

文章编号: 1000-0615(2018)12-1889-07

DOI: 10.11964/jfc.20170910969

急性氨氮毒性对黄颡鱼头肾巨噬细胞抗氧化及炎症相关基因表达的影响

李冰, 张木子, 黎明*, 袁莉霞, 王日昕

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

摘要: 为了研究急性氨氮胁迫对黄颡鱼头肾巨噬细胞抗氧化及炎症相关基因表达的影响, 实验通过建立黄颡鱼离体头肾细胞模型, 开展为期96 h的急性氨氮胁迫实验。结果显示, 0.14和0.28 mg/L总氨氮处理组SOD基因的相对表达量显著低于对照组, 但0.28 mg/L总氨氮处理组GPX基因的相对表达量显著高于其他组; 0.14和0.28 mg/L总氨氮处理组IL-1和TNF基因的相对表达量显著低于对照组, 而0.28 mg/L总氨氮处理组IL-8基因的相对表达量显著低于0.14 mg/L总氨氮处理组和对照组; 吖啶橙染色检测发现, 0.14 mg/L总氨氮处理组实验鱼头肾巨噬细胞内可见边缘不规则的黄绿色荧光, 0.28 mg/L总氨氮处理组实验鱼头肾巨噬细胞内可见致密浓染的黄绿色荧光信号。研究表明, 氨氮毒性能够影响黄颡鱼头肾巨噬细胞抗氧化相关基因的表达; 细胞凋亡可能是造成鱼类氨中毒致死的主要原因之一。

关键词: 黄颡鱼; 头肾巨噬细胞; 氨氮; 抗氧化; 炎症; 细胞凋亡

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

氨态氮在水环境中通常以离子态(NH_4^+)和非离子态(NH_3)形式存在, 而 NH_3 已被证实对所有的脊椎动物均具有致毒性^[1]。大多数硬骨鱼对氨氮非常敏感, NH_3 在体内过度积累会影响能量代谢、扰乱膜电位和离子平衡、诱发组织病变, 致使呼吸过速、兴奋、昏厥、抽搐, 甚至死亡^[2-3]。Smart^[4]认为鱼类氨中毒与哺乳类高血氨症致病机制相同, 都是由于大脑中谷氨酰胺过度积累, 星状胶质细胞肿胀引起颅内高压致死, 大多数学者对此观点表示认可。然而, 比利时科学家van Der Linden等^[5]却提出了质疑, 因为他们发现当鲤(*Cyprinus carpio*)受到氨氮胁迫后, 大脑中谷氨酰胺积累量超过哺乳类致死浓度时未出现死亡, 并进一步证实鱼类特殊的颅骨结构使其能够承受更强的颅内压, 他们指出脑肿胀并不是导致鱼类氨中毒死亡的直接原因。Li等^[6]研究发现, 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)大脑中谷氨酰

胺含量在连续28 d氨氮暴露下持续升高, 达到哺乳动物致死浓度4倍以上仍未出现死亡, 证实了van Der Linden等^[5]的发现。Ren等^[7]和Xing等^[8]分别向鲫(*Carassius auratus*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)腹腔中注射半致死浓度的醋酸铵, 发现实验鱼大脑和肝脏中精氨酸、鸟氨酸和瓜氨酸含量与血氨含量呈负相关, 而中毒死亡的实验鱼大脑中谷氨酰胺含量与存活下来的鱼无显著性差异($P>0.05$), 表明谷氨酰胺在鱼类大脑中的积累存在饱和临界点, 鱼类能够将多余的谷氨酰胺代谢出体外。有新的证据提示, 鱼类氨中毒致死可能与功能细胞氧化损伤及所诱导的凋亡有关^[9-10]。

长期以来, 探究氨氮胁迫对鱼类生理影响的技术手段主要集中在组织学变化、生理生化、氧化应激、免疫应答及相关基因表达等方面, 而关于氨氮毒性对体外培养细胞影响的研究

收稿日期: 2017-09-13 修回日期: 2018-01-15

资助项目: 国家自然科学基金(31502176, 31472279); 宁波市自然科学基金(2016A610083)

通信作者: 黎明, E-mail: liming1@nbu.edu.cn

究鲜见报道。本实验选择了具有排泄和免疫功能的头肾细胞作为研究对象,建立黄颡鱼离体头肾细胞模型,通过探究不同浓度的醋酸铵对离体头肾细胞抗氧化及炎症相关基因表达的影响,进一步结合吖啶橙荧光检测凋亡细胞技术,试图探究氧化损伤、炎症及细胞凋亡与鱼类氨中毒致死的内在联系,为鱼类生理学及细胞生物学的深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原代头肾细胞的分离与培养

黄颡鱼成鱼(22.67±0.25)g购自浙江宁波,作为头肾细胞供体,雌雄不限,采用MS-222麻醉后,于超净工作台分离获得头肾组织10~15g。向剪碎的头肾组织中加入培养基1(RPMI 1640培养基,2%小牛血清,1%青霉素/链霉素,1%肝素钠),挤压通过100 μm铜网,获得细胞悬液;将3 mL细胞悬液加入到3 mL Ficoll中,2 000 r/min离心25 min;分离获得中间细胞层,加入培养基1~8 mL,混匀2次,2 000 r/min离心8 min,弃上清液;加入5 mL培养基2(RPMI 1640培养基,1%小牛血清,1%青霉素/链霉素,1%肝素钠),混匀2次,1 000 r/min离心5 min,弃上清液;补充培养基2~6 mL,混匀;调整细胞浓度为 3×10^7 CFU/mL,成活率用0.01%台盼兰测定,确保成活率>95%;接种到培养瓶中,37 °C恒温培养12 h,更换培养基为培养基3(RPMI 1640培养基,5%小牛血清,5%黄颡鱼血清,1%青霉素/链霉素)。

1.2 实验设计

依据预实验的结果,获得黄颡鱼头肾细胞

96 h氨氮半致死浓度(LC₅₀)为0.14 mg/L总氨氮。基于LC₅₀,实验设置了3个处理组,分别为0、0.14和0.28 mg/L总氨氮,实测值为0.01、0.11和0.32 mg/L总氨氮(非离子氨分别为<0.001、0.02和0.05 mg/L)。每个处理组设置3个重复,胁迫周期为96 h。胁迫结束后,12 000 r/min离心1 min,获得的细胞用于提取RNA。期望氨氮浓度通过预配醋酸铵(10 g/L)母液每隔7 h进行调整,总氨氮浓度测定采用纳氏试剂法^[11],非离子氨的计算公式为 $[\text{NH}_3]=[\text{NH}_3+\text{NH}_4^+]/[10^{(\text{pKa}-\text{pH})}+1]$; pKa=0.090 18+2 729.92/T(T为开氏温度)^[12]。整个实验期间,细胞在无菌、密封的培养瓶中进行培养,温度维持在37 °C, pH值7.1~7.4。

1.3 基因mRNA表达量分析

黄颡鱼头肾细胞的总RNA的提取采用RNAiso Plus试剂(TaKaRa,大连),利用Prime Script™ PT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa,大连)反转录成cDNA用于实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析。利用Primer Premier 5.0软件设计引物(表1)。qRT-PCR(SYBR Premix Ex Taq II, TaKaRa,大连)扩增程序为95 °C预变性5 min,40个循环:95 °C 20 s,57 °C 25 s,72 °C 25 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析基因相对表达量^[13]。

1.4 吖啶橙荧光检测凋亡细胞

96 h氨氮胁迫后,将细胞用PBS缓冲溶液清洗3次,放入2 μg/mL的吖啶橙溶液中避光处理30~50 min。PBS缓冲溶液冲洗3次后,在荧光显微镜下,490 nm激发波长(蓝光)观察细胞的结构和形态,致密浓染的黄绿色荧光标记为吖啶橙染色的阳性凋亡细胞。

表1 黄颡鱼抗氧化及炎症基因和内参基因qRT-PCR引物序列

目的基因 aim gene	正向引物(5'-3') forward primer (5'-3')	反向引物(3'-5') reverse primer (3'-5')	大小/bp size
<i>SOD</i>	CAAGGGCGGAGATGATGAAA	GTGGAAAGGAAGCGGTGAAA	108
<i>GPX</i>	TCCCTTAGTGACCAGATTTA	TGATATTTGGGTCTCTCCTT	281
<i>GRX</i>	ATCTACATTGGCTTGAAAC	GAAAGTAGGGACTGAGGTGA	257
<i>IL-1</i>	AAACCAGCATCTCCAGTGTGTC	GAGCAAAGGCTGTCCGTAT	168
<i>IL-8</i>	CACTACCAAGCCAGCAATG	AGACAACCAAGACTTCACC	228
<i>TNF</i>	ATAACCCACGCTATGACTG	GGCTATGACTCGCAACACTT	187
<i>β-actin</i>	GCACAGTAAAGCGTTGTGA	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	136

1.5 统计分析

实验数据采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计学处理, 结果以平均值±标准误(mean±SE)表示, 如果各处理组间差异显著($P<0.05$), 则进行Duncan多重比较。所有分析均采用SPSS 18.0.0 (Chicago, USA)在Windows操作系统中进行。

2 结果

氨氮胁迫96 h后, 0.14和0.28 mg/L总氨氮处理组SOD基因的相对表达量显著低于对照组($P<0.05$), 但0.14和0.28 mg/L总氨氮处理组之间SOD基因的相对表达量无显著性差异(图1)($P>0.05$)。0.28 mg/L总氨氮处理组GPX基因的相对表达量显著高于其他组($P<0.05$), 0.14 mg/L总氨氮处理组与对照组之间GPX基因的相对表达量无显著性差异($P>0.05$)。96 h氨氮胁迫并没有影响黄颡鱼头肾巨噬细胞GRX基因的表达($P>0.05$)。

氨氮胁迫96 h后, 0.14和0.28 mg/L总氨氮处理组IL-1和TNF基因的相对表达量显著低于对照组($P<0.05$), 但氨氮处理组之间IL-1和TNF基因的相对表达量无显著性差异(图2)($P>0.05$)。0.28 mg/L总氨氮处理组IL-8基因的相对表达量显著低于0.14 mg/L总氨氮处理组和对照组($P<0.05$), 但0.14 mg/L总氨氮处理组和对照组之间IL-8基因的相对表达量无显著性差异($P>0.05$)。

在490 nm激发波长(蓝光)荧光显微镜下观察不同氨氮浓度处理组细胞, 对照组实验鱼头肾巨噬细胞细胞核发出均匀规则的绿色荧光(图3-a); 0.14 mg/L总氨氮处理组实验鱼头肾巨噬细胞内可见边缘不规则的黄绿色荧光(图3-b); 0.28 mg/L总氨氮处理组实验鱼头肾巨噬细胞内可见致密浓染的黄绿色荧光信号(图3-c)。

3 讨论

环境氨氮对鱼类的致毒作用主要表现为不同程度的组织损伤, 以往学者在开展氨氮毒性对鱼类影响的研究时, 大都选择鳃、血液、肝脏、大脑和肌肉组织为研究对象, 如黄颡鱼^[6]、鲫^[7]、草鱼^[8]、金头鲷(*Sparus aurata*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[14]、许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)^[15]、肺鱼(*Protopterus dolloi*)^[16]和暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)^[17], 鲜有研究探讨氨氮毒性对鱼类肾脏细胞造成的损伤。肾脏是鱼类主

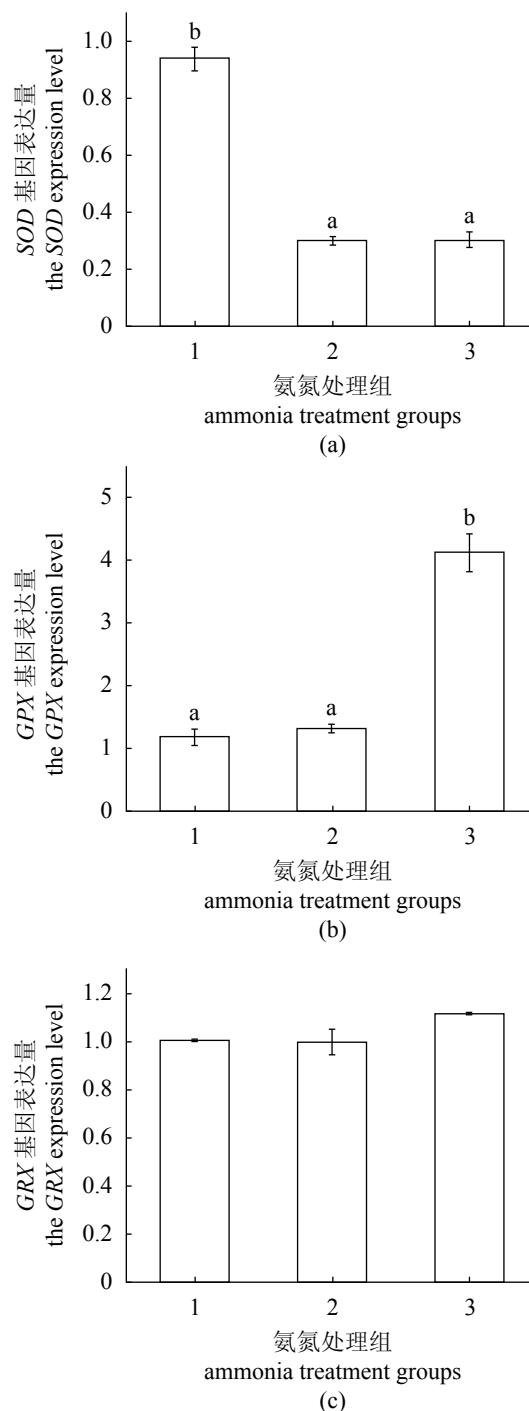


图1 氨氮对黄颡鱼头肾巨噬细胞抗氧化基因表达的影响

1, 2, 3分别表示0, 0.14, 0.28 mg/L总氨氮处理组; 柱子不同字母(a, b)表示氨氮暴露时间的影响存在差异性显著($P<0.05$); 下同

Fig. 1 The effect of ammonia on the antioxidant genes expression of head-kidney macrophage in *P. fulvidraco*

1, 2, 3 indicate 0, 0.14, 0.28 mg/L total ammonia nitrogen treatment groups; different letters (a, b) indicate a significant effect of ammonia exposure time ($P<0.05$); the same below

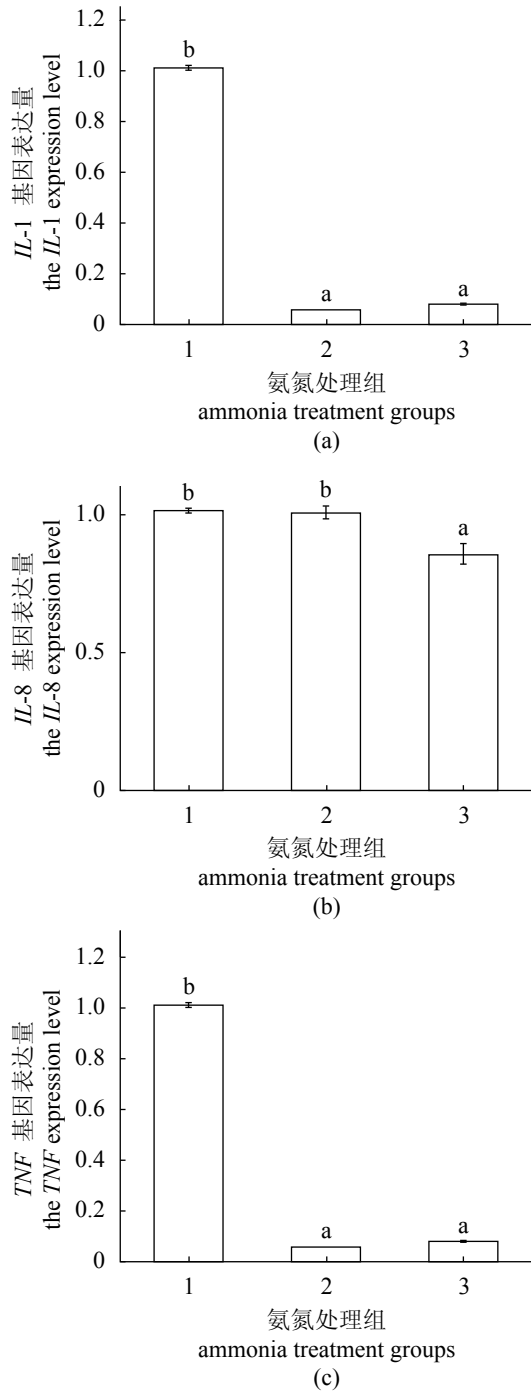


图 2 氨氮对黄颡鱼头肾巨噬细胞炎症基因表达的影响

Fig. 2 The effect of ammonia on the inflammation genes expression of head-kidney macrophage in *P. fulvidraco*

要的排泄器官，体内过量的氨能够借助鸟氨酸循环，从肾脏代谢到体外，此外，鱼类的头肾属于淋巴器官，具有免疫功能，肾脏损伤可以作为环境污染的良好指标^[18]。本研究发现，96 h 急性氨氮胁迫导致黄颡鱼头肾巨噬细胞SOD基因

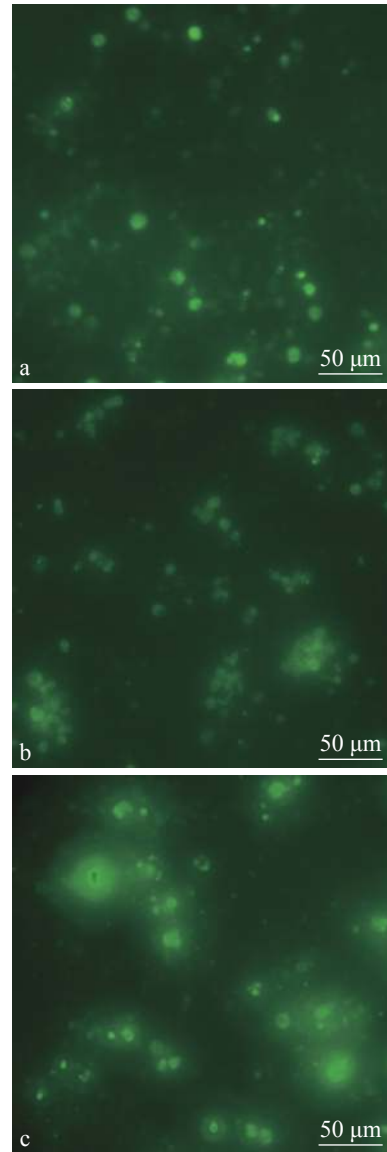


图 3 头肾巨噬细胞凋亡吖啶橙检测

(a) 对照组; (b) 0.14 mg/L 总氨氮处理组; (c) 0.28 mg/L 总氨氮处理组

Fig. 3 Head-kidney macrophage apoptosis acridine orange detection

(a) control; (b) 0.14 mg/L T-AN group; (c) 0.28 mg/L T-AN group

的mRNA表达量显著下调，原因可能与头肾巨噬细胞SOD酶活性受到氨氮毒性抑制有关。类似的结果在许多鱼类氨氮胁迫体内实验中也有报道，如黄颡鱼^[6]、鲫^[7]、许氏平鲈^[15]、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[19]和鳙(*Hypophthalmichthys nobilis*)^[20]。然而，相反的情况Jin等^[21]也有报道，随着氨氮暴露时间的延长，草鱼肝脏中SOD基因的mRNA表达量显著上调($P < 0.05$)。由于草鱼草食性的摄食习惯，机体的抗氧化酶系统能够耐受更高的血氨水平，机体对酶的需求往往通过提

高相关基因mRNA表达水平来实现^[8], 而其他食性鱼类的抗氧化酶系统由于不能耐受过高的氨氮, 继而失去活性并停止mRNA的转录。正常生理状况下, 鱼类能够通过SOD催化 $O_2 \cdot$ 歧化为 H_2O_2 , GPX和CAT能够对具有细胞毒性的 H_2O_2 进行体内解毒, 生成无毒的 H_2O , 其中, GPX的解毒过程需要依赖于次级酶类(如GR和GRX)和辅因子(如GSH、GSSGH和NADPH等)的参与^[22]。GPX是动物体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶, 它能催化有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 同时促进 H_2O_2 的分解, 从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害。在本研究中, 高浓度的氨氮并没有抑制头肾巨噬细胞GPX基因的mRNA表达水平, 相反, 其表达量为对照组的4倍。与肝脏相比, 尽管肾脏对氧自由基的耐受能力相对较弱, 但作为主要的排泄器官, 却能够耐受高浓度的 H_2O_2 及丙二醛等细胞毒性物质^[18], 因此在体外实验中发现, 肾脏细胞中GPX基因的mRNA表达水平与SOD基因并不完全一致。GRX作为氧化还原次级酶类, 主要参与谷胱甘肽化/去谷胱甘肽化的过程, 尽管在本研究中, GRX基因的mRNA表达水平在处理组间无显著性差异, 但仍检测到与GPX基因的mRNA表达具有相同的趋势, 未检测到统计学差异可能与处理时间及统计手段等有关。

在哺乳类研究中发现, 血氨过高会导致大脑星状胶质细胞和小神经胶质细胞肿胀, 影响炎症细胞因子基因的表达, 如白细胞介素1(IL-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和干扰素 γ (IFN- γ)等^[9], 继而启动细胞凋亡程序, 造成免疫系统损伤, 甚至机体死亡^[23]。在本研究中发现, 体外培养的黄颡鱼头肾巨噬细胞IL-1、IL-8和TNF基因的mRNA表达量在96 h氨氮胁迫后, 表现出不同程度的下调, 推测可能与细胞凋亡有关。本研究借助荧光显微镜和吖啶橙染色技术, 进一步验证细胞凋亡的可能性, 通过观察吖啶橙染色的不同氨氮处理组细胞的结构和形态发现, 高浓度氨氮处理后, 实验鱼头肾巨噬细胞内可见致密浓染的黄绿色荧光信号, 黄绿色荧光标记的细胞为吖啶橙染色的阳性凋亡细胞。结果提示, 功能细胞凋亡可能是造成鱼类氨中毒致死的主要原因之一。尽管相关研究在鱼类尚未见到, 但在高等动物研究中已有报道。庞雪利等^[10]在临床研究中发现, 提高细胞培养基中IL-8的含量,

能够激活细胞中PI3K/AKT信号通路, 从而上调*Bcl-2*、下调*caspase-3*基因的mRNA的表达量, 达到抑制细胞凋亡的目的, 并通过Western blot做出进一步的验证。Lam等^[24]证实TNF- α 和IL-1能够通过影响NF- κ B信号通路启动细胞凋亡。尽管类似研究在鱼类中鲜有报道, 但本研究通过体外细胞培养结合攻毒实验所获得的结果, 为今后的鱼类逆境生理研究提供了一条新思路。

综上, 氨氮毒性能够影响黄颡鱼头肾巨噬细胞抗氧化相关基因mRNA的表达, 细胞凋亡可能是造成鱼类氨中毒致死的主要原因之一。

参考文献:

- [1] Ip Y K, Leong M W F, Sim M Y, *et al.* Chronic and acute ammonia toxicity in mudskippers, *Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti*: brain ammonia and glutamine contents, and effects of methionine sulfoximine and MK801[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2005, 208(Pt 10): 1993-2004.
- [2] Hegazi M M, Hasanein S S. Effects of chronic exposure to ammonia concentrations on brain monoamines and ATPases of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2010, 151(4): 420-425.
- [3] Thrane V R, Thrane A S, Wang F S, *et al.* Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering[J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(12): 1643-1648.
- [4] Smart G R. Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish-gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to acutely lethal concentrations[J]. *Journal of Fish Biology*, 1978, 12(1): 93-104.
- [5] van Der Linden A, Verhoye M, Nilsson G E. Does anoxia induce cell swelling in carp brains? *In vivo* MRI measurements in crucian carp and common carp[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2001, 85(1): 125-133.
- [6] Li M, Gong S Y, Li Q, *et al.* Ammonia toxicity induces glutamine accumulation, oxidative stress and immunosuppression in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2016, 183-184: 1-6.
- [7] Ren Q Y, Li M, Yuan L X, *et al.* Acute ammonia toxicity in crucian carp *Carassius auratus* and effects of

- taurine on hyperammonemia[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2016, 190: 9-14.
- [8] Xing X D, Li M, Yuan L X, *et al.* The protective effects of taurine on acute ammonia toxicity in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 56: 517-522.
- [9] Bobermin L D, Quincozes-Santos A, Guerra M C, *et al.* Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52164.
- [10] 庞雪利, 李矿发, 魏兰, 等. IL-8通过上调Bcl-2的表达和下调caspase-3的表达抑制MCF-7乳腺癌细胞凋亡[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(3): 307-311.
- Pang X L, Li K F, Wei L, *et al.* IL-8 inhibits the apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells by up-regulating Bcl-2 and down-regulating caspase-3[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, 31(3): 307-311(in Chinese).
- [11] Hegazi M M, Attia Z I, Ashour O A. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 99(2): 118-125.
- [12] Johansson O, Wedborg M. Ammonia-ammonium equilibrium in seawater at temperatures between 5 and 25 °C[J]. *Journal of Solution Chemistry*, 1980, 9(1): 37-44.
- [13] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [14] Le Ruyeta J P L, Boeufa G, Infantea J Z, *et al.* Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1998, 119(2): 511-518.
- [15] Kim H Y, Park J, Lee K H, *et al.* Ferulic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice[J]. *Toxicology*, 2011, 282(3): 104-111.
- [16] Chew S F, Ho L, Ong T F, *et al.* The African lungfish, *Protopterus dolloi*, detoxifies ammonia to urea during environmental ammonia exposure[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2005, 78(1): 31-39.
- [17] Cheng C H, Yang F F, Ling R Z, *et al.* Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 164: 61-71.
- [18] Safahieh A, Hedayati A, Savari A, *et al.* Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2012, 28(7): 583-592.
- [19] 强俊, 徐跑, 何杰, 等. 氨氮与拥挤胁迫对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化指标的联合影响[J]. *水产学报*, 2011, 35(12): 1837-1848.
- Qiang J, Xu P, He J, *et al.* The combined effects of external ammonia and crowding stress on growth and biochemical activities in liver of (GIFT) Nile tilapia juvenile (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(12): 1837-1848(in Chinese).
- [20] Sun H J, Lü K, Minter E J A. Combined effects of ammonia and microcystin on survival, growth, antioxidant responses, and lipid peroxidation of bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* larvae[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 221-222: 213-219.
- [21] Jin J L, Wang Y, Wu Z X, *et al.* Transcriptomic analysis of liver from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) exposed to high environmental ammonia reveals the activation of antioxidant and apoptosis pathways[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 63: 444-451.
- [22] Trenzado C E, Morales A E, Palma J M, *et al.* Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 149(3): 440-447.
- [23] Mai W J, Yan J L, Wang L, *et al.* Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 100(3): 271-281.
- [24] Lam F W S, Wu S Y, Lin S J, *et al.* The expression of two novel orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) TNF genes in peripheral blood leukocytes, various organs, and fish larvae[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 618-629.

Effect of acute ammonia toxicity on genes involved in antioxidant and inflammation in head kidney macrophage of *Pelteobagrus fulvidraco*

LI Bing, ZHANG Muzi, LI Ming*, YUAN Lixia, WANG Rixin

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A study was carried out to test the response of genes involved in antioxidant and inflammation in head kidney macrophage to acute ammonia toxicity for 96 h. 0.14 and 0.28 mg/L total ammonia nitrogen (TA-N) groups had lower mRNA expression of *SOD* than that of fish in control, but the highest mRNA expression of *GPX* was found in 0.28 mg/L TA-N group; 0.14 and 0.28 mg/L TA-N groups had lower mRNA expression of *IL-1* and *TNF* than those of control group, and 0.28 mg/L TA-N group had lower mRNA expression of *IL-8* than that of fish in 0.14 mg/L TA-N and control groups; detection with acridine orange staining showed that irregular acridine signal were detected in fish head kidney macrophage cells (HKMC) exposed to 0.14 mg/L TA-N, while HKMC treated with 0.28 mg/L TA-N exhibited extremely high fluorescence intensity. This study indicated that ammonia exerts its toxic effects by interfering with the mRNA expression of antioxidant genes; the apoptosis may be one of the main causes of death caused by ammonia poisoning.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; head-kidney macrophage; ammonia; antioxidant; inflammation; apoptosis

Corresponding author: LI Ming. E-mail: liming1@nbu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31502176, 31472279); Natural Science Foundation of Ningbo City (2016A610083)