



## 草鱼血红蛋白通过诱导头肾巨噬细胞表达的炎症因子激活免疫反应

秦真东, 詹凡玢, 李亚男, 施 斐, 杨敏璇,  
卢志杰, 李 军\*, 林 鑫\*

(仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,  
广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东 广州 510225)

**摘要:** 为了探究鱼类体内过量游离血红蛋白对鱼体的影响, 本实验以草鱼为研究对象, 通过体内注射血红蛋白模拟体内出血, 探究血红蛋白对组织和组织中巨噬细胞的免疫调控作用。体内注射血红蛋白的实验结果显示, 血红蛋白的刺激导致头肾和中肾组织中出现明显的血红蛋白沉淀, 同时提高了鱼体血清中的抗氧化相关酶活性, 促进了头肾组织中炎症因子基因 *TNF- $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$*  和 *IL-10* 的 mRNA 表达水平。普鲁士蓝和间接免疫荧光实验结果显示, 头肾巨噬细胞对血红蛋白表现出了吞噬活性。荧光定量 PCR 检测结果显示, 血红蛋白的刺激显著激活了头肾巨噬细胞中 *CD68*、*CD86*、*CSF* 和 *MHC-II* 的 mRNA 表达水平。进一步的细胞因子检测结果显示, 血红蛋白刺激 12 h 后, 头肾巨噬细胞中的炎症因子基因 (*TNF- $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$*  和 *IL-4*)、趋化因子基因 (*CCL20* 和 *CCL4*)、*IFN- $\alpha$*  和 *TLR4* 的 mRNA 表达水平被显著上调表达。研究表明, 草鱼头肾巨噬细胞对血红蛋白具有吞噬能力, 同时血红蛋白也激活了巨噬细胞中多种细胞因子的表达。本研究结果首次阐述了草鱼血红蛋白与巨噬细胞的相互作用关系, 丰富了鱼类血液基础免疫学理论, 同时也为鱼类健康养殖提供了新的参考。

**关键词:** 草鱼; 血红蛋白; 巨噬细胞; 细胞因子

**中图分类号:** S 941.4

**文献标志码:** A

水产养殖作为农业中不可或缺的重要组成部分, 不仅为人们提供大量丰富的优质蛋白来源, 同时也为社会提供了大量的就业机会。近年来, 在全社会的重视之下, 水产养殖产业进入发展快车道。据 2021 年渔业年鉴数据显示, 2020 年我国渔业产值达到 13 517 亿元, 水产总产量达到 6 549 万 t, 同比增长 1.06%, 发展势头良好。其中, 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 养殖产量一直位居我国淡水经济鱼类养殖量之首, 2020 年的养

殖总产量达到 557.1 万 t, 同比增长 0.69%。随着草鱼养殖规模和密度的不断扩大, 多种出血性病原诸如嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 和草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 的感染, 一方面导致鱼体大量的死亡, 造成严重的经济损失<sup>[1-2]</sup>。另一方面导致鱼体出血, 释放血红蛋白进入组织, 可能对组织细胞造成损伤, 影响鱼体的正常生长。

血红蛋白是红细胞中含量最多的组成部分,

收稿日期: 2021-08-17 修回日期: 2021-09-28

资助项目: 国家自然科学基金 (31902409, 31872606); 广东省海洋经济发展专项 (粤农 2019A1)

第一作者: 秦真东 (照片), 从事水生动物医学研究, E-mail: qinzhendongsc@163.com

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

林鑫, 从事水产动物医学研究, E-mail: linli@zhku.edu.cn



其含量占红细胞干重的 96% 以上, 主要负责机体氧气的运输, 由于红细胞内存在大量抗氧化酶, 因此在正常情况下, 血红蛋白被保护在红细胞内以防止被氧化<sup>[3]</sup>。当机体处于病理状态下, 导致大量红细胞破碎而释放大量血红蛋白进入血浆或者组织中<sup>[4-6]</sup>。由于血红蛋白的芬顿反应, 游离的血红蛋白在遇到氧气时快速发生氧化, 由 Hb-Fe<sup>II</sup> 氧化成 Hb-Fe<sup>III</sup>, 甚至在髓过氧化物的作用下进一步氧化生成瞬时的 Hb-Fe<sup>IV</sup>, Hb-Fe<sup>IV</sup> 迅速还原成 Hb-Fe<sup>III</sup>, 此过程中产生大量的超氧阴离子、多种自由基以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[7-9]</sup>。由于血红蛋白的高氧化活性, 其进入血浆或者组织后, 容易对机体组织细胞造成严重的氧化损伤并诱发炎症反应, 严重破坏机体微环境的平衡, 造成机体损伤<sup>[10-12]</sup>。因此, 机体急需快速清除过量血红蛋白。目前研究发现, 触珠蛋白 (haptoglobin, Hp) 和血红素结合蛋白 (hemopexin, Hpx) 分别作为血红蛋白的第一和第二道清除蛋白, 其与血红蛋白或血红素形成 Hp-Hb 和 Hpx-heme 复合物, 并随着血液循环进入肝脏等组织中的巨噬细胞中给与分解代谢<sup>[13]</sup>。进入巨噬细胞后在血红素加氧酶 (heme oxygenase, HO)-1 的作用下, 血红素被分解为铁离子、胆绿素和 CO, 其中铁离子被储存在铁蛋白中<sup>[14]</sup>。在哺乳研究模型中发现, 血红蛋白释放大量的 ROS 并调控巨噬细胞多条信号途径而进一步产生高细胞毒性的 ROS, 促进巨噬细胞凋亡以及炎症因子的产生<sup>[4]</sup>。然而, 目前鱼类血红蛋白与巨噬细胞之间相互作用的相关研究仍然较少。

本研究以草鱼血红蛋白和头肾巨噬细胞为对象, 探究血红蛋白与巨噬细胞之间的相互作用。研究结果将丰富鱼类血液免疫相关基础理论, 同时也为草鱼健康养殖提供新的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

实验草鱼体重 (100±10) g, 来自广东省广州市渔场, 暂养于 1 000 L 循环曝气水缸中, 保持溶解氧充足, 水质干净。每天早和晚分别投喂和换水, 实验鱼适应 2 周后开展实验。实验操作过程中严格遵守仲恺农业工程学院动物保护和使用委员会制定的规章制度。

### 1.2 草鱼红细胞及血红蛋白分离

根据本实验前期建立的方法分离红细胞。使用含有肝素钠 (0.1 mg/mL) 的无菌注射器从鱼体尾

静脉采集血液。将采集的血液通过 0.7% 的生理盐水稀释 10 倍, 将稀释后的血液缓慢加入含有 51% Percoll (Pharmacia) 液的 10 mL 离心管中, 在 4 °C 条件下, 400×g 离心 30 min, 收集离心管底部的沉淀物, 即红细胞, 用灭菌 0.7% 生理盐水洗涤 3 次。将纯化后的红细胞反复冻融后, 4 °C 条件下, 10 000×g 离心 30 min, 收集上清液。通过 Bradford 方法测定纯化后血红蛋白的浓度, 15% SDS-PAGE 检测血红蛋白纯度。纯化后的血红蛋白暴露于空气中 12 h, 使其充分氧化。

### 1.3 草鱼头肾巨噬细胞分离

根据 Xu 等<sup>[1]</sup>的方法分离草鱼头肾巨噬细胞。首先对实验鱼进行尾静脉抽血, 尽量抽净鱼体内的血液, 无菌分离头肾组织, 并浸泡于 L15 培养液中浸泡 30 min。将浸泡好的头肾组织通过 100 目筛网以获得单个细胞。将细胞液缓慢添加至含有 34%/51% Percoll 液中, 4 °C 条件下 400×g 离心 30 min。轻轻收集两层 Percoll 液之间的细胞层, 0.7% 生理盐水洗涤 3 次, 以 5% 胎牛血清 (FBS) 的 L15 培养基调整细胞浓度至 5×10<sup>6</sup> 个/mL。将细胞接种至 12 孔板, 2 h 后吸尽培养基以去除未贴壁细胞, 12 h 后再换一次液。

### 1.4 血红蛋白应激实验及样品采集

随机将草鱼分为 2 组, 分别为血红蛋白注射组和磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 对照组, 每组 20 尾鱼。将血红蛋白浓度调节为 5 mg/mL, 每组每尾草鱼分别腹腔注射 1 mL 血红蛋白和 PBS, 在 6、12、24、48 和 96 h 取样分析。其中, 采集的血清用于后续测定抗氧化相关酶活性检测, 头肾和中肾组织采集分别用普鲁士蓝染色和荧光定量 PCR 检测。

### 1.5 血清中抗氧化相关酶活性检测

为探究血红蛋白对草鱼血清抗氧化相关酶活性的影响, 本研究采集了注射血红蛋白 24 h 后草鱼血清, 按照相关检测试剂盒说明书检测了血清中抗氧化相关的酶活性, 主要包括超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽酶 (GSH)、过氧化氢酶 (CAT) 和补体 (C3), 本研究中使用的酶活性试剂盒均来自南京建成生物工程研究所。

### 1.6 头肾巨噬细胞的普鲁士蓝染色

将分离的巨噬细胞均匀铺到含有爬片的 24 孔板中, 实验组中加入血红蛋白使其终浓度为 2 mg/mL, 对照组加入等体积的培养基。孵育

2 h后, 4%的多聚甲醛固定 10~20 min, 水洗 2 次后风干, 用适量的 perls stain 以覆盖爬片, 染色 15~30 min。水洗 5~10 min 后加入伊红染色液染细胞核 15~30 s, 水洗 5 s 后中性树胶封片, 显微镜下观察拍照。

### 1.7 间接免疫荧光实验

将分离的巨噬细胞均匀铺到含有爬片的 24 孔板中, 实验组中加入血红蛋白使其浓度为 2 mg/mL, 对照组加入等体积的培养基。孵育 2 h 后, 4%的多聚甲醛固定, PBS 洗涤 2 次后, 山羊阴性血清常温封闭 2 h。兔抗血红蛋白抗体(本实验室制备)室温孵育 2 h 后, PBST 洗涤 3 次, FITC 标记的山羊抗兔 IgG (武汉谷歌生物科技有限公司) 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次后, DAPI 染色 5 min, 荧光显微镜观察拍照。

### 1.8 组织 RNA 提取

采集头肾组织并提取总 RNA, 提取按照 RNAiso Plus 试剂说明书进行, 提取的总 RNA 浓度及纯度用超微量分光光度计 (NanoDrop2000, 美国) 和琼脂糖凝胶电泳进行检测; 然后使用带有 gDNA wiper 的 HiScript<sup>®</sup> Q Select RT SuperMix for qPCR 试剂盒 (Vazyme, 中国) 合成 cDNA, -20 °C 保存备用。

### 1.9 荧光定量 PCR (qRT-PCR)

通过 qRT-PCR 方法检测头肾组织中相关基因的表达情况, qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 包括水 6  $\mu$ L, 上下游引物 0.5  $\mu$ L, SYBR 酶 10  $\mu$ L, cDNA 模板 3  $\mu$ L, 引物序列情况见表 1。qRT-PCR 反应程序参照 UltraSTBR Mixture (Vazyme, 中国) 试剂说明书, 反应在 qTOWER3 touch3 荧光定量 PCR 仪中进行, 其中免疫基因及  $\beta$ -actin 内参基因均做 3 次重复, 反应程序: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s 并采集荧光信号, 通过溶解曲线验证引物特异性, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的相对表达量。

### 1.10 数据分析

本实验所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示 ( $n=6$ ), 显著性差异分析采用 SPSS 26.0 软件的单因素方差分析 (One-Way ANOVA),  $P<0.05$  即为差异显著,  $P<0.01$  即为差异极显著。最终结果用 Graphpad prism 6 软件进行作图。

表 1 实验中用到的引物信息

Tab. 1 List of primers used in the study

引物名称 primers name	序列 sequences
<i>GcTNFa</i> -RT-F	GCTGCTGTCTGCTTCACGC
<i>GcTNFa</i> -RT-R	AGCCTGGTCCTGGTTCACCTT
<i>GcCD68</i> -RT-F	CCAGGGTGACTCTTACTC
<i>GcCD68</i> -RT-R	ATTGGTTGTTTTGATGT
<i>GcCD86</i> -RT-F	GCTAAATCACCCAGGAAGT
<i>GcCD86</i> -RT-R	GCGATAAGTGGCAATCAAAG
<i>GcMHC-II</i> -RT-F	TATTTGTGGGTTTACAGAGTT
<i>GcMHC-II</i> -RT-R	TGATTGGTTGAGGGTAGAAG
<i>GcIL-1<math>\beta</math></i> -RT-F	GTGCTGCGCCATTTCCAAGAGTA
<i>GcIL-1<math>\beta</math></i> -RT-R	GGTGTGAGAGTTTCAGTGACCT
<i>GcIL10</i> -RT-F	CCCTTTGAGTTTGCCACCA
<i>GcIL10</i> -RT-R	CAGCCATCATCCAATCCAC
<i>GcCSF</i> -RT-F	CTGAGGAGAAACGAGCAT
<i>GcCSF</i> -RT-R	TGACCCGTACAGGTGATG
<i>Gc<math>\beta</math>-actin</i> -RT-F	ACCCACACCGTGCCCATCTA
<i>Gc<math>\beta</math>-actin</i> -RT-R	CGGACAATTTCTCTTTCGGCTG
<i>GcIL-4</i> -RT-F	AATAGGGATCAACGAGAA
<i>GcIL-4</i> -RT-R	TGAATGGTTATGTAGGGT
<i>GcCCL4</i> -RT-F	TGACAGCATTTGCCATAC
<i>GcCCL4</i> -RT-R	GTCCAATACGCATTCTCT
<i>GcCCL20</i> -RT-F	CCAGACGCTGTTCAGTTC
<i>GcCCL20</i> -RT-R	TTCACCCCTCAAAGCCAAT
<i>GcTLR4</i> -RT-F	ATTTTCAGGGTGATGTAGTAAG
<i>GcTLR4</i> -RT-R	GTTTCAGGTTTGTAGTGGGTA
<i>GcIFN<math>\alpha</math></i> -RT-F	ACTGGTCAACCTGTTCTCTA
<i>GcIFN<math>\alpha</math></i> -RT-R	GCTGTGTTTCTCTCTCTCA

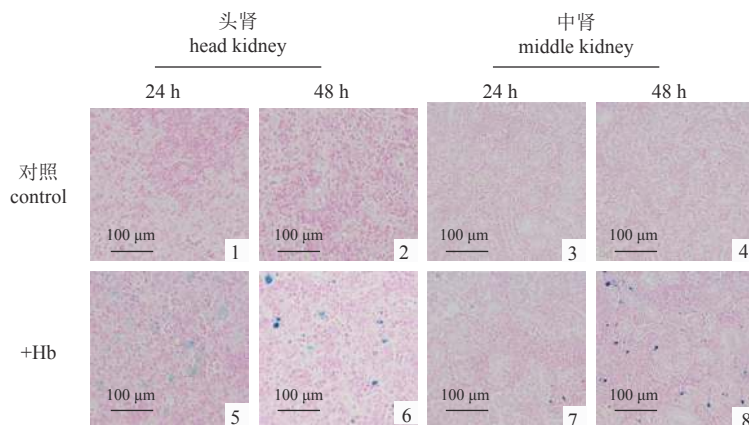
## 2 结果

### 2.1 血红蛋白在头肾和中肾组织中的沉积

在注射血红蛋白 24 和 48 h 后, 采集头肾和中肾组织进行普鲁士蓝染色, 以观察血红蛋白在组织中的沉积情况。染色结果显示, 在头肾组织的对照组中, 蓝色沉积物数量少, 而在注射血红蛋白 24 和 48 h 后, 头肾组织中明显可以看到蓝色沉积物。相似的结果发现在中肾组织中, 结果显示, 在注射血红蛋白 24 h 后, 可以看到部分蓝色沉积物, 而注射血红蛋白 48 h 后, 蓝色沉积物明显增多 (图版 I)。

### 2.2 血红蛋白促进抗氧化酶产生

为进一步探究血红蛋白对抗氧化酶的影响,



图版 I 普鲁士蓝染色检测头肾和中肾组织中血红蛋白沉积情况

Plate I Prussian blue staining for detection of Hb deposition in head-kidney and middle-kidney tissues

实验检测了注射血红蛋白 24 h 后的抗氧化酶的活性, 主要包括 SOD、GSH 和 CAT 以及补体活性。SOD 酶活性检测结果显示, 在注射血红蛋白 24 h 后, 血清中的 SOD 活性显著增加 (图 1-a)。GSH 和 CAT 检测结果发现, 血红蛋白的刺激也激活了

GSH 和 CAT 的酶活性 (图 1-b, c)。同时, 实验检测了血清中补体的活性情况, 结果显示, 在血红蛋白的刺激下, 补体 C3 的活性显著增加 (图 1-d)。上述结果表明, 血红蛋白的刺激可以激活鱼体抗氧化酶的活性, 同时也激活了补体 C3 的活性水平。

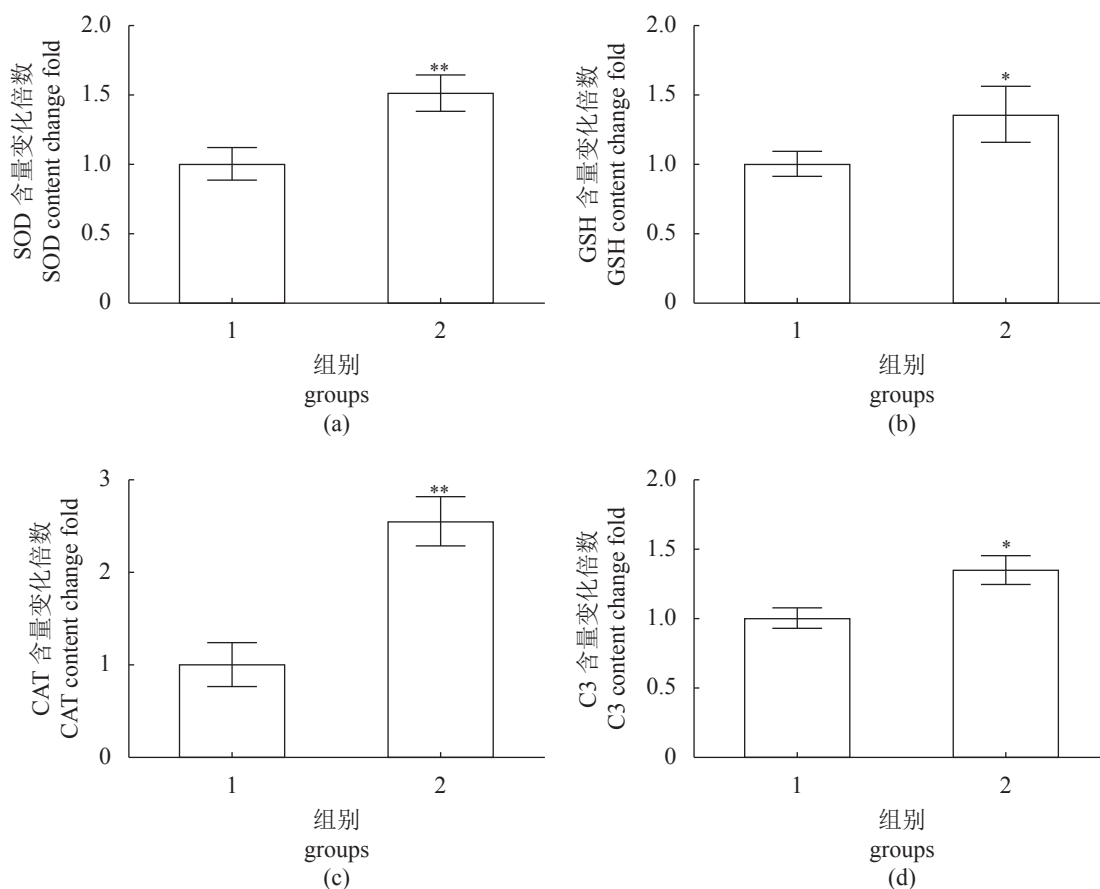


图 1 血红蛋白激活血清中的抗氧化酶系统

1. 对照组, 2. 血红蛋白处理组; \*\*, 组间差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 下同。

Fig. 1 Hb activates antioxidant enzyme system in serum

1. control group, 2. Hb treated group; \*\*, significant difference between groups ( $P < 0.01$ ), the same below.



### 2.3 血红蛋白激活头肾炎症性相关基因的表达

哺乳动物研究模型中发现, 血红蛋白可以激活宿主的免疫应答。为探究鱼类血红蛋白对机体的影响, 实验通过 qRT-PCR 的方法检测了注射血红蛋白后, 头肾组织中免疫相关基因的表达情况。结果发现, 血红蛋白的刺激显著激活了 *IL-1 $\beta$*  的转录水平, 其表达量在刺激后的 12 h 达到最高, 随后逐渐下降 (图 2-a)。 *IFN- $\alpha$*  转录水平检测中发现, 血红蛋白的刺激显著上调了其表达水平, 其表达水平在血红蛋白刺激后的 24 h 达到最高值, 随后逐渐下降 (图 2-b)。 *IL-10* 在血红蛋白刺激下的表达水平与 *IFN- $\alpha$*  的表达趋势一致 (图 2-c)。上述结果表明, 血红蛋白的刺激, 上调了草鱼头肾组织中的炎症因子的表达水平。

### 2.4 巨噬细胞对血红蛋白的吞噬作用

过量血红蛋白进入组织, 需要组织中巨噬细胞对血红蛋白进行迅速清除, 以减少其因氧化而造成的氧化损伤作用。本实验检测了头肾巨噬细胞对血红蛋白的吞噬作用。普鲁士蓝染色用于检测巨噬细胞中铁离子的沉积情况, 结果显示, 巨噬细胞对血红蛋白展示了强大的吞噬能力 (图版 II -1, 2)。为进一步验证巨噬细胞对血红蛋白的吞噬作用, 本研究进行了间接免疫荧光实验, 荧光显微镜观察结果显示, 巨噬细胞内观察到大量血红蛋白存在, 表明巨噬细胞确实具有吞噬血红蛋白的能力 (图版 II -3~10)。

### 2.5 血红蛋白促进巨噬细胞标记相关基因表达

为进一步探究血红蛋白对巨噬细胞标记相关基因的表达情况, 本研究通过 qRT-PCR 检测了相关基因的转录水平变化情况, 本研究将 2 mg/mL 的血红蛋白刺激巨噬细胞 12 h, 同时设置 LPS (100 ng/mL) 作为阳性对照组。检测结果显示, 血红蛋白刺激 12 h 后, 巨噬细胞中 CD68 和 CD86 的表达量显著上调 (图 3-a, b)。在检测集落刺激因子 (CSF) 中发现, 血红蛋白刺激巨噬细胞 12 h 后, 其表达量也显著上调 (图 3-c)。同时, 本研究检测 MHC- II 的表达情况, 结果显示, 血红蛋白的刺激上调了巨噬细胞中 MHC- II 的转录水平, 其上调水平甚至高于 LPS 处理组 (图 3-d)。

### 2.6 血红蛋白促进巨噬细胞因子的表达水平

由于血红蛋白氧化释放血红素进入组织, 部分研究表明, 血红素可以通过 *TLR4* 等多种途径

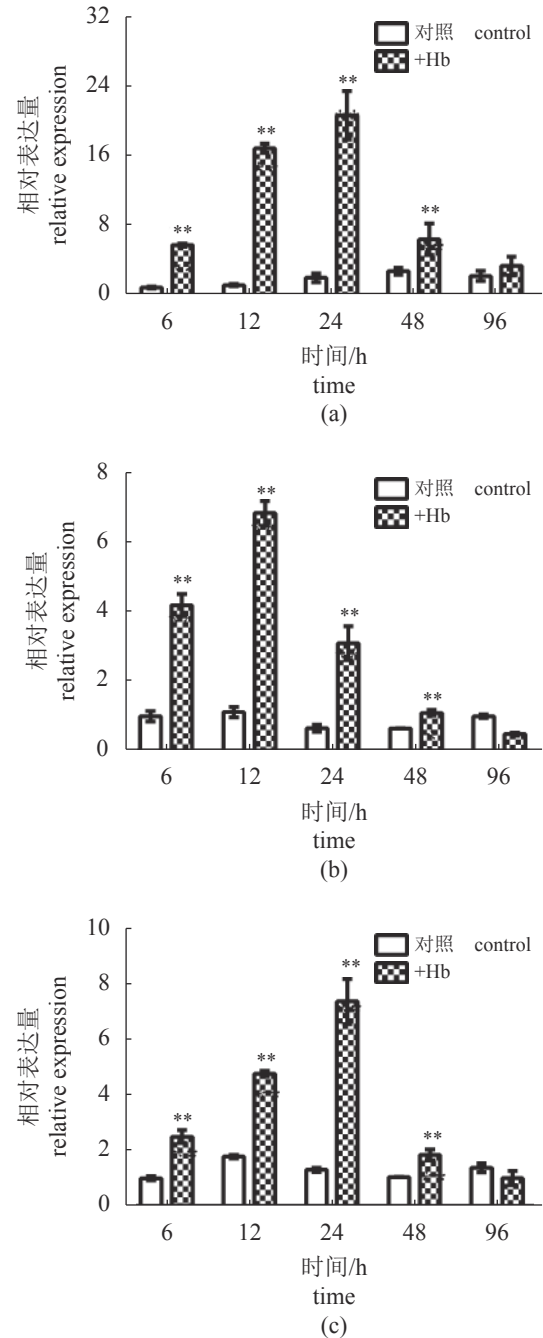
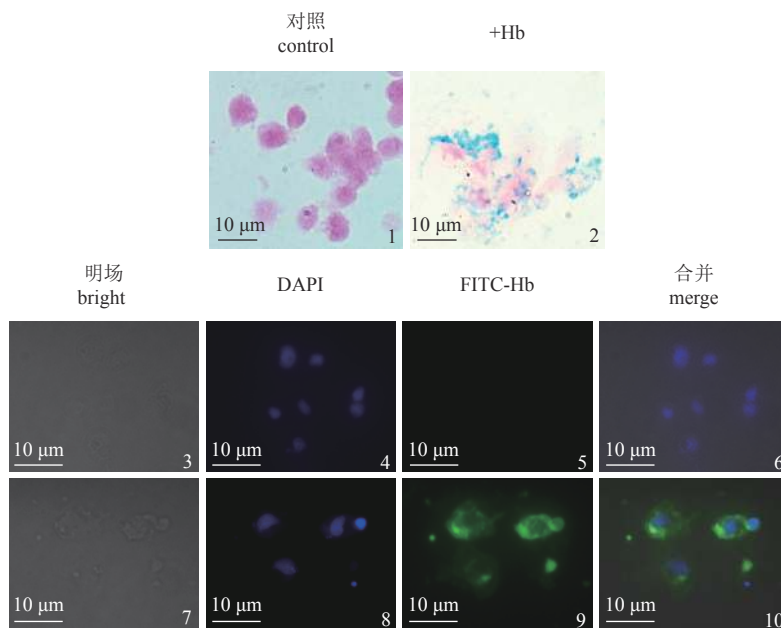


图 2 注射血红蛋白后头肾组织中炎症相关基因的表达情况

Fig. 2 Expression of inflammation-related genes in head-kidney tissue after Hb injection

(a) *IL-1 $\beta$* ; (b) *IFN- $\alpha$* ; (c) *IL-10*.

激活下游炎症因子的表达水平。本研究中, 为进一步验证血红蛋白的刺激是否可以激活巨噬细胞释放炎症因子, 实验通过 qRT-PCR 方法检测常见细胞因子的表达水平。首先检测了炎症因子 *TNF- $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$* 、*IL-4* 的表达情况, 结果显示, 血红蛋白的刺激显著上调了上述 3 种炎症因子的表达水平



图版 II 头肾巨噬细胞对血红蛋白的吞噬活性检测

1~2. 普鲁士蓝染色检测血红蛋白在巨噬细胞中的沉积情况, 3~10. 间接免疫荧光检测巨噬细胞对血红蛋白的吞噬作用。

Plate II Phagocytic activity of head-kidney macrophages to Hb

1-2. Prussian blue staining was used to detect the deposition of Hb in macrophages, 3-10. indirect immunofluorescence was used to detect the phagocytosis of macrophages on Hb.

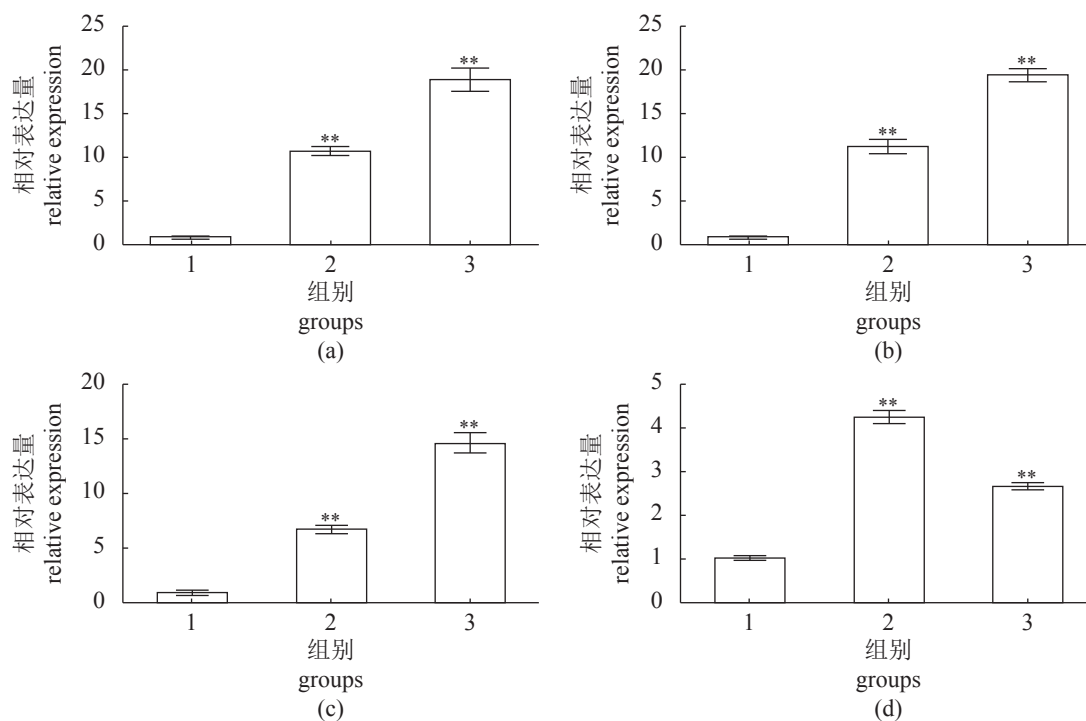


图 3 血红蛋白刺激对头肾巨噬细胞成熟标记相关基因的影响情况

1. 对照组, 2. Hb 处理组, 3. LPS 处理组, 图 4 同。

Fig. 3 Expression of maturation marker related genes in head-kidney macrophages after stimulated by Hb

1. control cells, 2. Hb stimulated cells; 3. LPS stimulated cells, the same as Fig. 4. (a) CD68, (b) CD86, (c) CSF, (d) MHC-II.

(图 4-a, b, d)。IFN- $\alpha$  检测结果显示, 血红蛋白的刺激下, 其表达水平显著被激活(图 4-c)。本实验同时检测了 2 种趋化因子的表达情况, 结果显示, 在血红蛋白刺激下, 巨噬细胞中 CCL20 和 CCL4 的表达水平显著上调(图 4-e, f)。同时, 本研究也检测了 TLR4 的表达情况, 检测结果显示, TLR4 的表达水平在血红蛋白的刺激下也显著被激活(图 4-g)。上述结果均表明, 血红蛋白的刺激可以激活巨噬细胞中多种细胞因子的表达水平。

### 3 讨论

近年来, 随着养殖产业的迅速发展, 养殖面积和密度不断扩大, 养殖水域环境的不断恶化, 加之多种病害频发, 给水产养殖产业的健康发展造成严重威胁。多种出血性病原的感染导致鱼体出血, 大量血红蛋白被释放至血浆或组织中。本

团队前期研究发现, 草鱼血红蛋白暴露在空气中快速发生自氧化, 并产生大量 ROS, 并对多种细菌表现出广泛的杀伤作用<sup>[9]</sup>。在哺乳动物研究模型中表明, 释放的血红蛋白进入组织中, 往往对组织细胞造成氧化损伤, 同时通过多种信号通路诱导下游炎症因子的产生, 并对机体造成二次损伤<sup>[15-17]</sup>。在鱼类研究模型中, 鱼类血红蛋白能够通过 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 等途径促进草鱼肾细胞中 ROS 的产生和炎症产生<sup>[18]</sup>。本实验将血红蛋白注射至鱼体, 通过普鲁士蓝染色检测了头肾和中肾组织中铁离子的沉积情况, 检测结果显示, 注射血红蛋白后, 头肾和中肾组织中检测到明显的铁离子沉积, 表明头肾和中肾组织参与了血红蛋白的清除过程。同时, 实验检测了血清中抗氧化酶的活性, 结果显示, 注射血红蛋白显著上调了 SOD、GSH 及 CAT 的酶活性水平, 表明血红蛋白

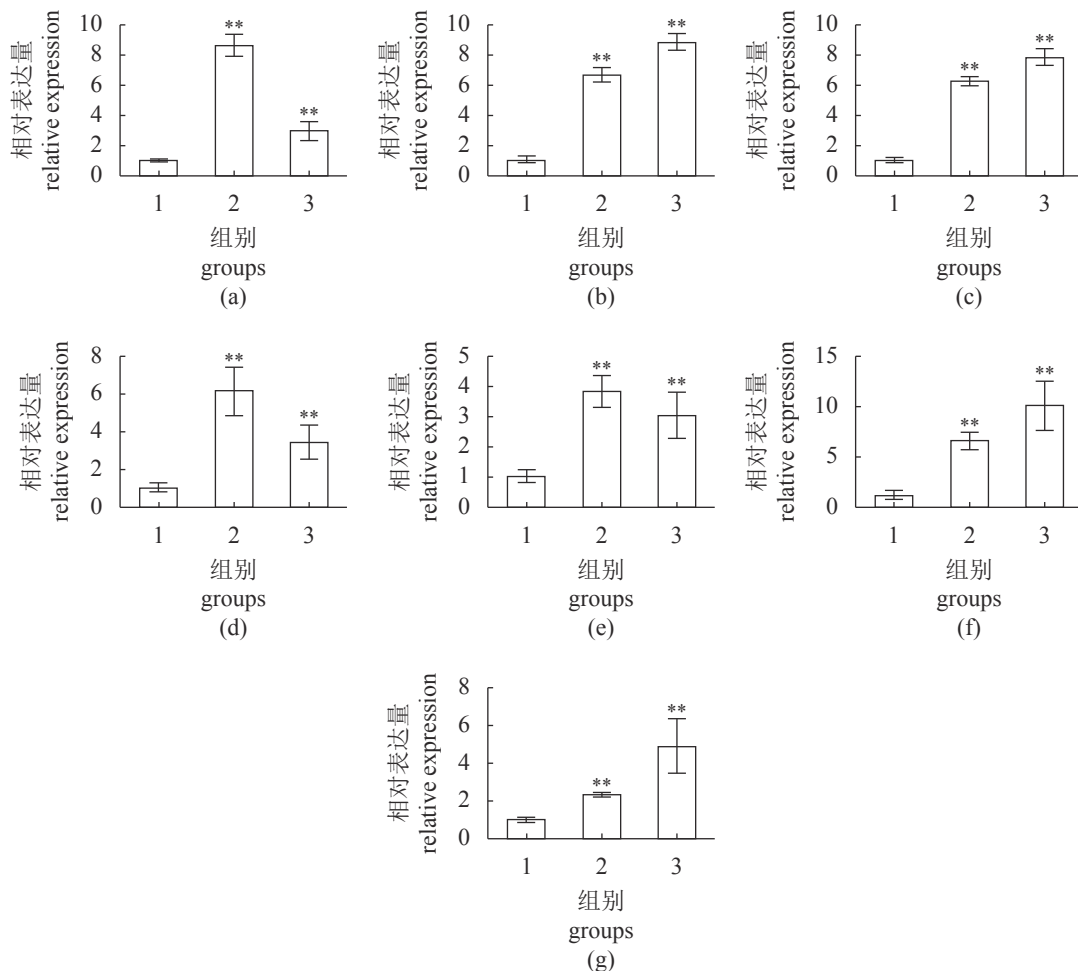


图 4 血红蛋白对头肾巨噬细胞细胞因子相关基因表达情况的影响

Fig. 4 Expression of cytokine-related genes in head-kidney macrophages after stimulated by Hb for 12 h

(a) TNF- $\alpha$ , (b) IL-1 $\beta$ , (c) IFN- $\alpha$ , (d) IL-4, (e) CCL20, (f) CCL4, (g) TLR4.

的刺激激活了鱼体抗氧化系统。本实验检测了注射血红蛋白后, 鱼体血清中补体 C3 活性情况, 检测结果表明, 血红蛋白的刺激上调了鱼体补体活性, 与以往文献报道相一致<sup>[19-20]</sup>。

巨噬细胞在参与血红蛋白清除过程中发挥重要作用, 在前期研究中, 人们认为巨噬细胞只能清除 Hb-Hp 和 Hb-Hpx 复合物, 即巨噬细胞对血红蛋白的清除依赖于 Hp 或者 Hpx。进一步研究发现, 巨噬细胞可以直接参与血红蛋白或者血红素的清除作用, 并不依赖于 Hp 或 Hpx, 表明机体有更加高效的清除方式<sup>[4, 21]</sup>。为进一步探究头肾组织中的巨噬细胞是否参与了血红蛋白的清除过程, 实验分离纯化了草鱼头肾巨噬细胞, 并将头肾巨噬细胞与血红蛋白进行孵育, 通过普鲁士蓝和间接免疫荧光法检测了巨噬细胞对血红蛋白的吞噬作用。检测结果显示, 草鱼头肾巨噬细胞对血红蛋白表现出了吞噬作用。研究表明, 鱼类头肾巨噬细胞对血红蛋白具有清除作用, 并且可以不依赖于 Hp 或 Hpx。

氧化后的血红蛋白容易释放血红素, 血红素具有高氧化活性, 多项研究表明, 血红素可以通过 TLR4 依赖的 NF- $\kappa$ B 途径、MAPK、NLRP-3 以及 PI3K 等多种途径激活下游多种炎症因子的表达<sup>[16-17, 22-24]</sup>。为探究鱼类血红蛋白对巨噬细胞的影响, 本研究通过 qRT-PCR 检测了巨噬细胞相关基因的表达情况, 检测结果显示, 血红蛋白的刺激显著上调了头肾巨噬细胞中 CD68、CD68、CSF 以及 MHC-II 的转录水平, 检测结果一定程度说明血红蛋白可能存在促进巨噬细胞增殖的功能, 对于进一步促进机体快速清除过量的血红蛋白大有裨益。本研究结果与血蓝蛋白促进巨噬细胞成熟标记物相关基因的表达结果有相似之处<sup>[25]</sup>。为进一步探究鱼类血红蛋白对巨噬细胞细胞因子的调控作用, 本研究分别通过体内、体外实验结合进行了验证。体内检测结果显示, 血红蛋白的刺激使头肾组织中的 IL-1 $\beta$ 、IFN- $\alpha$  和 IL-10 基因的表达被显著激活。体外检测结果显示, 受血红蛋白的刺激, 巨噬细胞中炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4)、趋化因子 (CCL20 和 CCL4)、IFN- $\alpha$  及 TLR4 等基因的表达水平显著上调。上述结果表明, 鱼类血红蛋白可以促进组织中炎症因子的表达, 因此, 在出血性病原感染过程中, 快速清除血红蛋白或者减少由游离血红蛋白介导的炎症的滞留时间对于鱼体的健康养殖也非常重要。但是, 目前

有关血红蛋白调控炎症反应的具体机制仍然需要进一步验证。

综上所述, 本研究以草鱼血红蛋白和头肾巨噬细胞为对象, 初步探究了血红蛋白与头肾巨噬细胞之间的相互作用关系。研究结果表明, 鱼类头肾巨噬细胞对血红蛋白具有吞噬作用, 同时具有氧化活性的血红蛋白可以激活巨噬细胞中炎症因子的表达。本研究初步揭示了血红蛋白对机体的损伤作用, 不仅丰富了鱼类血液免疫的基础理论, 同时为草鱼的健康养殖提供一定的参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Xu X Y, Shen Y B, Fu J J, *et al.* Characterization of MMP-9 gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): an *Aeromonas hydrophila*-inducible factor in grass carp immune system[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 801-807.
- [2] Rao Y L, Su J G. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp[J]. *Journal of Immunology Research*, 2015: 670437.
- [3] Jeney V, Eaton J W, Balla G, *et al.* Natural history of the bruise: formation, elimination, and biological effects of oxidized hemoglobin[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 2013: 703571.
- [4] Subramanian K, Du R J, Tan N S, *et al.* CD163 and IgG codefend against cytotoxic hemoglobin via autocrine and paracrine mechanisms[J]. *The Journal of Immunology*, 2013, 190(10): 5267-5278.
- [5] Sadrzadeh S M, Anderson D K, Panter S S, *et al.* Hemoglobin potentiates central nervous system damage[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1987, 79(2): 662-664.
- [6] Skaar E P, Humayun M, Bae T, *et al.* Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections[J]. *Science*, 2004, 305(5690): 1626-1628.
- [7] Du R J, Ho B, Ding J L. Rapid reprogramming of haemoglobin structure-function exposes multiple dual-antimicrobial potencies[J]. *The EMBO Journal*, 2010, 29(3): 632-642.
- [8] Jiang N X, Tan N S, Ho B, *et al.* Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial



- strategy[J]. *Nature Immunology*, 2007, 8(10): 1114-1122.
- [9] Qin Z D, Vijayaraman S B, Lin H Z, *et al.* Antibacterial activity of erythrocyte from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with phagocytosis and reactive oxygen species generation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 331-340.
- [10] Van Avondt K, Nur E, Zeerleder S. Mechanisms of haemolysis-induced kidney injury[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2019, 15(11): 671-692.
- [11] Dutra F F, Bozza M T. Heme on innate immunity and inflammation[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2014, 5: 115.
- [12] Lee S K, Ding J L. A perspective on the role of extracellular hemoglobin on the innate immune system[J]. *DNA and Cell Biology*, 2013, 32(2): 36-40.
- [13] Schaer D J, Buehler P W, Alayash A I, *et al.* Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins[J]. *Blood*, 2013, 121(8): 1276-1284.
- [14] Duvigneau J C, Esterbauer H, Kozlov A V. Role of heme oxygenase as a modulator of heme-mediated pathways[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(10): 475.
- [15] Pradhan P, Vijayan V, Gueler F, *et al.* Interplay of heme with macrophages in homeostasis and inflammation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 740.
- [16] Figueiredo R T, Fernandez P L, Mourao-Sa D S, *et al.* Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(28): 20221-20229.
- [17] Shaver C M, Landstreet S R, Pugazenthi S, *et al.* The NLRP3 inflammasome in macrophages is stimulated by cell-free hemoglobin[J]. *Physiological Reports*, 2020, 8(21): e14589.
- [18] Lu Z J, Tang M Z, Zhang M L, *et al.* Hemeprotein amplifies the innate immune receptors of *Ctenopharyngodon idellus* kidney cells through NF- $\kappa$ B- and MAPK-dependent reactive oxygen species generation[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2022, 126: 104207.
- [19] Frimat M, Tabarin F, Dimitrov J D, *et al.* Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome[J]. *Blood*, 2013, 122(2): 282-292.
- [20] Merle N S, Grunenwald A, Rajaratnam H, *et al.* Intravascular hemolysis activates complement via cell-free heme and heme-loaded microvesicles[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(12): e96910.
- [21] Schaer D J, Schaer C A, Buehler P W, *et al.* CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin[J]. *Blood*, 2006, 107(1): 373-380.
- [22] Fortes G B, Alves L S, de Oliveira R, *et al.* Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production[J]. *Blood*, 2012, 119(10): 2368-2375.
- [23] Belcher J D, Chen C S, Nguyen J, *et al.* Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease[J]. *Blood*, 2014, 123(3): 377-390.
- [24] Nyakundi B B, Tóth A, Balogh E, *et al.* Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 $\beta$  production upon intravascular hemolysis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2019, 1865(2): 464-475.
- [25] Zhong T Y, Arancibia S, Born R, *et al.* Hemocyanins stimulate innate immunity by inducing different temporal patterns of proinflammatory cytokine expression in macrophages[J]. *The Journal of Immunology*, 2016, 196(11): 4650-4662.

## Hemoglobin stimulate inflammatory cytokine expression in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) head-kidney macrophages

QIN Zhendong, ZHAN Fanbin, LI Yanan, SHI Fei, YANG Minxuan,  
LU Zhijie, LI Jun\*, LIN Li\*

(Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center,  
Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Sciences and Technology,  
Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** In general, disease caused by the hemorrhagic pathogen infections, results in hemolysis, in series the hemoglobin (Hb) is discharged into the tissues. Consecutively, oxidation of Hb while exposed to air provokes serious high oxidative damage levels in the body and inducing a large amount of inflammation to release additional proinflammatory mediators. Promptly, it is critical to clear the highly cytotoxic Hb. Macrophages play a key role not only under stress conditions, but also in sustaining homeostasis by promoting erythropoiesis and hemoglobin (Hb) clearance. However, the complete mechanism of the oxidized Hb in teleost fish and the effects of macrophages on it not yet clear. In this study, head-kidney macrophages and Hb of the *C. idella* were taken as the research model to examine the interaction between Hb and macrophages. Stimulation of the Hb during *in vivo* studies led to the visible deposition of Hb in the head and middle of the kidney and elevated the levels of antioxidant-related enzymes in serum, and further promoted the expression levels of inflammatory cytokine, such as *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , and *IL-10* in head kidney. Thereafter, the indirect immunofluorescence and Prussian blue staining analyses indicated that the macrophages of the head kidney exhibited intense phagocytic activity to Hb. Analysis of gene expression level by quantitative real-time PCR, macrophage markers, including *CD68*, *CD86*, *CSF*, and *MHC-II* genes were significantly elevated through the stimulation of Hb. Likewise, the expression levels of inflammatory cytokines (*TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , and *IL-4*), chemokines (*CCL20* and *CCL4*), *IFN- $\alpha$*  and *TLR4* genes were significantly up-regulated in the head kidney macrophages after 12 h of Hb stimulation. In summary, these results indicate that *C. idella* head kidney macrophages possess the phagocytic ability towards Hb, and in turn, Hb also activates the expression levels of macrophage-related markers and associated cytokines. Taken together, our findings explicitly improve the understanding of Hb macrophage interactions of *C. idella* and provided a new reference for healthy fish farming.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; hemoglobin; macrophages; cytokine

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

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

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31902409, 31872606); Special Funds for Economic Development of Marine Economy of Guangdong Province (2019A1)