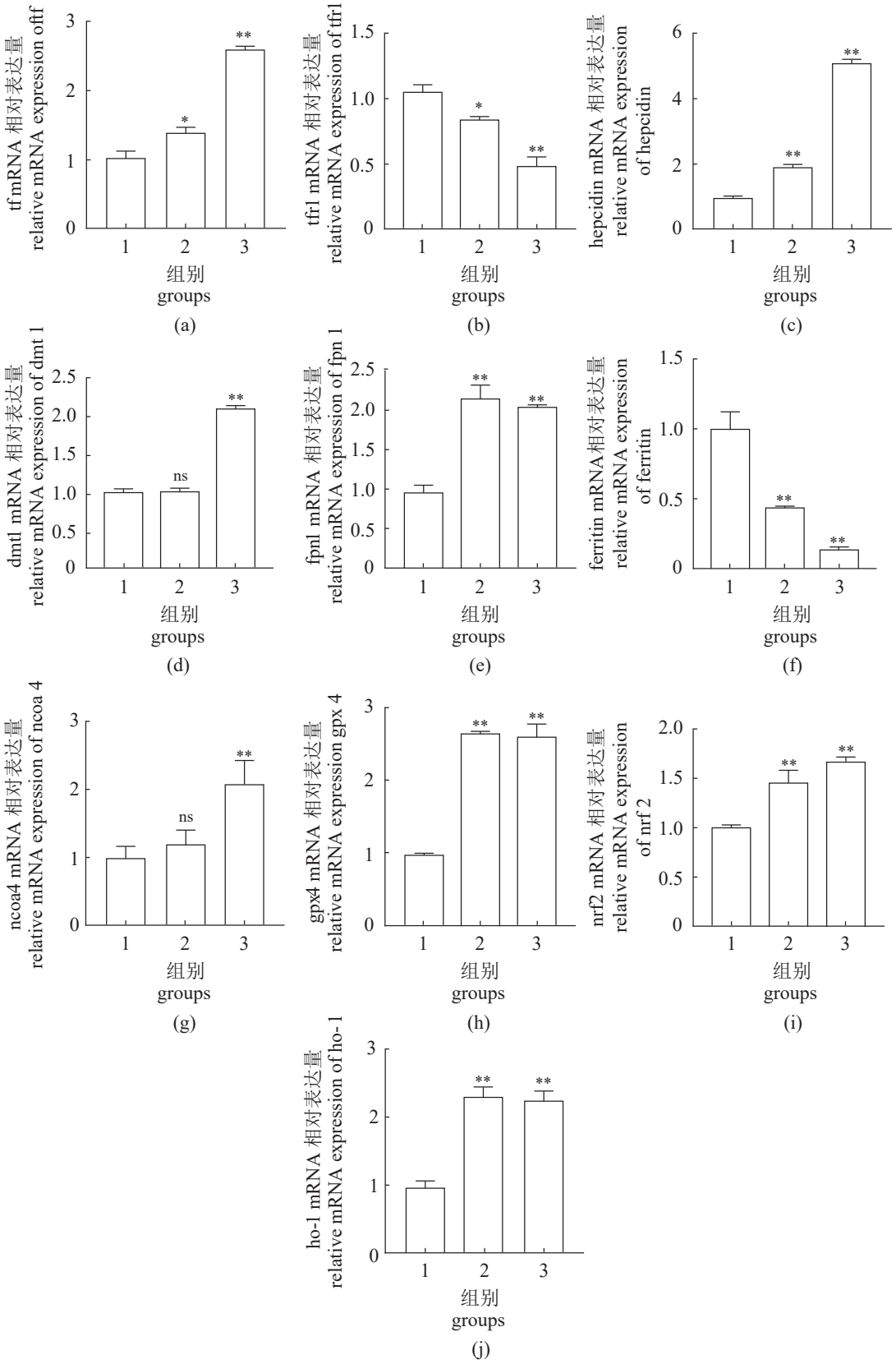


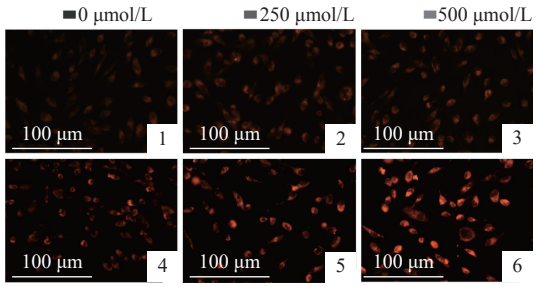
图 3　投喂富马酸亚铁对草鱼肝脏铁代谢 (a~e) 和抗氧化 (f~j) 相关基因的影响

Fig. 3　Effects of ferrous fumarate feeding on genes related to iron metabolism (a-e) and antioxidant (f-j) in liver of *C. idella*

一步检测了相关抗氧化基因的转录水平。结果显示，核因子 E2 相关因子 (*nrf*2)、血红素加氧酶-1(*ho*-1) 和 *gpx*4 的 mRNA 转录水平随着铁浓度的升高均极显著上调 ($P < 0.01$，图 3-h~j)。

2.4　外源添加的 FAC 引起细胞铁过载并激活炎症通路

为进一步揭示铁过载对草鱼肝细胞的损伤机制，选择 250 和 500 μmol/L 的 FAC 分别处理草鱼肝细胞 (L8824) 6 和 12 h。使用 FeRhoNox-1 对细胞进行染色后，通过荧光显微镜成像，并使用 ImageJ 软件对图像的平均荧光强度进行分析。荧光分析结果显示，FAC 处理 6 和 12 h 后，细胞内铁含量极显著增加 ($P < 0.01$，图版 Ⅱ，图 4-a, c)。此外，采用 qRT-PCR 检测 FAC 处理 L8824 细胞 6 和 12 h 后炎症相关基因的 mRNA 转录水平。在处理 6 h 后，*tnf-α* 的转录水平随着铁浓度的增加呈现极显著上调 ($P < 0.01$)；*nf-κb* 和 *perk* 的转录水平极显著下调 ($P < 0.01$)；*p*65 和 *p*38-*mapk* 在 250 μmol/L 处理时显著下调，但在500 μmol/L 时无显著性变化 ($P > 0.05$)；*tlr*4 未出现显著变化 ($P > 0.05$) (图 4-b)。处理 12 h 后，这些基因的



图版 Ⅱ　添加不同浓度 FAC 对 L8824 细胞铁含量的影响

1. 6 h 对照组细胞荧光图像，2.使用 250 μmol/L FAC 孵育 L8824 细胞 6 h 后的荧光图像，3.使用 500 μmol/L FAC 孵育 L8824 细胞 12 h 后的荧光图像，4. 12 h 对照组细胞荧光图像，5.使用 250 μmol/L FAC 孵育 L8824 细胞 12 h 后的荧光图像，6.使用 500 μmol/L FAC 孵育 L8824 细胞 12 h 后的荧光图像，图版 Ⅲ同。

Plate Ⅱ　Effect of different concentrations of FAC on iron content in L8824 cells

1. fluorescence images of control group cells at 6 h, 2. fluorescence images of L8824 cells treated with 250 μmol/L FAC for 6 h, 3. fluorescence images of L8824 cells treated with 500 μmol/L FAC for 12 h, 4. fluorescence images of control group cells at 12 h, 5. fluorescence images of L8824 cells treated with 250 μmol/L FAC for 12 h, 6. fluorescence images of L8824 cells treated with 500 μmol/L FAC for 12 h, the same as Plate Ⅲ.

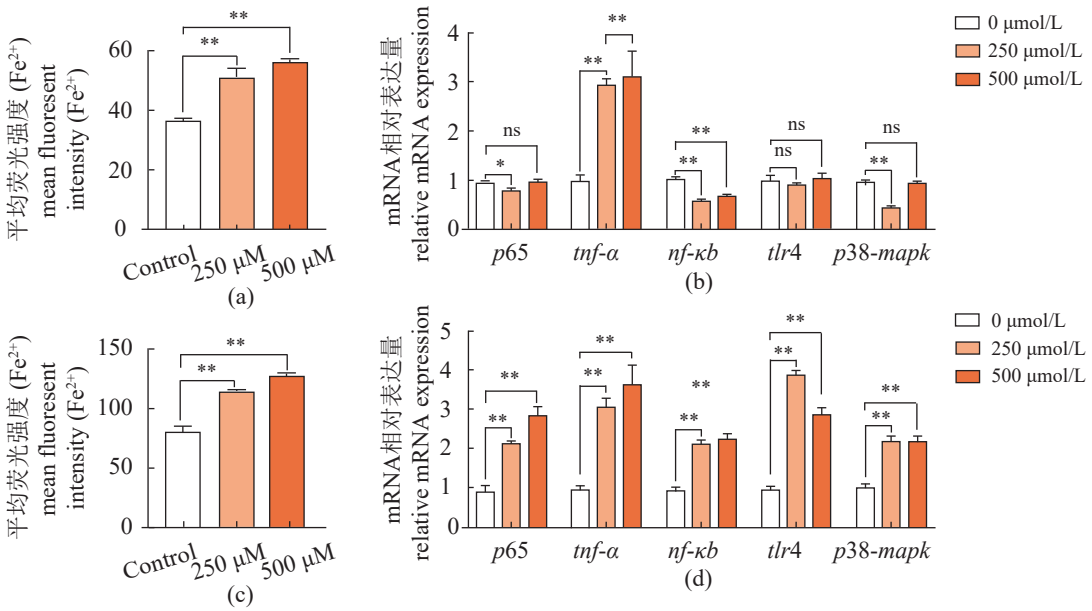


图 4　添加不同浓度 FAC 对 L8824 细胞铁含量和炎症通路的影响

(a) 孵育 6 h 后胞内 Fe^{2+}荧光图像的平均荧光强度，(b) 不同浓度 FAC 孵育 L8824 细胞 6 h 后炎症相关基因的 mRNA 水平，(c) 孵育 12 h 后胞内 Fe^{2+}荧光图像的平均荧光强度，(d) 不同浓度 FAC 孵育 L8824 细胞 12 h 后炎症相关基因的 mRNA 水平。4. 0 μmol/L，5. 250 μmol/L，6. 500 μmol/L，图 5 同。

Fig. 4　Effect of different concentrations of FAC on iron content and inflammatory pathways in L8824 cells

(a) average fluorescence intensity analysis of intracellular Fe^{2+} fluorescence images after incubation for 6 h, (b) mRNA levels of inflammatory related genes in L8824 cells treated with FAC for 6 h, (c) average fluorescence intensity analysis of intracellular Fe^{2+} fluorescence images after incubation for 12 h, (d) mRNA levels of inflammatory related genes in L8824 cells treated with FAC for 12 h. 4. 0 μmol/L, 5. 250 μmol/L, 6. 500 μmol/L, the same as Fig.5.

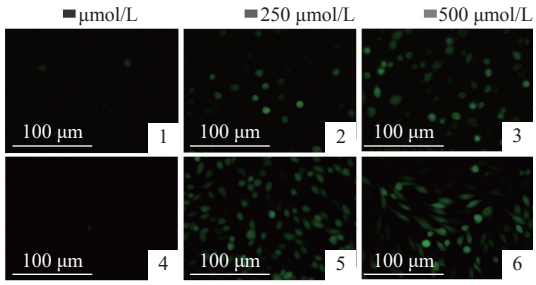
mRNA 转录水平相比空白组均极显著上调 ($P < 0.01$) (图 4-d)。

2.5　FAC 显著增加 L8824 ROS 的产生

使用 250 和 500 μmol/L FAC 分别处理细胞 6 和 12 h 后，使用 DCFH-DA 对细胞进行染色，并在荧光显微镜下观察结果 (图版Ⅲ)。通过 ImageJ 软件对荧光图像进行平均荧光强度分析，图 5-a 显示，250 μmol/L 处理 6 h 后，ROS 水平与空白组无显著性差异 ($P > 0.05$)，但随着浓度增加，500 μmol/L 组的 ROS 水平极显著上升 ($P < 0.01$)；在处理 12 h 后，250 和 500 μmol/L 处理组的 ROS 水平均极显著升高 ($P < 0.01$) (图 5-b)。在处理 6 h 后，氧化应激中的重要因子 *keap*1 的转录水平显著下降，而 *nrf2* 和 *ho*-1 极显著上调 ($P < 0.01$)；在处理 12 h 后，*keap*1、*nrf2* 和 *ho*-1 的转录水平均极显著上调 ($P < 0.01$) (图 5-c~d)。

3　讨论

铁作为生物体必不可少的微量元素，发挥着重要作用。然而，过量补充铁会引起铁代谢紊乱，严重时可导致细胞死亡并诱发多种代谢疾病[26-27]。



图版 Ⅲ　添加不同浓度 FAC 对 L8824 细胞 ROS 的影响

Plate Ⅲ　Effect of different concentrations of FAC on ROS in L8824 cells

在鱼类养殖中，饲料中铁含量的不确定性和铁元素的生物利用度不稳定性可能带来一系列问题。尽管如此，关于饲料中过量铁对鱼类造成毒性损伤的研究较为有限。为此，本研究通过在基础饲料中添加不同浓度的富马酸亚铁，连续投喂草鱼 60 d，系统探讨了食源性铁过载对草鱼的潜在损伤。Musharraf 等[28] 研究中，高浓度铁饲料会明显降低露斯塔野鲮 (*Labeo rohita*) 的 LGR、WGR、SGR，对其生长具有抑制作用。然而，在本研究中 WGR 和 SGR 无显著变化，这一结果可能与投喂周期或鱼体差异有关。值得注意的是，高铁浓

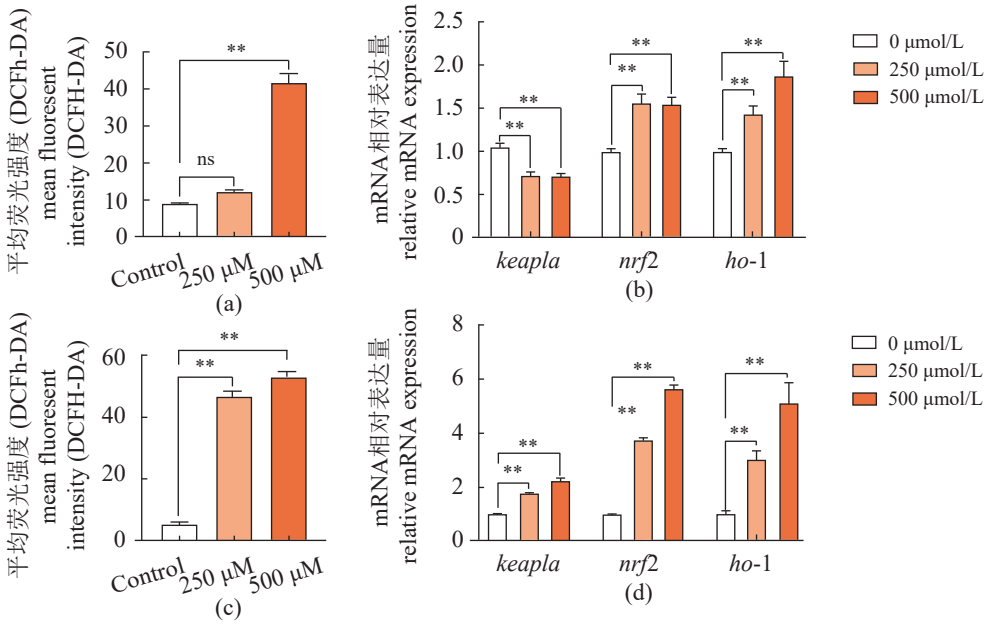


图 5　添加不同浓度 FAC 对 L8824 细胞氧化应激的影响

(a) 孵育 6 h 后胞内 ROS 荧光图像的平均荧光强度分析，(b) 不同浓度 FAC 孵育 L8824 细胞 6 h 后氧化应激相关基因的 mRNA 水平，(c) 孵育 12 h 胞内 ROS 荧光图像的平均荧光强度，(d) 不同浓度 FAC 孵育 L8824 细胞 12 h 后氧化应激相关基因的 mRNA 水平。

Fig. 5　Effects of different concentrations of FAC on oxidative stress of L8824 cells

(a) average fluorescence intensity analysis of intracellular ROS fluorescence images after incubation for 6 h, (b) mRNA levels of antioxidant related genes in L8824 cells treated with FAC for 6 h, (c) average fluorescence intensity analysis of intracellular ROS fluorescence images after incubation for 12 h, (d) mRNA levels of antioxidant related genes in L8824 cells treated with FAC for 12 h.

度组的 LGR 显著降低，表明过量铁可能对草鱼的体长增长呈负面影响。还有研究指出，铁过载会导致哺乳动物骨质疏松、骨质流失，甚至引发骨骼肌萎缩[29-30]。考虑到硬骨鱼的体长与骨骼和肌纤维的发育密切相关[31-32]，推测 LGR 显著降低可能与高铁摄入引发的骨骼或肌肉发育受损有关。

膳食铁的摄入、吸收、储存和利用是一个复杂的过程。铁离子进入机体后，除了形成含铁蛋白并参与各种生化反应外，剩余的铁大部分储存在肝脏中。肝脏作为主要的铁储存器官，在全身铁代谢稳态中发挥着至关重要的作用[13]。根据 Musharraf 等[28] 和 Luo 等[33] 的研究报道，高铁饮食会导致露斯塔野鲮和黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 的肝脏铁含量显著增加；在小鼠模型中，铁过载会导致肝脏结构改变和功能损伤[34]。为研究富马酸亚铁对草鱼全身和肝脏的作用，实验检测了草鱼肝脏的铁含量，并进行了 H.E 染色。结果显示，在中铁浓度组和高铁浓度组中，草鱼肝脏的铁含量显著上升，并出现明显的细胞空泡化和组织结构损伤，这与 Musharraf[28] 和 Luo 等[33] 的研究结果一致。接着，进一步评估草鱼的全身铁水平，检测了血清铁含量、PCV 和总铁结合力 TIBC，这三个指标常用于检测血清铁水平[35-37]。结果表明，高浓度富马酸亚铁可显著提高 PCV 和 TIBC，提示机体系统铁水平上升。此外，为了评估铁过载是否引起肝功能损伤，实验检测了血清和肝脏中 ALT 和 AST 的活性，二者是反映肝脏损伤的重要生化指标[38]。实验结果显示，在 60 d 的投喂期后，中铁和高铁浓度组草鱼的 ALT 和 AST 活性均呈不同程度升高，表明草鱼肝脏可能发生了损伤。上述结果与 Chen 等[39] 研究的黄颡鱼肝脏铁含量增加以及肝损伤的结果相一致。

肝脏不仅是主要的铁储存器官，还是多种铁代谢相关蛋白质的合成场所，在维持铁稳态中起着关键调控作用[40]。实验进一步探究铁过载条件下草鱼肝脏铁代谢相关基因的表达情况，结果显示，*hepcidin* 和 *fpn*1 的 mRNA 表达上调，以及 *tfr*1 的下调，与 Chen 等[39] 的研究结果一致，表明机体在调节铁的吸收和运输。此外，Tf 在血清中能够与 Fe^{3+}结合形成转铁蛋白结合铁，过量的 Fe^{3+} 进而形成 NTIB，而 NTIB 易被运输至肝脏和肝胰腺，从而引发组织铁沉积并导致氧化应激[41-42]。在本研究结果中 *tf* mRNA 表达水平上调，可能是机体在应对铁过载时，通过增强 Tf 的合成以增加与铁离子的结合和转运，从而降低 NTBI 水平，减轻组织铁沉积所致的氧化损伤。

进入细胞的铁离子大部分储存于铁蛋白中，一部分参与生化反应，多余的铁离子通过 FPN1 (细胞唯一的铁输出蛋白) 排至体循环[43-44]。此外，Hepcidin 是一种富含半胱氨酸的抗菌肽，可介导 FPN1 的内化和降解[40]。本研究中，高浓度富马酸亚铁显著上调了草鱼肝脏中 *hepcidin* 和 *fpn*1 的 mRNA 表达水平，表明肝脏细胞处于铁过载状态，迫切需要 FPN1 将铁离子转运至体循环；体循环中铁离子含量的增加使 Hepcidin 含量升高，Hepcidin 内化和降解 FPN1，进而控制细胞输出铁离子的速率，减少铁离子进入体循环。此过程反映了机体在铁过载下启动的一种保护机制，通过抑制铁的吸收与输出，尝试降低体循环中铁的积累。

机体内的自由铁具有强烈的氧化还原活性，易发生芬顿反应，从而生成 Fe^{3+}和·OH。·OH 进一步促进磷脂过氧化物的形成，诱发氧化损伤[26]。Singh 等[45] 研究发现，露斯塔野鲮暴露于高浓度铁的环境中，血液红细胞数量显著增加，肝脏铁含量和 MDA 水平也显著上升，而抗氧化酶 CAT 的活性降低。在本研究中出现了类似结果，铁过载增加了肝脏的脂质过氧化水平。同时，实验发现肝脏的 CAT 活性显著降低，这与 Singh 等[45] 的结果相一致。然而，在本研究中，血清的 CAT 活性却显著上升，这可能与体内铁的积累有关，因为 CAT 作为一种血红素酶，铁在其催化活性中起着关键作用[46]。小鼠在铁过载的状态下 CAT 的活性会随着铁含量的增加而降低[47]，说明 CAT 的活性受体内铁浓度的影响。有报道称，在鲑属 (*Oncorhynchus*) 鱼类感染病毒的过程中，大量铁代谢基因上调导致铁过载，并增加 ROS 的产生，最终引发氧化应激[48]。GPX4 作为一种抗氧化酶，能够利用谷胱甘肽还原脂质过氧化物，降低因脂质过氧化引起的氧化应激，Nrf2 则是体内重要的抗氧化因子，能够与下游靶点 GPX4 和 HO-1 共同发挥抗氧化作用[49]。研究结果表明，高铁浓度组血清和肝脏 GPX4 的活性显著升高，同时中铁浓度组和高铁浓度组均显著上调了 *nrf*2、*gpx*4 和 *ho*-1 的表达水平，进一步表明铁过载引起了机体的氧化应激。在正常情况下，Nrf2 通过与 Keap1 的相互作用而受到抑制。当发生氧化应激时，

Keap1 与 Nrf2 之间的相互作用被打断，使得 Nrf2 能够与抗氧化反应元件 (ARE) 结合，激活 Nrf2-ARE 信号通路，从而激活下游的抗氧化基因，如 *gpx*4、*ho*-1 等[50-51]。在本研究中，FAC 的孵育会导致 *keap*1、*gpx*4 和 *ho*-1 的 mRNA 水平显著上调，细胞总 ROS 显著上升，说明铁过载导致了 L8824 细胞抗氧化系统的失衡，诱导氧化应激。

Zhao 等[52] 研究发现，铁过载及 ROS 的增加可以通过 TLR4/P38-MAPK 通路激活炎症反应。在鲤铁死亡的研究中，脂质过氧化被发现能够激活 NF-κB/P65 信号通路，并导致炎症因子 TNF-α 的上调[53]。同时，还有研究指出，内质网应激的主要信号通路 PERK-eIF2α 也能介导铁积累引起的铁死亡[54-55]。基于上述研究，本研究检测了这些通路中的若干关键因子，发现 L8824 细胞经过 FAC 孵育 6 h 后，*p*65、*tlr*4、*perk* 和 *p*38-*mapk* 呈下调趋势，*tnf-α* 则显著上调。在孵育 12 h 后，这些基因的 mRNA 水平均显著上调，说明在铁离子积累到一定程度后，炎症相关通路将被激活。

总之，本研究利用体外和体外实验证明了食源性铁过载对草鱼肝脏健康的影响。结果表明，铁过载可导致草鱼肝脏组织受损，破坏肝脏铁代谢稳态，并诱导显著的氧化应激反应。此外，铁代谢紊乱进一步引起细胞内 ROS 水平升高，激活炎症反应通路。本研究为深入理解铁代谢紊乱对草鱼健康的潜在机制提供了理论依据，也为草鱼健康养殖管理策略的优化提供了重要参考。

（作者声明本文无利益冲突）

参考文献 (References):

[1] Muckenthaler M U, Rivella S, Hentze M W, *et al*. A red carpet for iron metabolism[J]. Cell, 2017, 168(3): 344-361.

[2] Frey P A, Reed G H. The ubiquity of iron[J]. ACS Chemical Biology, 2012, 7(9): 1477-1481.

[3] Ali M Y, Oliva C R, Flor S, *et al*. Mitoferrin, cellular and mitochondrial iron homeostasis[J]. Cells, 2022, 11(21): 3464.

[4] Scindia Y, Leeds J, Swaminathan S. Iron homeostasis in healthy kidney and its role in acute kidney injury[J]. Seminars in Nephrology, 2019, 39(1): 76-84.

[5] Xiong Q Q, Zhao J, Tian C Y, *et al*. Regulation of a high-iron diet on lipid metabolism and gut microbiota in mice[J]. Animals (Basel), 2022, 12(16): 2063.

[6] Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, *et al*. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis[J]. Science Translational Medicine, 2010, 2(51): 51ra71.

[7] Dev S, Babitt J L. Overview of iron metabolism in health and disease[J]. Hemodialysis International, 2017, 21(S1): S6-S20.

[8] Sukhbaatar N, Weichhart T. Iron regulation: macrophages in control[J]. Pharmaceuticals, 2018, 11(4): 137.

[9] Ganz T . Macrophages and iron metabolism[J]. Microbiology SpectrumMicrobiol Spectr, 2016, 4(5): MCHD-0037-2016.

[10] Bayir H, Dixon S J, Tyurina Y Y, *et al*. Ferroptotic mechanisms and therapeutic targeting of iron metabolism and lipid peroxidation in the kidney[J]. Nature Reviews Nephrology, 2023, 19(5): 315-336.

[11] Lane D J R, Merlot A M, Huang M L M, *et al*. Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: key molecules and mechanisms and their roles in disease[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2015, 1853(5): 1130-1144.

[12] Yanatori I, Kishi F. DMT1 and iron transport[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2019, 133: 55-63.

[13] Vogt A S, Arsiwala T, Mohsen M, *et al*. On iron metabolism and its regulation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4591.

[14] Fraenkel P G, Traver D, Donovan A, *et al*. Ferroportin1 is required for normal iron cycling in zebrafish[J]. Journal of Clinical Investigation, 2005, 115(6): 1532-1541.

[15] Sendamarai A K, Ohgami R S, Fleming M D, *et al*. Structure of the membrane proximal oxidoreductase domain of human Steap3, the dominant ferrireductase of the erythroid transferrin cycle[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(21): 7410-7415.

[16] Zanninelli G, Loréal O, Brissot P, *et al*. The labile iron pool of hepatocytes in chronic and acute iron overload and chelator-induced iron deprivation[J]. Journal of Hepatology, 2002, 36(1): 39-46.

[17] Ginzburg Y Z. Hepcidin-ferroportin axis in health and disease[J]. Vitamins and Hormones, 2019, 110: 17-45.

[18] Nemeth E, Ganz T. Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(12): 6493.

[19] Ramey G, Deschemin J C, Durel B, *et al*. Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes[J]. Haematologica, 2010, 95(3): 501-504.

[20] Aschemeyer S, Qiao B, Stefanova D, *et al*. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin[J]. Blood, 2018, 131(8): 899-910.

[21] Pietrangelo A. Iron and the liver[J]. Liver International, 2016, 36(S1): 116-123.

[22] Wang C Y, Knutson M D. Hepatocyte divalent metal-ion trans-

porter-1 is dispensable for hepatic iron accumulation and non-transferrin-bound iron uptake in mice[J]. Hepatology, 2013, 58(2): 788-798.

[23] 张旭, 徐鹏程, 仲崇超, 等. 饲料铁源对黄颡鱼肌肉发育、常规成分、抗氧化能力及铁代谢的影响 [J]. 水产学报, 2025, 49(10): 109614.
Zhang X, Xu P C, Zhong C C, *et al*. Effects of dietary iron sources on muscle development, nutrient composition, antioxidant status, and iron metabolism in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2025, 49(10): 109614 (in Chinese).

[24] Chandrapalan T, Kwong R W M. Influence of dietary iron exposure on trace metal homeostasis and expression of metal transporters during development in zebrafish[J]. Environmental Pollution, 2020, 261: 114159.

[25] Wang Z, Li X S, Lu K L, *et al*. Effects of dietary iron levels on growth performance, iron metabolism and antioxidant status in spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) reared at two temperatures[J]. Aquaculture, 2023, 562: 738717.

[26] Yan H F, Zou T, Tuo Q Z, *et al*. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6(1): 49.

[27] Wudhikulprapan W, Chattipakorn S C, Chattipakorn N, *et al*. Iron overload and programmed bone marrow cell death: potential mechanistic insights[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2024, 754: 109954.

[28] Musharraf M, Khan M A. Requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton) for dietary iron based on growth, whole body composition, haematological parameters, tissue iron concentration and serum antioxidant status[J]. Aquaculture, 2019, 504: 148-157.

[29] Balogh E, Paragh G, Jeney V. Influence of iron on bone homeostasis[J]. Pharmaceuticals, 2018, 11(4): 107.

[30] Martin D, Nay K, Robin F, *et al*. Oxidative and glycolytic skeletal muscles deploy protective mechanisms to avoid atrophy under pathophysiological iron overload[J]. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2022, 13(2): 1250-1261.

[31] Weatherley A H, Gill H S, Lobo A F. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibres in teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size[J]. Journal of Fish Biology, 1988, 33(6): 851-859.

[32] Zhang X C, Wang F, Ou M, *et al*. Effects of myostatin b knockout on offspring body length and skeleton in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Biology, 2023, 12(10): 1331.

[33] Luo Z, Zou G Y, Gao Y, *et al*. Effect of dietary iron (Fe) levels on growth performance, hepatic lipid metabolism and antioxidant responses in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Aquaculture Nutrition, 2017, 23(6): 1475-1482.

[34] Prasnicka A, Lastuvkova H, Alaei Faradonbeh F, *et al*. Iron overload reduces synthesis and elimination of bile acids in rat liver[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 9780.

[35] Sperling D, Freudenschuss B, Shrestha A, *et al*. Comparative efficacy of two parenteral iron-containing preparations, iron gleptoferron and iron dextran, for the prevention of anaemia in suckling piglets[J]. Veterinary Record Open, 2018, 5(1): e000317.

[36] Wang L L, Yu Q L, Han L, *et al*. Study on the effect of reactive oxygen species-mediated oxidative stress on the activation of mitochondrial apoptosis and the tenderness of yak meat[J]. Food Chemistry, 2018, 244: 394-402.

[37] Dhapale A V, Kamble O. Correlation of iron deficiency anaemia with glycosylated haemoglobin (HbA1c) levels in non-diabetics: an observational study[J]. International Journal of Advances in Medicine, 2021, 8(7): 969-973.

[38] Chinnappan R, Mir T A, Alsalameh S, *et al*. Aptasensors are conjectured as promising ALT and AST diagnostic tools for the early diagnosis of acute liver injury[J]. Life (Basel), 2023, 13(6): 1273.

[39] Chen G H, Song C C, Pantopoulos K, *et al*. Mitochondrial oxidative stress mediated Fe-induced ferroptosis via the NRF2-ARE pathway[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2022, 180: 95-107.

[40] Zhang D L, Rouault T A. How does hepcidin hinder ferroportin activity?[J]. Blood, 2018, 131(8): 840-842.

[41] Jenkitkasemwong S, Wang C Y, Coffey R, *et al*. SLC39A14 is required for the development of hepatocellular iron overload in murine models of hereditary hemochromatosis[J]. Cell Metabolism, 2015, 22(1): 138-150.

[42] Angoro B, Motshakeri M, Hemmaway C, *et al*. Non-transferrin bound iron[J]. Clinica Chimica Acta, 2022, 531: 157-167.

[43] Carmona U, Li L, Zhang L B, *et al*. Ferritin light-chain subunits: key elements for the electron transfer across the protein cage[J]. Chemical Communications, 2014, 50(97): 15358-15361.

[44] Petzer V, Tymoszuk P, Seifert M, *et al*. Disbalanced erythroid ferroportin expression contributes to ineffective erythroid output in anemia of chronic disease[J]. Blood, 2019, 134(S1): 3533.

[45] Singh M, Barman A S, Devi A L, *et al*. Iron mediated hematological, oxidative and histological alterations in freshwater fish *Labeo rohita*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 170: 87-97.

[46] Ali I, Khan S N, Chatzicharalampous C, *et al*. Catalase prevents myeloperoxidase self-destruction in response to oxidative stress[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2019, 197: 110706.

[47] Aalikhani M, Khalili M, Jahanshahi M. The natural iron chelators' ferulic acid and caffeic acid rescue mice's brains from side effects of iron overload[J]. Frontiers in Neurology, 2022, 13:

951725.

[48] Tarifeño-Saldivia E, Aguilar A, Contreras D, *et al*. Iron overload is associated with oxidative stress and nutritional immunity during viral infection in fish[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 1296.

[49] Wang X, Zhu W J, Xing M, *et al*. Matrine disrupts Nrf2/GPX4 antioxidant system and promotes hepatocyte ferroptosis[J]. Chemico-Biological Interactions, 2023, 384: 110713.

[50] Nguyen T, Nioi P, Pickett C B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(20): 13291-13295.

[51] Sykiotis G P. Keap1/Nrf2 signaling pathway[J]. Antioxidants, 2021, 10(6): 828.

[52] Zhao J, Ma M M, Li L, *et al*. Oxysophoridine protects against cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibition of TLR4/p38MAPK-mediated ferroptosis[J]. Molecular Medicine Reports, 2023, 27(2): 44.

[53] Xu T C, Cui J, Xu R, *et al*. Microplastics induced inflammation and apoptosis *via* ferroptosis and the NF-κB pathway in carp[J]. Aquatic Toxicology, 2023, 262: 106659.

[54] Zhang H, Wang A F, Li G F, *et al*. Osteoporotic bone loss from excess iron accumulation is driven by NOX4-triggered ferroptosis in osteoblasts[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2023, 198: 123-136.

[55] Liang Y H, Chen S X, Han S Q, *et al*. Toosendanin induced hepatotoxicity via triggering PERK-eIF2α-ATF4 mediated ferroptosis[J]. Toxicology Letters, 2023, 377: 51-61.

Mechanism of dietary iron overload inducing hepatocyte damage in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

HUANG Xiaoman , LI Ningjing , YANG Yan , SONG Jialing , TIAN Ye , LIN Li *, QIN Zhendong *

(*Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Farming*, *Guangdong Engineering Technology Research Center for Water Environment and Aquatic Product Safety*, *College of Animal Science & Technology*, *Zhongkai University of Agriculture and Engineering*, *Guangzhou* 510225, *China*)

Abstract: Iron is an essential trace element in vertebrates, involved in critical biological processes like oxygen transport and energy metabolism. This study focused on *Ctenopharyngodon idella*, investigating the damaging effects of dietary iron overload. Healthy *C. idella* weighing 50-80 g were fed a diet supplemented with 0, 400, and 800 mg/kg of ferrous fumarate for 60 days. Growth performance results indicated that excessive iron intake significantly reduced the fish's length growth rate. Iron ion content analysis showed that ferrous fumarate supplementation significantly increased iron levels in serum and liver. ELISA results indicated that dietary iron overload led to an increase in hematocrit, along with significantly elevated activities of ALT, AST, and GPX4 in serum and liver. qRT-PCR results revealed that iron metabolism-related genes Tf, DMT1, Hepcidin, FPN, and NCOA4 were significantly upregulated in the ferrous fumarate group, while TfR1 and Ferritin were significantly downregulated. Furthermore, antioxidant-related genes *ho*-1, *gpx*4, and *nrf*2 were significantly upregulated in the ferrous fumarate group. *In vitro* experiments showed that FAC incubation of L8824 cells resulted in a significant increase in intracellular iron and ROS; qRT-PCR analysis revealed significant increases in inflammatory genes *p*65, *tnf*-α, *nf*-*κb*, *tlr*4, and *p*38-*mapk*, along with significant rises in oxidative stress-related genes *keap*1*a*, *nrf*2, and *ho*-1. In conclusion, this study suggests that dietary iron overload leads to an imbalance in iron metabolism and oxidative stress in *C. idella*, accompanied by inflammatory responses, providing a theoretical basis for understanding iron metabolism-related diseases and their prevention in *C. idella*.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; iron overload; iron metabolism; oxidative stress; inflammatory response

Corresponding authors: LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn;
QIN Zhendong. E-mail: qinzhendongsc@163.com

Funding projects: Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation Natural Science Fund Project (2023A1515012784)