

文章编号: 1000-0615(2019)04-0810-10

DOI: 10.11964/jfc.20180511288

培养温度对LPS诱导的离体大黄鱼头肾巨噬细胞 抗氧化能力和炎症反应的影响

李庆飞, 崔 坤, 艾庆辉*, 麦康森

(中国海洋大学水产学院, 农业农村部水产动物营养与饲料重点实验室,
海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为研究温度对离体大黄鱼头肾巨噬细胞抗氧化能力和炎症反应的影响, 从大黄鱼头肾组织中分离巨噬细胞结合贴壁筛选法得到细胞单层后, 在不同温度(16、22和28 °C)下培养备用。使用25 μg/mL的脂多糖(LPS)孵育细胞2 h后, 测定不同培养温度下离体细胞活力、呼吸爆发活性、抗氧化酶(SOD和CAT)活性以及相关基因(*SOD*、*CAT*、*Hsp70*和*IL-1β*)表达的情况。结果显示, 体外培养细胞36 h后, 16 °C和22 °C条件下培养的细胞活力显著高于28 °C处理组; LPS处理组大黄鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性显著升高, 但SOD和CAT酶活性较对照组显著下降。高温(28 °C)显著提高了细胞CAT酶的活性和基因表达水平, 但SOD酶活性和基因表达变化差异不显著; LPS显著促进了大黄鱼头肾巨噬细胞*IL-1β*基因的表达, 并且随培养温度升高细胞*IL-1β*基因的表达水平显著降低; 但大黄鱼头肾巨噬细胞*Nrf2*和*Hsp70*的基因表达量随温度升高而显著增加, 且LPS处理组细胞基因表达水平显著高于对照组。研究表明, 温度显著影响了离体大黄鱼头肾巨噬细胞的抗氧化能力和LPS所诱导的促炎基因的表达, *Nrf2*和*Hsp70*在这一过程中可能发挥重要作用。

关键词: 大黄鱼; 巨噬细胞; 细胞培养; 脂多糖; 抗氧化能力; 呼吸爆发; 热休克蛋白

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国海水网箱养殖量最大的鱼种, 也是我国重要的海水经济鱼类之一^[1]。近年来, 病害问题成为制约大黄鱼养殖业持续稳定发展的重要因素。鱼类依靠自身的免疫系统抵御病原菌的侵害, 因此, 对鱼类免疫功能的研究具有现实意义。鱼类在进化上属于低等脊椎动物, 特异性免疫功能并不完善, 主要依靠固有免疫系统行使免疫防御功能^[2]。其中鱼类的抗氧化系统是鱼类固有免疫系统的第一道防线。当鱼类免疫系统感知到病原菌入侵, 机体免疫细胞则生成活性氧(ROS)等物质杀死病原微生物^[3], 通常作为衡量鱼类免疫防御能力的一个重要指标^[4]。然而, 过多的ROS会对细

胞和机体构成损伤, 这时细胞就会通过抗氧化系统来清除过多的ROS以降低其对细胞或机体造成的损伤^[5]。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)是鱼体应对氧化损伤的重要抗氧化酶, 分别将ROS还原成为氧分子和水, 从而维持细胞和机体稳态, 保证正常生理和免疫功能的发挥^[6]。

由于鱼类是变温动物, 环境温度是影响鱼类抗氧化能力等免疫反应发挥的重要限制因子。当环境温度超过鱼类最适温度便会造成鱼类胁迫应激反应的发生, 一旦超过机体自身调节能力的范围后, 则抑制机体免疫机能, 增加机体对病原菌的易感性, 导致发病率和死亡率升高^[7]。已有研究表明, 环境温度可以影响鱼类

收稿日期: 2018-05-19 修回日期: 2018-05-30

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-47-G11)

通信作者: 艾庆辉, E-mail: qhai@ouc.edu.cn

的抗氧化系统以及对病害的防御能力^[8]。对大黄鱼而言, 每年的高温期养殖水域温度可达到30℃以上, 超过了其最适生活温度^[9-10], 显著影响了大黄鱼免疫功能的发挥^[11], 降低了鱼类机体对疾病的抵抗力, 是导致高温期大黄鱼疾病流行和暴发的一个重要原因。

目前有关温度对鱼类抗氧化和免疫防御能力的研究大多是基于在体实验开展的, 但由于受到鱼的种类、年龄、营养状况、其他环境应激因子以及自身神经、体液因素的影响, 其研究结果存在较大的差异, 甚至是截然相反, 导致相关研究存在较多争议。巨噬细胞是鱼类固有免疫系统的中心细胞, 也是ROS以及免疫细胞因子的主要生成者。利用鱼类巨噬细胞培养技术, 体外研究温度对鱼类巨噬细胞抗氧化能力和免疫防御能力的影响, 可排除在体实验中多种因素的干扰, 有助于对相关现象的发生开展机制探究。在本研究中, 利用免疫刺激物LPS处理离体大黄鱼头肾巨噬细胞, 建立免疫刺激模型, 并利用此模型首次探究温度对LPS诱导的大黄鱼头肾巨噬细胞抗氧化能力和免疫相关基因表达的影响, 有助于了解温度对大黄鱼固有免疫反应的影响及其调控机制, 同时为规范养殖管理, 提高大黄鱼养殖成功率提供基础的科学数据。

1 材料与方法

1.1 实验对象

1龄左右的实验大黄鱼购自浙江象山黄避岙镇养殖网箱, 暂养于宁波海洋与渔业创新研究基地内水系统中, 实验期间水温为14~18℃。选取有活力、健康且体表无损伤的个体用于细胞培养实验。

1.2 实验药品

Percoll试剂购自美国Pharmacia公司, DMEM/F12培养基、胎牛血清(FBS)购自以色列BI公司; 细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK8)购自北京索莱宝科技有限公司, SOD和CAT酶活试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所; 细菌脂多糖(LPS, *Escherichia coli* 055:B5)和佛波醇乙酯(PMA)购自美国Sigma公司; 双抗(青霉素/链霉素)、四唑氮蓝(NBT)、二甲基亚砜(DMSO)购自美国Amresco公司; Trizol、PrimeScript RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq和DEPC水购自日本TaKaRa公司;

Real time-PCR引物由青岛擎科梓熙生物技术有限公司合成并提供。

1.3 大黄鱼头肾巨噬细胞的分离培养

分离培养参考本课题组之前的方法^[12]。解剖并取出头肾组织, 轻轻研磨挤压使头肾组织通过100 μm网孔, 得到细胞悬液, 利用水平梯度离心技术结合贴壁筛选法得到大黄鱼头肾巨噬细胞单层, 细胞在含有5% FBS的培养基中分别于16、22和28℃条件下继续培养备用。

1.4 细胞活力与功能测定

将接种于96孔板中的巨噬细胞分别置于16、22和28℃下培养, 分别于6、12、24和36 h后对细胞活力进行测定。细胞活力测定根据CCK8细胞增殖检测试剂盒说明书要求进行, 使用酶标仪在450 nm波长处测定OD值, 间接反映活细胞活力。

1.5 LPS对巨噬细胞的免疫刺激

配制浓度为25 μg/mL的LPS溶液。实验开始前弃去96孔板或6孔板中原有的细胞培养液, 分别加入LPS溶液, 继续置于16、22和28℃下培养2 h后进行细胞活力、呼吸爆发、抗氧化酶活性和基因表达的检测, 设置DMEM处理组为对照组。

1.6 免疫指标的测定

呼吸爆发活性测定 细胞呼吸爆发活性的测定参照Secombes^[13]的方法。弃去96孔板中的培养液, 每孔加入含有PMA的NBT溶液孵育30 min, 孵育结束后加入纯甲醇固定细胞10 min, 再以70%的甲醇溶液洗2次后将96孔板自然风干, 之后每孔依次加入120 μL 2 mol/L的KOH和140 μL的DMSO, 630 nm波长下读取吸光值, 以KOH/DMSO设置为调零孔。

抗氧化酶活性的检测 LPS孵育结束后, 用PBS清洗2次, 利用细胞刮刀收集6孔板中的贴壁细胞, 加入100 μL的PBS, 在冰浴条件下进行超声波裂解。5 000×g离心10 min后取上清液。蛋白浓度采用BCA法进行测定, 细胞SOD和CAT活性的测定按照试剂盒提供的方法进行。细胞SOD活性(U/mg prot)根据WST-1法进行测定^[14]。CAT活性(U/mg prot)根据紫外法测定^[15]。

抗氧化和免疫基因的表达 按照Trizol法提取细胞RNA, 具体实验步骤参考已发表文献^[16]。已提取的RNA通过琼脂糖电泳和Nanodrop检测核酸完整性和浓度, 合格的RNA置于-80℃冰箱中

保存用于后续实验。使用TaKaRa公司的Prime Script™ RT Reagent Kit试剂盒合成cDNA。根据NCBI数据库查询大黄鱼相关基因的序列信息,并利用在线引物设计功能设计定量引物,β-actin为内参基因(表1)。使用SYBR® Green I嵌合荧光法进行实时荧光定量PCR分析。总反应体系为20 μL,包括10.0 μL SYBR® Premix Ex Taq™ (2×), 0.8 μL cDNA模板,上下游引物各0.8 μL, 7.6 μL RNase-free水。Real-time PCR反应条件:预变性 95 °C 2 min;变性 95 °C 15 s,引物退火 58 °C 15 s,引物延伸 72 °C 20 s,40个循环。计算基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,目的基因mRNA相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta C_t}$,式中, $\Delta C_t=[C_t(\text{目的基因})-C_t(\beta\text{-actin})]$, $\Delta\Delta C_t=[\Delta C_t(\text{实验组})-\Delta C_t(\text{对照组})]$ 。

1.7 数据分析

所有数据的统计分析均在SPSS 18.0软件中进行。数据用mean±SE(n=4)表示。数据采用单因素方差分析(ANOVA),当处理组之间差异达到显著水平时($P<0.05$),采用Tukey氏检验进行多重比较分析。

2 结果

2.1 培养温度和LPS对大黄鱼头肾巨噬细胞活力的影响

利用CCK8细胞增殖检测试剂盒检测细胞活力。28 °C培养条件下,细胞活力随培养时间延长呈现下降的趋势,细胞培养36 h后的活力显著低于6 h和12 h的活力($P<0.05$);16 °C和22 °C条件下培养的细胞活力在36 h内无显著变化(图1)。

细胞培养24 h后,与对照组相比,LPS处理2 h后的大黄鱼头肾巨噬细胞的活力没有出现显著性差异,且各温度处理组间的细胞活力差异

不显著(图2)。

2.2 培养温度和LPS对大黄鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性的影响

LPS孵育2 h后显著提高了大黄鱼头肾巨噬细胞的呼吸爆发活性($P<0.05$)。对照组巨噬细胞呼吸爆发活性随温度变化差异不显著;LPS处理组细胞呼吸爆发活性随温度升高而显著降低,28 °C培养条件下细胞呼吸爆发活性显著低于16 °C处理组($P<0.05$)(图3)。

2.3 培养温度和LPS对大黄鱼头肾巨噬细胞抗氧化酶活性的影响

LPS处理组巨噬细胞的SOD酶活性显著低于对照组($P<0.05$),且培养温度对大黄鱼头肾巨噬细胞SOD酶活性无显著影响(图4-a)。

LPS处理组CAT酶活性显著低于对照组($P<0.05$),且28 °C条件下培养的大黄鱼头肾巨噬细胞的CAT酶活性较16和22 °C处理组显著升高($P<0.05$)(图4-b)。

2.4 培养温度和LPS对大黄鱼头肾巨噬细胞抗氧化酶基因表达的影响

对照组和LPS处理组巨噬细胞SOD基因表达随温度升高呈下降的趋势,但差异不显著;各实验处理组间巨噬细胞SOD基因表达差异不显著(图5-a)。

随着温度升高,对照组和LPS处理组巨噬细胞的CAT基因表达显著增加,28 °C条件下培养的大黄鱼头肾巨噬细胞CAT的基因表达量显著高于16和22 °C处理组($P<0.05$);在28 °C培养条件下,LPS处理组的大黄鱼头肾巨噬细胞CAT的基因表达水平显著高于对照组($P<0.05$)(图5-b)。

对照组和LPS处理组巨噬细胞Nrf2的基因表

表1 荧光定量PCR所用引物序列

Tab. 1 Primer pair sequences for Real-time PCR in this study

引物 primers	引物序列 sequences(5'-3')	扩增效率 efficiency
CAT-F/R	CTACACTCAGGTGCTGAACAAA/TTGACTTGTCGAGAAGGGTCT	0.99
SOD1-F/R	TTGCCAAGATCAGCATCACA/TCTCCTCATTGCCTCCTTTT	1.04
Nrf2-F/R	GTGATGCATTCCAGTCAACA/CTGTTTCCTCATCGAGCTGT	0.99
Hsp70-F/R	GGCCGACTTAGCAAAGAGGA/CAATCGGCTTGACACCTTC	1.02
IL-1β-F/R	CAATCTGGCAAGGATCAGC/GGACGGACACAAGGGTACTAA	1.05
β-actin-F/R	GACCTGACAGACTACCTCATG/AGTTGAAGGTGGTCTCGTGGA	0.99

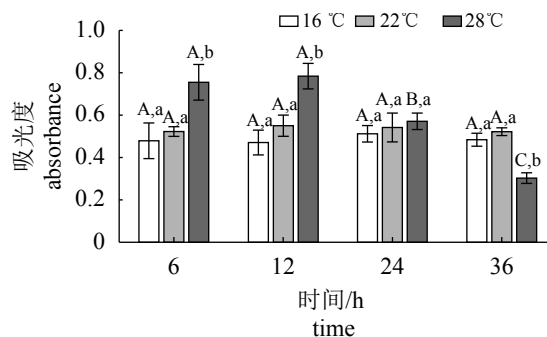


图1 不同温度下培养36 h内的大黄鱼头肾巨噬细胞活力的变化

柱状图上不同大写字母表示同一温度处理组间数据差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示同一时间处理组间数据差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 1 Effects of culture temperature on cell viability of *L. crocea* head kidney macrophages after being incubated for 0-36 h

Different capital letters above bars indicate significant differences among treatments at the same temperature, different lowercase letters above bars indicate significant differences among treatments at the same time ($P < 0.05$)

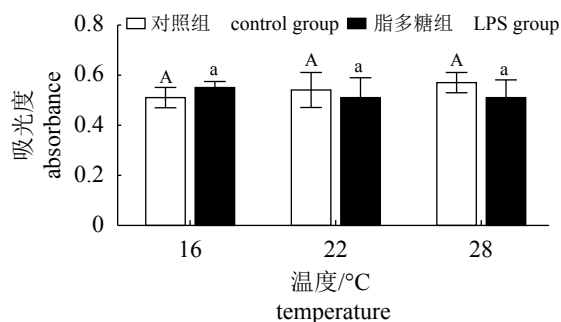


图2 培养温度对各处理组大黄鱼头肾巨噬细胞活力的影响

柱状图上不同字母表示相同处理不同培养温度处理组数据间差异显著 ($P < 0.05$)。下同

Fig. 2 Effects of culture temperature on cell viability of *L. crocea* head kidney macrophages incubated with DMEM or LPS for 2 h

Different letters above bars indicate significant differences among different culture temperatures at the same treatment ($P < 0.05$). The same below

达随温度升高而显著增加 ($P < 0.05$); 与对照组相比, LPS显著促进了28 °C条件下培养的大黄鱼头肾巨噬细胞*Nrf2*基因的表达 ($P < 0.05$) (图5-c)。

2.5 培养温度和LPS对大黄鱼头肾巨噬细胞炎症基因表达的影响

与对照组相比, LPS孵育2 h后显著促进了

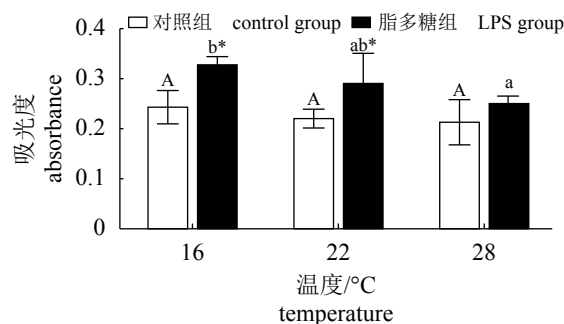


图3 培养温度对各处理组大黄鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性的影响

*表示同一温度条件下LPS处理组与对照组相比数据差异显著 ($P < 0.05$)。下同

Fig. 3 Effects of culture temperature on respiratory burst activity of *L. crocea* head kidney macrophages incubated with DMEM or LPS for 2 h

* indicate significant differences when LPS groups compared to control groups at the same temperature ($P < 0.05$). The same below

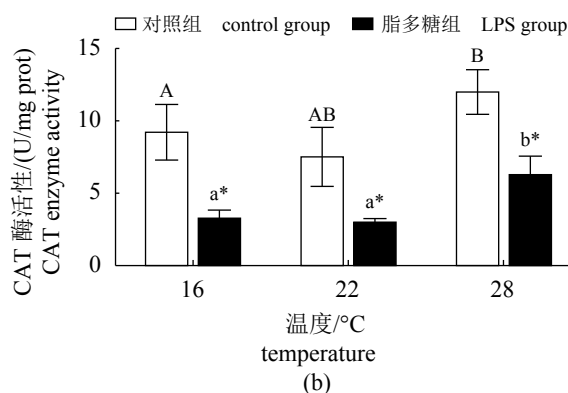
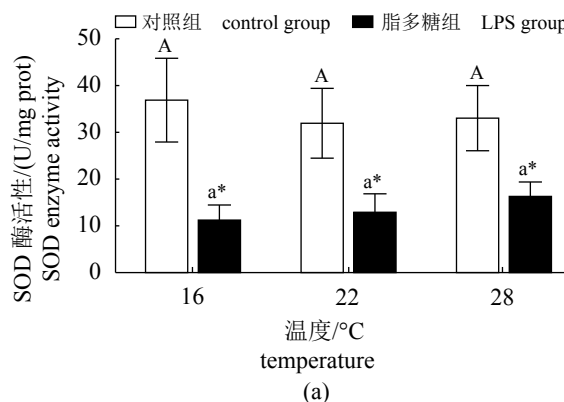


图4 培养温度对各处理组大黄鱼头肾巨噬细胞SOD (a) 和CAT (b) 酶活性的影响

Fig. 4 Effects of culture temperature on SOD (a) and CAT (b) enzyme activity of *L. crocea* head kidney macrophages incubated with DMEM or LPS for 2 h

各温度处理组大黄鱼头肾巨噬细胞*IL-1β*的基因表达 ($P < 0.05$)。对照组和LPS处理组大黄鱼头肾

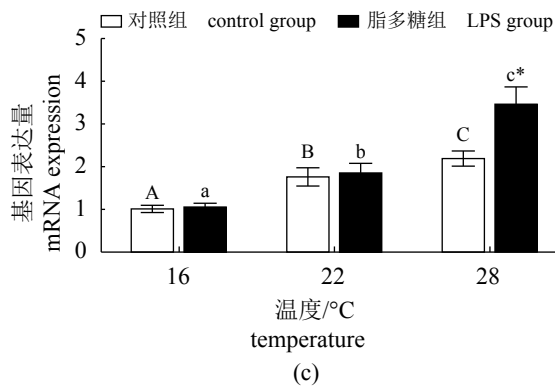
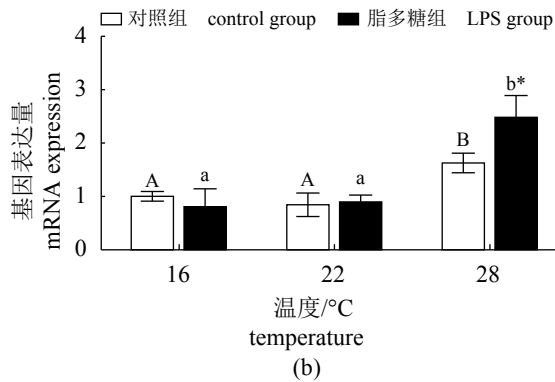
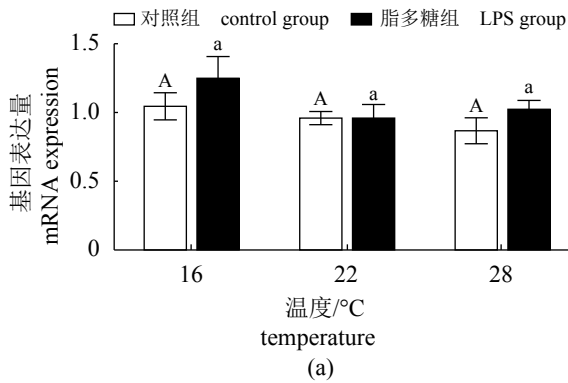


图5 培养温度对各处理组大黄鱼头肾巨噬细胞 *SOD* (a)、*CAT* (b)和*Nrf2* (c) 基因表达的影响

Fig. 5 Effects of culture temperature on *SOD* (a), *CAT* (b) and *Nrf2* (c) mRNA expression of *L. crocea* head kidney macrophages incubated with DMEM or LPS for 2 h

巨噬细胞*IL-1β*基因表达随温度升高而显著降低($P<0.05$)(图6)。

2.6 培养温度和LPS对大黄鱼头肾巨噬细胞 *Hsp70*基因表达的影响

各处理组巨噬细胞*Hsp70*基因表达量随温度升高而显著增加($P<0.05$)；与对照组相比，LPS显著促进了各温度处理组大黄鱼头肾巨噬细胞*Hsp70*的基因表达($P<0.05$)(图7)。

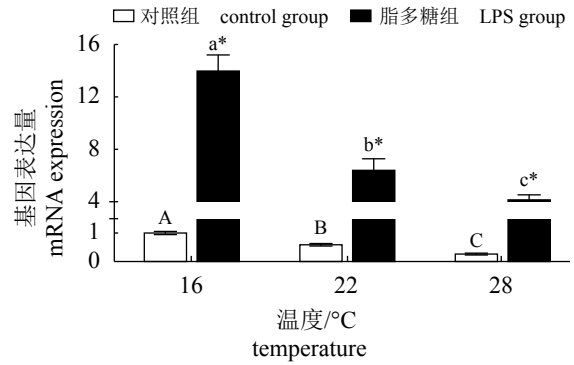


图6 培养温度对各处理组大黄鱼头肾巨噬细胞 *IL-1β*基因表达的影响

Fig. 6 Effects of culture temperature on *IL-1β* mRNA expression of *L. crocea* head kidney macrophages incubated with DMEM or LPS for 2 h

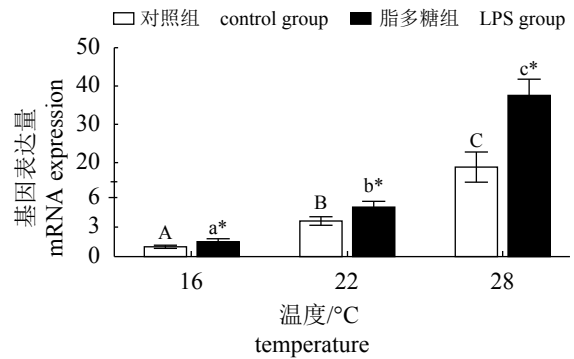


图7 培养温度对各处理组大黄鱼头肾巨噬细胞 *Hsp70*基因表达的影响

Fig. 7 Effects of culture temperature on *Hsp70* mRNA expression of *L. crocea* head kidney macrophages incubated with DMEM or LPS for 2 h

3 讨论

有关大黄鱼巨噬细胞最适培养温度的研究已经开展，使用MTT方法检测细胞活力变化的结果与本实验中利用CCK8细胞活力检测试剂盒得到的结果基本一致，大黄鱼头肾巨噬细胞在22 °C培养条件下的活力要高于16和 28 °C的处理组^[17]。但是以上两种方法都是基于细胞内酶活性反应后生成甲臞，溶解后间接通过吸光值衡量活细胞数目，存在一定的误差。本实验中，28 °C培养条件下的巨噬细胞在6 h和12 h的吸光值显著高于其他处理组，之后显著下降，原因是高温条件下相同活细胞的酶活性较低温组高，之后细胞数目减少导致吸光值下降。可见，通过酶活性方法来判断细胞状态以及最适培养条件存

在一定的局限性。细胞功能能否正常发挥还应该是一个重要的评判指标。本研究结果显示, 16 °C培养条件下的大黄鱼巨噬细胞对LPS的免疫响应能力显著高于22和28 °C处理组, 体现出更好的细胞功能。由于鱼类属于变温动物, 在一定的温度范围内细胞仍然可以保持正常功能和生理的完整性。因此, 对于鱼类细胞培养温度的选择方面尚无定论^[18]。建议在设置并优化鱼类细胞培养条件时, 将典型基因的转录表达水平作为一种更精细反映细胞功能的评价指标, 以获得最优的培养条件和细胞状态。

LPS是革兰氏阴性菌细胞壁的重要组成成份, 具有刺激动物产生免疫应答反应的作用, 是免疫学研究中常用的免疫刺激物^[19]。同大西洋鲑(*Salmo salar*)^[20]和舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[21]等鱼类类似, LPS可以显著提高大黄鱼头肾巨噬细胞ROS的生成量。温度对鱼类巨噬细胞呼吸爆发活性的影响已有大量研究。有研究报道, 鱼类在低温条件下免疫应答功能低下, 在较高的温度下免疫应答功能更强。低温条件下(15 °C)虹鳟(*Onchorhynchus mykiss*)中性粒细胞ROS的生成量较高温处理组(23 °C)低^[22]。但也有研究报道, 低温条件下更有利于鱼类免疫功能的发挥。低温显著促进斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)呼吸爆发活性和杀菌能力^[23]; 与较高水温(14 °C)相比, 从低温(7 °C)环境养殖的虹鳟头肾分离的巨噬细胞对巨噬细胞活化因子(MAF)引起的刺激更敏感, 呼吸爆发活性更高^[24]; 对鲤(*Cyprinus carpio*)的研究也得到了类似的结果, 低温(12 °C)培养的鲤头肾巨噬细胞的呼吸爆发活性显著高于相对高温条件(20和28 °C)下培养的巨噬细胞^[25]。与以上结果基本一致, 低温可以增强LPS所诱导的大黄鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性。

细胞呼吸爆发活性是由激活的NADPH氧化酶系统和抗氧化系统的共同作用决定的^[26]。生物机体中抗氧化系统包括SOD、CAT和Nrf2等抗氧化元件。机体或者细胞产生的ROS被抗氧化系统清除, 同时表现出抗氧化酶活性降低, 本实验中低温促进LPS诱导的大黄鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性增强的同时, SOD和CAT酶活性显著降低也支持了上述观点。此外, 尽管对照组和LPS处理组的大黄鱼头肾巨噬细胞在不同培养温度下的SOD酶活性和基因表达差异不显著, 但是高温(28 °C)显著促进了细胞CAT酶活性以及CAT和

Nrf2抗氧化基因的表达。同其他鱼类的在体实验结果相类似, 军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[27]、中华鲟(*Acipenser sinensis*)^[28]、松浦镜鲤^[29]、胡鲈(*Clarias batrachus*)^[30]、黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)^[31]的血清(或肝脏)抗氧化酶(SOD和CAT等抗氧化酶)的活性随水温升高而升高。一种理论认为, 在鱼类适宜水温范围内, 水温升高可以提高鱼体代谢速率, 加快氧自由基的产生, 从而作为一种反馈调节促进抗氧化酶活性的升高^[32]。但也有一种理论认为, 相比高温, 低温促进了细胞膜不饱和脂肪酸的增加, 从而导致细胞更易受到氧化应激, 形成ROS或过氧化物^[33-35], 进而提高了抗氧化酶的活性。造成这种差异有可能是实验环境、鱼的种类、不同器官的抗氧化能力对温度表现出不同的响应机制造成的^[36]。

LPS还是细菌特有的病原相关分子模式(PAMP), 在免疫学相关研究中, 还常用于模拟细菌侵染过程, 诱导鱼类巨噬细胞产生大量的促炎因子^[37], 其过程已被证明同样也受到温度的影响^[38]。本研究中, 相较22和28 °C, 低温条件下(16 °C)LPS处理组的大黄鱼头肾巨噬细胞IL-1 β 基因的表达显著增加, 提示了低温条件下大黄鱼巨噬细胞对抵抗病原入侵的免疫反应更强烈。在对鲈(*Perca fluviatilis*)的研究中也发现, 低温促进了鱼类对病原的识别能力^[39]; 在低温条件(10 °C), poly(I : C)诱导大西洋鲑(*Gadus morhua*)炎性细胞因子和趋化因子的生成要显著高于16 °C处理组^[40]。但与在大西洋鲑上得到的实验结果不同, 用poly(I : C)注射七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*), 高温处理组(25 °C)Mx基因的表达显著高于其他温度处理组(20和15 °C)^[41]; 同样, 离体实验结果也表明, 在22 °C的培养条件下, LPS诱导的虹鳟头肾白细胞IL-1 β 的表达显著高于14 °C处理组^[42]。综合已有的研究报道, 温度影响LPS所诱导的鱼类巨噬细胞炎性基因的表达存在明显的物种差异性, 但造成这种差异的原因和机制尚不清楚。

LPS刺激细胞产生的ROS除了会造成巨噬细胞氧化损伤外, 还能够通过增强核转录因子NF- κ B入核引起细胞的炎性反应^[43]。本研究表明, 不同温度处理组大黄鱼巨噬细胞IL-1 β 基因的表达与ROS的生成呈正相关, 同时还与Nrf2基因的表达呈负相关。Nrf2不仅能够维持机体抗氧化系统的功能, 还具有降低炎性反应的作用^[44]。Tan等^[45]在对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)的研究中发现,

Nrf2信号通路的激活抑制了NF- κ B的入核,进而降低了炎症基因*TNF α* 和*IL-1 β* 的表达。在本研究中,高温(28 °C)条件下,LPS所诱导大黄鱼巨噬细胞ROS生成量和*IL-1 β* 的表达量显著降低,可能是通过激活细胞Nrf2抗氧化系统来实现的。

此外,温度变化会使动物机体内热休克蛋白家族(heat shock proteins, HSPs)的蛋白表达量发生变化。HSPs是生物体内重要的分子伴侣,具有防止蛋白变性、蛋白复性以及水解变性蛋白等作用^[46]。其中,Hsp70是研究最多的HSP,在哺乳动物中的研究表明,Hsp70可以增强机体或细胞的抗氧化能力,抑制氧自由基的生成^[47],还可以通过协同免疫作用,发挥炎症损伤保护的机制^[48-49]。有学者认为,Hsp70在鱼类中也具有类似的抗氧化和抑制炎症的功能^[50-51]。在本研究中,随着培养温度升高,大黄鱼头肾巨噬细胞*Hsp70*基因表达显著增加,并且LPS进一步促进了其表达,表明其可能是细胞在胁迫条件下对自身的一种适应性保护策略。因此,*Hsp70*基因的高表达可能是导致细胞呼吸爆发活性和*IL-1 β* 的基因表达显著降低的重要原因之一。

本研究利用免疫刺激物LPS处理离体大黄鱼头肾巨噬细胞,建立模拟细菌感染过程的细胞模型,并利用此模型首次探究温度对LPS诱导的大黄鱼头肾巨噬细胞抗氧化能力和免疫相关基因表达的影响。高温显著抑制了由LPS所诱导的巨噬细胞呼吸爆发活性和*IL-1 β* 基因的表达,显著提高了CAT酶活性以及*CAT*、*Nrf2*和*Hsp70*基因的表达。温度影响LPS所诱导的大黄鱼头肾巨噬细胞的氧化应激以及炎症反应的发生可能是通过Nrf2介导的抗氧化系统和HSPs蛋白而实现的。

参考文献:

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 2017中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版, 2017.
- Fisheries and Fisheries Administration Bureau of Ministry of Agriculture. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017 (in Chinese).
- [2] Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 137-151.
- [3] Sealey W M, Gatlin III D M. *In vitro* manipulations of vitamin C and vitamin E concentrations alter intracellular O-2 production of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) head-kidney cells[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(2): 131-140.
- [4] Yang Y H, Bazhin A V, Werner J, *et al.* Reactive oxygen species in the immune system[J]. *International Reviews of Immunology*, 2013, 32(3): 249-270.
- [5] Marikovsky M, Ziv V, Nevo N, *et al.* Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response[J]. *The Journal of Immunology*, 2003, 170(6): 2993-3001.
- [6] Wang L, Wu Z Q, Wang X L, *et al.* Immune responses of two superoxide dismutases (SODs) after lipopolysaccharide or *Aeromonas hydrophila* challenge in pufferfish, *Takifugu obscurus*[J]. *Aquaculture*, 2016, 459: 1-7.
- [7] Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates[J]. *Aquaculture*, 1999, 172(1-2): 125-145.
- [8] 覃川杰, 杨川, 陈昌福. 水温对鱼类免疫活动的影响[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 39(5): 129-133.
- Qin C J, Yang C, Chen C F. Effect of environmental temperature on immune status of fish[J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2011, 39(5): 129-133(in Chinese).
- [9] 刘家富. 大黄鱼养殖与生物学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2013.
- Liu J F. Culture and Biology of Large Yellow Croaker[M]. Xiamen: Xiamen University Press, 2013.
- [10] 阮成旭, 吴德峰, 袁重桂. 温度对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)幼鱼生长和养殖水质的影响[J]. *广州大学学报(自然科学版)*, 2013, 12(2): 36-39.
- Ruan C X, Wu D F, Yuan C G. Effects of temperature on the growth and hydrochemical state of juvenile *Pseudosciaena crocea*[J]. *Journal of Guangzhou University (Natural Science Edition)*, 2013, 12(2): 36-39(in Chinese).
- [11] 杨启莲. 大黄鱼HSP及caspase家族部分基因对温度胁迫的响应[D]. 厦门: 集美大学, 2011.
- Yang Q L. Response characterization of some HSP and caspase genes of large yellow croaker to temperature stress[D]. Xiamen: Jimei University, 2011 (in Chinese).
- [12] Li Q F, Ai Q H, Mai K S, *et al.* *In vitro* effects of arachidonic acid on immune functions of head kidney macrophages isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Aquaculture*, 2012, 330: 47-53.
- [13] Secombes C J. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity[M]//Stolen J S, Fletcher T C, Anderson D P, *et al.* Techniques in Fish Immunology.

- Fair Haven: SOS Publications, 1990: 137-155.
- [14] Peskin A V, Winterbourn C C. Assay of superoxide dismutase activity in a plate assay using WST-1[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, 103: 188-191.
- [15] Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range[J]. *Clinica Chimica Acta*, 1991, 196(2-3): 143-151.
- [16] Wang T J, Yan J, Xu W, *et al.* Characterization of cyclooxygenase-2 and its induction pathways in response to high lipid diet-induced inflammation in *Larimichthys crocea*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19921.
- [17] Li Q F, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Development of a short-term *in vitro* model of macrophages from large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(5): 885-891.
- [18] 李庆飞. 高不饱和脂肪酸对离体大黄鱼头肾巨噬细胞营养生理及免疫力的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Li Q F. Effects of highly unsaturated fatty acids on nutritional physiology and immunity of macrophages isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) head kidney[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011 (in Chinese).
- [19] Freudenberg M A, Tchaptchet S, Keck S, *et al.* Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: benefits and hazards of LPS hypersensitivity[J]. *Immunobiology*, 2008, 213(3-4): 193-203.
- [20] Solem S T, Jørgensen J B, Robertsen B. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1995, 5(7): 475-491.
- [21] Sarmiento A, Marques F, Ellis A E, *et al.* Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16(2): 79-92.
- [22] Sohnle P G, Chusid M J. The effect of temperature on the chemiluminescence response of neutrophils from rainbow trout and man[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 1983, 93(4): 493-497.
- [23] Ainsworth A J, Dexiang C, Waterstrat P R, *et al.* Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)—I. Leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior kidney at 10°C[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1991, 100(4): 907-912.
- [24] Hardie L J, Fletcher T C, Secombes C J. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1994, 18(1): 57-66.
- [25] Le Morvan C, Clerton P, Deschaux P, *et al.* Effects of environmental temperature on macrophage activities in carp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1997, 7(3): 209-212.
- [26] Reis K, Hålldin J, Fernaeus S, *et al.* NADPH oxidase inhibitor diphenyliodonium abolishes lipopolysaccharide-induced down-regulation of transferrin receptor expression in N2a and BV-2 cells[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2006, 84(5): 1047-1052.
- [27] 杨健, 陈刚, 黄建盛, 等. 温度和盐度对军曹鱼幼鱼生长与抗氧化酶活性的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2007, 27(4): 25-29.
- Yang J, Chen G, Huang J S, *et al.* Effects of temperature and salinity on the growth and activities of antioxidant enzymes of cobia (*Rachycentron canadum*) juveniles[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2007, 27(4): 25-29(in Chinese).
- [28] 刘松岩. 环境胁迫对中华鲟体内自由基水平和抗氧化酶活力的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- Liu S Y. Effect of environmental stress on free radical level and antioxidant enzymes activities of Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006 (in Chinese).
- [29] 许治冲, 刘晖, 徐奇友, 等. 温度和饲料脂肪水平对松江鲈免疫及抗氧化能力的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2007, 27(5): 429-435.
- Xu Z C, Liu H, Xu Q Y, *et al.* Effects of dietary lipid levels on immunity and antioxidant function in Songpu mirror carp at different temperatures[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2007, 27(5): 429-435(in Chinese).
- [30] Singh S P, Sharma J G, Ahmad T, *et al.* Effect of water temperature on the physiological responses of Asian catfish *Clarias batrachus*[J]. *Asian Fisheries Science*, 2013, 26: 26-38.

- [31] An K W, Kim N N, Shin H S, *et al.* Profiles of antioxidant gene expression and physiological changes by thermal and hypoosmotic stresses in black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 156(2): 262-268.
- [32] Martínez-Álvarez R M, Morales A E, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2005, 15(1-2): 75-88.
- [33] Guderley H, St-Pierre J. Going with the flow or life in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2002, 205(Pt 15): 2237-2249.
- [34] Olsen R E, Løvaas E, Lie Ø. The influence of temperature, dietary polyunsaturated fatty acids, α -tocopherol and spermine on fatty acid composition and indices of oxidative stress in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1999, 20(1): 13-29.
- [35] Bols N C, Mosser D D, Steels G B. Temperature studies and recent advances with fish cells *in vitro*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology*, 1992, 103(1): 1-14.
- [36] 王新安, 郭黎, 马爱军, 等. 基于响应面法分析温度和盐度及其交互作用对大菱鲂幼鱼抗氧化酶活性的影响[J]. *海洋科学*, 2014, 38(6): 17-23.
Wang X A, Guo L, Ma A J, *et al.* Effects of temperature, salinity and their interaction on the activities of antioxidant enzymes of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* based on response surface methodology[J]. *Marine Sciences*, 2014, 38(6): 17-23(in Chinese).
- [37] Chettri J K, Raida M K, Holten-Andersen L, *et al.* PAMP induced expression of immune relevant genes in head kidney leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(4): 476-482.
- [38] Abram Q H, Dixon B, Katzenback B A. Impacts of low temperature on the teleost immune system[J]. *Biology*, 2017, 6(4): 39.
- [39] Marnila P, Lilius E M. Thermal acclimation in the perch (*Perca fluviatilis* L.) immunity[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2015, 54: 47-55.
- [40] Hori T S, Gamperl A K, Booman M, *et al.* A moderate increase in ambient temperature modulates the Atlantic cod (*Gadus morhua*) spleen transcriptome response to intraperitoneal viral mimic injection[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 431.
- [41] Thanasaksiri K, Sakai N, Yamashita H, *et al.* Influence of temperature on Mx gene expression profiles and the protection of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, against red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) infection after poly (I: C) injection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(2): 441-445.
- [42] Zou J, Holland J, Pleguezuelos O, *et al.* Factors influencing the expression of interleukin-1 β in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2000, 24(6-7): 575-582.
- [43] Swain P, Nayak S K, Nanda P K, *et al.* Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 191-201.
- [44] Kim J, Cha Y N, Surh Y J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2010, 690(1-2): 12-23.
- [45] Tan P, Dong X J, Xu H L, *et al.* Dietary vegetable oil suppressed non-specific immunity and liver antioxidant capacity but induced inflammatory response in Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 63: 139-146.
- [46] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology[J]. *Annual Review of Physiology*, 1999, 61: 243-282.
- [47] Chong K Y, Lai C C, Lille S, *et al.* Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1998, 30(3): 599-608.
- [48] 崔彦婷, 刘波, 谢骏, 等. 热休克蛋白研究进展及其在水产动物中的研究前景[J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(03): 303-306.
Cui Y T, Liu B, Xie J, *et al.* Recent advance of heat shock protein and its research prospects in aquatic animals[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2011, 39(03): 303-

- 306.
- [49] Joly A L, Wettstein G, Mignot G, *et al.* Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity[J]. *Journal of Innate Immunity*, 2010, 2(3): 238-247.
- [50] Stolte E H, Chadzinska M, Przybylska D, *et al.* The immune response differentially regulates Hsp70 and glucocorticoid receptor expression *in vitro* and *in vivo* in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(1): 9-16.
- [51] Wang Q F, Shen W L, Hou C C, *et al.* Physiological responses and changes in gene expression in the large yellow croaker *Larimichthys crocea* following exposure to hypoxia[J]. *Chemosphere*, 2017, 169: 418-427.

Effects of culture temperature on antioxidant capacity and inflammatory responses of LPS-induced macrophages from head kidney of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

LI Qingfei, CUI Kun, AI Qinghui*, MAI Kangsen

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education,

Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feed, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,

Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: To study the effects of culture temperature on antioxidant capacity and inflammatory responses of *Larimichthys crocea* macrophages, macrophages were isolated from head kidney of *L. crocea* and resultant monolayer was maintained at 16 °C, 22 °C and 28 °C, respectively. After adding 25 µg/mL LPS medium to macrophage monolayer for 2 h, cell viability, respiratory burst activity, antioxidant enzyme activities and gene expressions together with *IL-1β* and *Hsp70* mRNA expressions of macrophage cultured at different temperatures were evaluated. Results showed that cell viability of macrophages placed at 16 °C and 22 °C was significantly higher than cells cultured at 28 °C after incubation for 36 h. LPS could significantly promote the respiratory burst activity and inhibited the activities of SOD and CAT enzymes. Macrophage incubated at high temperature (28 °C) showed significantly higher CAT enzyme activity and gene expression, whereas no significant difference was found in SOD enzyme activity and gene expression. LPS triggered potent pro-inflammatory response with *IL-1β* being the indicative parameter, which was inhibited by high culture temperature. However, transcript levels of *Nrf2* and *Hsp70* increased with the rise of temperature to a significant extent, and both gene expressions were markedly enhanced by LPS compared to control groups. Taken together, all the results in the present study indicated that temperature may regulate the antioxidant capacity and inflammatory responses of LPS-induced macrophages from head kidney of *L. crocea* through pathways involving *Nrf2* and *Hsp70*.

Key words: *Larimichthys crocea*; macrophages; cell culture; lipopolysaccharide (LPS); antioxidant capacity; respiratory burst activity; heat shock protein (Hsp)

Corresponding author: AI Qinghui. E-mail: qhai@ouc.edu.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-47-G11)