

文章编号: 1674-7054(2020)03-0274-07

不同病原性相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞免疫功能的影响

刘肖岑¹, 周永灿^{1,2}, 曹贞洁¹, 孙云¹

(1. 海南大学 海南省南海海洋资源利用国家重点实验室/海南省热带水生生物技术重点实验室 海口 570228;

2. 海南大学 海洋学院 水产养殖系 海口 570228)

摘要: 为研究不同病原性相关分子模式(PAMP)对大黄鱼头肾巨噬细胞免疫功能的影响,本研究分别将脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、肽聚糖(peptidoglycan, PGN)、脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)、胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)与提取的大黄鱼头肾巨噬细胞进行孵育,测定大黄鱼头肾巨噬细胞的呼吸爆发活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、溶菌酶(LZM)活性和免疫相关细胞炎症因子(TNF α , IL1 β , IL8, IL10, CXCL9, MYD88, TLR3 和 TLR8)的表达情况。结果显示:(1)LPS, PGN, LTA, MDP均能显著提高大黄鱼头肾巨噬细胞的呼吸爆发活性和LZM活性,同时显著降低SOD和CAT两种抗氧化酶的活性;(2)在LPS和LTA刺激下,8种免疫相关细胞炎症因子TNF α , IL1 β , IL8, IL10, CXCL9, MYD88, TLR3和TLR8均呈显著性上调趋势;在PGN和MDP刺激下,除IL8, CXCL9外,其余6种免疫相关细胞炎症因子均显著性上调。结果表明,4种病原相关分子模式LPS, PGN, LTA, MDP均能显著影响大黄鱼头肾巨噬细胞的非特异性免疫应答能力和免疫相关细胞炎症因子的表达。

关键词: 大黄鱼;巨噬细胞;病原相关分子模式;非特异性免疫;细胞因子

中图分类号: Q 78; S 917.4

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.03.003

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)隶属于硬骨鱼纲,鲈形目,石首鱼科,黄鱼属,是我国东南沿海养殖的重要海洋经济鱼类之一^[1]。随着大黄鱼养殖规模的不断扩大,大黄鱼病害问题尤其是细菌性疾病已成为制约大黄鱼养殖业健康稳定发展的重要因素之一。据报道,大黄鱼细菌性病原包括多种革兰氏阳性细菌及革兰氏阴性细菌,常见的有鳃弧菌^[2]、副溶血弧菌^[3]、杀香鱼假单胞菌^[4]、丝状诺卡氏菌^[5]等。鱼类属于低等脊椎动物,其特异性免疫系统并不完善,其非特异性免疫在疾病防控系统中尤显重要。巨噬细胞是鱼类非特异性免疫系统中的固有免疫细胞,可直接清除、杀伤病原体,同时能够分泌细胞因子,介导并促进炎症反应,启动特异性免疫应答,在免疫调节中发挥重要的作用。提高鱼体免疫能力是解决病原感染的有效措施之一,随着鱼类细胞培养技术的发展,通过体外培养鱼类巨噬细胞来进行相关免疫功能及机制的探索,已成为研究的热点问题。病原相关分子模式(PAMP)是病原微生物表面高度保守的分子结构,如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、肽聚糖(peptidoglycan, PGN)、脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)、胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)等,也是非特异性免疫模式中模式识别受体(PRR)的相应配体,能够激活非特异性免疫信号通路,促进多种炎性介质释放^[6]。脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁外壁的组成成分,是免疫学研究中常用的免疫刺激物,主要作用于宿主细胞膜表面的TLR4^[7],同时也能逐级上调TNF- α ,

收稿日期: 2020-03-12

修回日期: 2020-04-04

基金项目: 海南省自然科学基金(2019RC078);海南大学科研平台建设项目(ZY2019HN09);国家海洋局海洋经济创新示范城市项目(HHCL201813, HHCL201802)

第一作者: 刘肖岑(1994-),女,海南大学海洋学院2017级硕士研究生. E-mail: 2079619511@qq.com

通信作者: 曹贞洁(1991-),女,硕士生导师. 研究方向:水生生物病害防治及免疫. E-mail: 1057319886@qq.com; 孙云(1985-),女,博士生导师. 研究方向:水生生物病害防治及免疫. E-mail: syshui207@126.com

IL-6, IL-8 等关键性炎症细胞因子的表达^[2]。肽聚糖(PGN)存在于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的细胞壁中,是 TLR2 的配体,作用于细胞的 Toll 样受体通路中^[7]。PGN 的 G-M 双糖单位间的 β -1,4 糖苷键能被溶菌酶水解,使细胞壁出现孔洞,甚至解体,从而杀死细菌^[8]。LTA 是革兰氏阳性菌细胞壁特殊组份,其抗原性很强,是革兰氏阳性菌的重要表面抗原;LTA 具有免疫调节作用能激活巨噬细胞,增强其吞噬以及细胞毒功能^[9]。MDP 是分枝杆菌细胞骨架中具有免疫佐剂活性的最小结构单位,可以代替弗氏完全佐剂中的整体分枝杆菌,能加强细胞免疫和体液免疫,激活巨噬细胞和 T 辅助细胞^[10]。在本研究中,笔者利用脂多糖(LPS)、肽聚糖(PGN)、脂磷壁酸(LTA)、胞壁酰二肽(MDP)4 种能够作用于细胞表面引发免疫效应的病原相关分子模式来刺激离体大黄鱼头肾巨噬细胞,建立免疫刺激模型,并探讨这 4 种病原相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞相关非特异性免疫功能及免疫相关细胞炎症因子表达的影响。本研究结果将有助于了解病原相关分子模式对大黄鱼非特异性免疫应答的影响及其调控机制,对大黄鱼抵御病害具有重要的理论意义。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼 大黄鱼购买自福建宁德市养殖场,活体运输至海南大学海洋学院,暂养 7 d 后开始实验。暂养结束后,随机选取健康有活力的大黄鱼 [平均体质量(89.1 ± 5.7) g] 进行头肾巨噬细胞的提取,实验期间,水温保持在(23 ± 1) °C。

1.2 实验药品 percoll 购自美国 GE Health 公司;DMEM 和双抗(青霉素/链霉素)均购自美国 GIBCO 公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),过氧化氢酶(catalase, CAT),溶菌酶(lysozyme, LZM)和 BCA 蛋白检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;细菌脂多糖(LPS, *Escherichia coli* 055:B5),肽聚糖(PGN, *Staphylococcus aureus*),脂磷壁酸(LTA, *S. aureus*)和胞壁酰二肽(MDP)均来自美国 Sigma 公司;佛波醇乙酯(PMA)、氯化硝基四氮唑兰(NBT)和二甲基亚砷(DMSO)均购自中国 Solarbio 公司;RNA 提取试剂盒购自南京诺唯赞生物有限公司;cDNA 第一链合成试剂盒和 qPCR 试剂盒均购自美国 Promega 公司。

1.3 巨噬细胞的提取 操作方法参考文献 [11] 的方法。选取 1 条健康大黄鱼,在无菌条件下解剖获得大黄鱼头肾,轻轻研磨使头肾组织通过 300 目筛孔,得到细胞悬液。将细胞悬液置于 26 °C 静置沉降 2~3 h,小心取上清,用 percoll 水平梯度(34%~51%)离心技术分离获得头肾巨噬细胞。用吉姆萨染色法验证提取细胞为巨噬细胞;对提取的细胞进行台盼蓝染色并计数,计算活细胞率。

$$\text{活细胞率}(\%) = \frac{\text{活细胞总数}}{\text{活细胞总数} + \text{死细胞总数}} \times 100$$

1.4 病原相关分子模式对大黄鱼巨噬细胞各项非特异性免疫指标的影响

1.4.1 呼吸爆发活性测定 采用氯化硝基四氮唑兰(NBT)法测定头肾巨噬细胞产生的呼吸爆发活性。将新鲜提取的巨噬细胞接种至 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL (细胞密度为 2×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$),然后分别加入 2.5 μL 浓度为 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 LPS, PGN, LTA, MDP 溶液,每组 3 个平行,对照组加入等量的磷酸盐缓冲液(PBS),共同孵育 2 h 后去除上清液,然后在每孔中加入 100 μL 0.2%NBT,室温孵育 1 h。吸去上清液,加入 100 μL 100% 甲醇,固定 3 min,然后去上清,加入 100 μL 70% 甲醇。去上清液,开口室温凉干,接着加入 120 μL 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH 溶液,然后再加入 140 μL 二甲基亚砷(DMSO),用排枪吹打混匀,以使甲蓝晶体完全溶解,以 KOH/DMSO 为空白测定 630 nm 处吸光度。本测定进行 3 次独立重复实验。

1.4.2 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和溶菌酶(LZM)的活性测定 将新鲜提取的巨噬细胞接种至 6 孔细胞培养板中,每孔 1 mL(细胞密度为 2×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$),然后分别加入 2.5 μL 浓度为 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 LPS, PGN, LTA, MDP 溶液,每组 3 个平行,对照组加入等量的 PBS,共同孵育 2 h 检测巨噬细胞 SOD, CAT 及 LZM 活性。SOD, CAT 和 LZM 活性检测方法参照相应试剂盒说明书进行检测,蛋白浓度采用 BCA 法进行测定,每个测定进行 3 次独立重复实验。

1.5 病原相关分子模式刺激大黄鱼巨噬细胞后免疫基因的表达 参考 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 然后用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 检测提取 RNA 的完整性及浓度, 并分装保存至 -80°C 超低温冰箱。以提取的 RNA 为模板合成 cDNA 第一链, 操作方法参考 cDNA 第一链合成试剂盒说明书。本研究用免疫基因的序列信息由 NCBI 数据库查询获得, 然后用 Primer5 软件设计荧光定量引物 (表 1), 内参基因为 β -actin。使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR 分析。荧光定量 PCR 总反应体系为 $10\ \mu\text{L}$, 包括 $5\ \mu\text{L}$ Eastep[®] qPCR Master Mix (2 \times), $1\ \mu\text{L}$ cDNA 模板, 上下游引物各 $0.5\ \mu\text{L}$, $3.6\ \mu\text{L}$ RNase-free water。反应条件: 95°C 2 min, (95°C 15 s, 60°C 1 min) \times 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量, 将对照组表达量设为 1。

表 1 荧光定量 PCR 的引物序列

Tab. 1 Primer sequences for real-time PCR

引物名称 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
<i>IL1β</i> -F/R	CAATCTGGCAAGGATCAGC / GGACGGACACAAGGGTACTAA
<i>IL8</i> -F/R	ACAACAAAAGACGCTGAACGGAC / ATGCAAACATGACATGTGAAGTTCT
<i>IL10</i> -F/R	CTGGTTCTCTTGTCTTTTTTC / CATAGTTTAGTCTGAGCGTCT
<i>TNFα</i> -F/R	ATCAGCCTACAGCGAAACAAATC / AGCAGGCATCCTATGGTGAAATA
<i>CXCL9</i> -F/R	GGATGGGCAAACAGCTAACTCG / CTCTGGTTTCGGCTCTTCTGG
<i>MYD88</i> -F/R	CAGTATTTGGGGCAGCGTGTA / AAAGCAGGTGTCAGCAGTCAGTAA
<i>TLR3</i> -F/R	TTTTGACATTAACCAGTGTGTAAT / TGCGGGTCTGTGGTGTCTGTA
<i>TLR8</i> -F/R	ATGACAGCGAGGCGTTGTTGAT / GACATAGGAGGCGTCCCAGTAAA
β -actin-F/R	GACCTGACAGACTACCTCATG / AGTTGAAGGTGGTCTCGTGA

1.6 数据分析 实验数据用 SPSS (SPSS Statistics 22) 进行单因素方差分析 (T-test), 实验数据均用平均值 \pm 标准差 ($X \pm SD$) 表示。其中 $P < 0.05$ 表示有显著差异, $P < 0.01$ 表示有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 病原相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性的影响 大黄鱼头肾巨噬细胞在病原相关分子模式 LPS, PGN, LTA, MDP 刺激下呼吸爆发活性的变化结果 (图 1) 表明, 与对照组相比, LPS 和 PGN 均显著提高了大黄鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性 ($P < 0.05$); 而在 LTA 和 MDP 刺激下, 大黄鱼的头肾巨噬细胞呼吸爆发活性极显著升高 ($P < 0.01$), 其中, MDP 处理组的呼吸爆发活性最高。

2.2 病原相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞 SOD 活性的影响 大黄鱼头肾巨噬细胞的 SOD 活性在 LPS, PGN, LTA, MDP 刺激下的变化情况 (图 2)

结果显示, 与对照组相比, LPS、PGN 和 LTA 处理组的头肾巨噬细胞的 SOD 活性均显著降低 ($P < 0.05$); MDP 处理组极显著降低了大黄鱼头肾巨噬细胞的 SOD 活性 ($P < 0.01$)。

2.3 病原相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞 CAT 活性的影响 大黄鱼头肾巨噬细胞的 CAT 活性在 LPS, PGN, LTA, MDP 刺激下的变化结果 (图 3) 显示, LPS, LTA, MDP 处理组均显著降低了大黄鱼

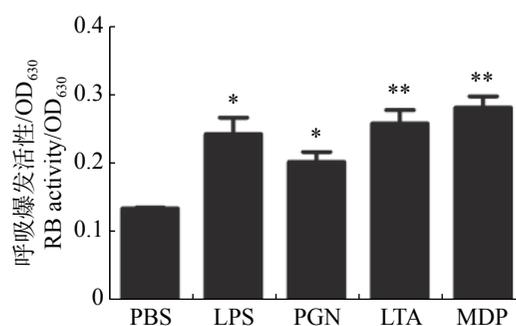


图 1 病原相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性的影响

Fig. 1 The effects of PAMPs on the respiratory burst activity of the head kidney macrophages (HKMs) from *L. crocea*

头肾巨噬细胞的 CAT 活性($P < 0.05$); PGN 处理组极显著降低了大黄鱼头肾巨噬细胞的 CAT 活性($P < 0.01$)。

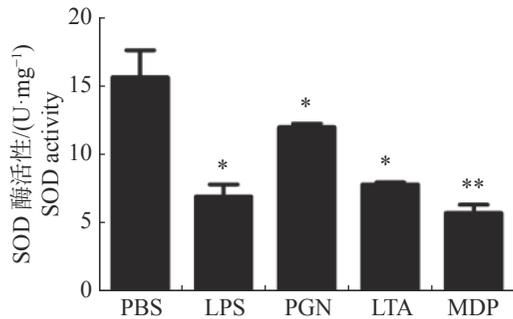


图2 病原相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞 SOD 活性的影响

Fig. 2 The effects of PAMPs on the SOD activity of HKMs from *L. crocea*

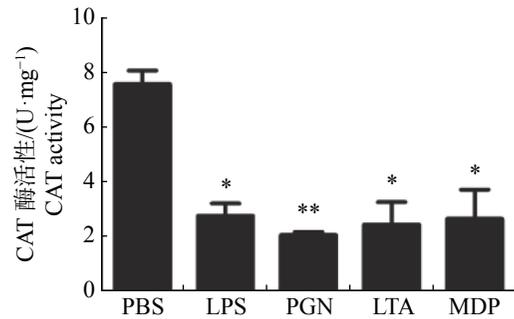


图3 病原相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞 CAT 活性的影响

Fig. 3 The effects of PAMPs on the CAT activity of HKMs from *L. crocea*

2.4 病原相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞溶菌酶 (LZM) 活性的影响 大黄鱼头肾巨噬细胞的 LZM 活性在病原相关分子模式 LPS, PGN, LTA, MDP 刺激下的变化结果(图4)显示, LPS 和 MDP 处理组头肾巨噬细胞的 LZM 活性显著高于对照组($P < 0.05$); PGN 和 LTA 处理组头肾巨噬细胞的 LZM 活性极显著高于对照组($P < 0.01$), 其中, LTA 处理组大黄鱼头肾巨噬细胞的 LZM 活性最高(图4)。

2.5 病原相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞中部分免疫相关细胞炎症因子表达的影响 与对照组相比(图5), LPS 和 LTA 处理组头肾巨噬细胞的 8 种免疫相关细胞炎症因子 TNF α , IL1 β , IL8, IL10, CXCL9, MYD88, TLR3 和 TLR8 的表达水平均呈显著性上调趋势($P < 0.05$); PGN 和 MDP 处理组的 TNF α , IL1 β , IL10, MYD88, TLR3 和 TLR8 基因表达水平均显著性高于对照组($P < 0.05$), 而 IL8 和 CXCL9 的表达水平虽呈升高趋势, 但与对照组差异不显著($P > 0.05$)。

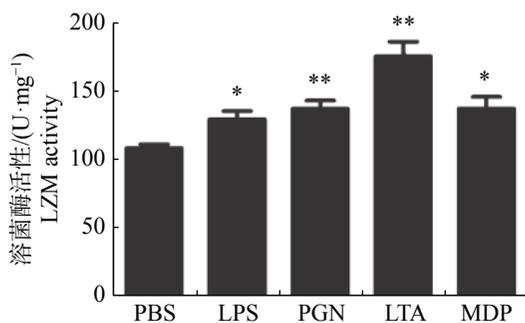


图4 病原相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞 LZM 活性的影响

Fig. 4 The effects of PAMPs on the LZM activity of HKMs from *L. crocea*

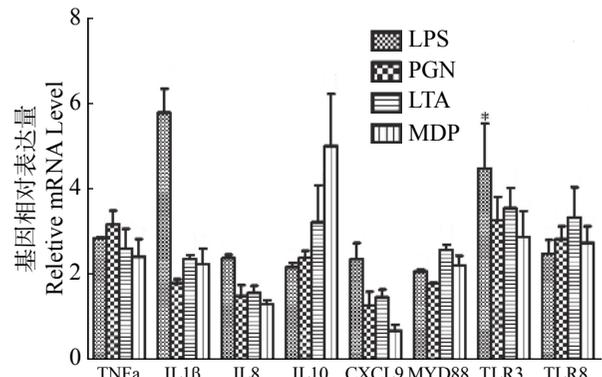


图5 病原相关分子模式刺激后大黄鱼头肾巨噬细胞中免疫相关细胞炎症因子表达情况

Fig. 5 Effects of PAMPs on mRNA expression of HKMs from *L. crocea*

3 讨论

大黄鱼属于海洋低等脊椎动物, 在抵抗外界病原侵染的过程中, 非特异性免疫尤其重要。巨噬细胞是机体重要的非特异性免疫效应细胞, 广泛分布于机体不同组织中, 当其受到病原体入侵、机体损伤等外界刺激时, 会启动防御机制以达到清除杀灭病原体的作用^[12]。此外, 巨噬细胞能分泌多种活性物质如活性氧(ROS)和细胞因子等来参与机体的免疫应答, 同时还能够传递抗原^[12]。巨噬细胞还可同时参与机体的非特异性免疫反应和特异性免疫反应, 广泛参与免疫系统的调节^[13]。本研究利用体外培养的大黄鱼头

肾巨噬细胞,分析了在4种病原相关分子模式的刺激下,其非特异性免疫功能和免疫相关细胞炎症因子的表达变化情况。呼吸爆发是指当有病原菌入侵机体时由巨噬细胞发挥吞噬消化作用,现广泛被用作评估机体非特异性免疫系统防御病原体的能力指标^[14]。在本研究中,当病原相关分子模式刺激时,大黄鱼头肾巨噬细胞的呼吸爆发活性均显著增强。Solem等^[15]的研究结果显示,LPS可导致大西洋鲑的呼吸爆发和吞噬活性显著增强,李庆飞等^[16]的研究也发现LPS可以诱导大黄鱼巨噬细胞的呼吸爆发。本实验结果与文献^[15-16]研究结果相一致。而PGN^[7],LTA^[9,17],MDP^[10]也被证明有刺激免疫细胞产生免疫应答及诱导巨噬细胞炎症的作用。黄行许等的研究结果^[18]表明,巨噬细胞发生呼吸爆发可产生大量活性氧(ROS),而ROS可以抑制巨噬细胞自身的凋亡。通常情况下,机体内氧化与抗氧化维持在一种动态平衡当中,一旦系统平衡被打破,机体就会产生一系列的氧化应激反应,从而对机体造成损伤^[12,19]。生物机体中抗氧化系统包括SOD,CAT和核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2,Nrf2)等抗氧化元件。一旦机体或者细胞产生的ROS被抗氧化系统清除,会同时表现出抗氧化酶活性降低。在本研究中,大黄鱼头肾巨噬细胞的抗氧化酶SOD与CAT活性均显著性降低,可能是由于在病原相关分子模式刺激下ROS产生与抗氧化系统之间的平衡破坏,致使抗氧化酶的分子损伤,故而降低了酶的活性。类似的结果在对中华绒螯蟹的研究中也有发现,在LPS的刺激下中华绒螯蟹的SOD等抗氧化酶活性显著性降低^[20]。同样地,Ren G等^[21]的研究表明,LPS降低了哲罗鲑肠中抗氧化酶的活性,并增加了炎症细胞因子的表达水平。Jiang W等^[22]研究小鼠时发现,LPS可显著降低抗氧化酶SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活性。另外,Zhang T T等^[23]在枯草芽孢杆菌中分离的PGN可显著降低鲤鱼肠道上皮细胞SOD和CAT的活性。

溶菌酶是鱼类等水生动物非特异性免疫系统中不可或缺的一种酶。溶菌酶在引发和维持机体防御免疫的过程中起着重要的作用,在机体免疫过程中可以水解致病微生物细胞壁中的肽聚糖而使细胞溶解、破碎直至死亡,还可诱导和调节其他免疫因子的合成与分泌^[24]。据文献^[25-26]报道,活化后的巨噬细胞在吞噬异物的过程中会释放大量溶菌酶、防御素、活性氧等多种免疫活性物质来清除异物。本实验中,在LPS,PGN,LTA,MDP刺激下,大黄鱼头肾巨噬细胞被活化,其溶菌酶活力也显著提高,表明这4种病原相关分子模式均可刺激大黄鱼产生较强的非特异性免疫应答。

大黄鱼主要依赖非特异性免疫系统抵抗病害^[3]。在外界环境的刺激下,其体内的免疫机制被迅速激发,产生多种免疫细胞因子。前人的研究发现,LPS刺激后,炎症相关细胞因子(IL1,IL6,IL10和TNF α)均显著性上调^[27];Jiang等^[22]人发现LPS刺激后鲤鱼肠道细胞的TNF α ,IL1 β ,IL8的mRNA相对表达水平显著提高。Zhang T T等人^[23]的研究结果显示,PGN可以通过抑制炎症因子和促进抗炎因子的基因表达来提高鱼体的抗炎能力。Su B C等^[17]用LTA处理小鼠巨噬细胞,结果发现LTA提高了IL6和TNF α 的水平,证实了LTA是巨噬细胞中炎症相关反应的有效诱导剂。同样地,本研究中,在LPS,PGN,LTA和MDP刺激下,大黄鱼免疫相关细胞炎症因子的表达水平均呈现不同程度的上调,说明大黄鱼头肾巨噬细胞对这4种病原相关分子模式产生了强烈的免疫反应。

本研究利用4种病原相关分子模式LPS,PGN,LTA,MDP刺激大黄鱼头肾巨噬细胞,探究了病原相关分子模式对大黄鱼头肾巨噬细胞非特异性免疫指标和免疫相关细胞炎症因子表达的影响。本研究结果表明,上述4种病原相关分子模式均能显著影响大黄鱼头肾巨噬细胞的呼吸爆发活性,抗氧化酶(SOD,CAT)活性和LAM活性,同时均显著上调了绝大部分免疫相关细胞炎症因子。本研究结果为深入探讨大黄鱼在受到不同病原相关分子模式刺激时产生的免疫机制提供了参考资料。

参考文献:

- [1] SUN P, BAO P, TANG B. Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under high stocking density stress [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 68: 332 - 340.
- [2] HUANG M, MU P, LI X, et al. Functions of TNF- α 1 and TNF- α 2 in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in mono-

- cyte/macrophage activation [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 105: 103 – 576.
- [3] WANG L, JIANG L, LIU G, et al. Molecular characterization and expression of TAK-binding proteins (TAB1-3) in *Larimichthys crocea* infected by *Vibrio parahaemolyticus* and LPS [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 98: 108 – 118.
- [4] LU Z, HUANG W, WANG S, et al. Liver transcriptome analysis reveals the molecular responses to low-salinity in large yellow croaker *Larimichthys crocea* [J]. *Aquaculture*, 2020, 517: 734 – 827.
- [5] WANG G L, YUAN S P, JIN S. Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson) [J]. *Journal of Fish Disease*, 2010, 28(6): 339 – 345.
- [6] 徐绮婷, 王寒, 廖纯颖, 等. 病原体相关分子模式 (PAMP) 诱导对奶牛乳腺成纤维细胞 TLR4、NOD2、IL-6、IL-8 和 TNF- α mRNA 表达的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2015, 35(12): 1943 – 1947.
- [7] 杨玲, 许以平, 曹玲仙, 等. PGN、LPS、Poly I:C 对过敏性哮喘患者嗜碱粒细胞释放能力的比较 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2008, 15(6): 368 – 370.
- [8] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2011: 16-17.
- [9] 陈伟, 彭焱, 吴钧, 等. 金黄色葡萄球菌脂磷壁酸纯化及其抗肿瘤的初步研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24(12): 960 – 963.
- [10] 荣康泰. 人工合成的免疫佐剂胞壁酰二肽类化合物 [J]. *氨基酸杂志*, 1982(1): 34 – 41.
- [11] SUN B M, LEI Y, CAO Z J, et al. TroCCL4, a CC chemokine of *Trachinotus ovatus*, is involved in the antimicrobial immune response [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 525 – 535.
- [12] 李琪, 杜佳峰, 高洁, 等. 副干酪乳杆菌 VL8 胞外多糖对巨噬细胞 RAW264.7 免疫激活作用研究 [J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(3): 208 – 213.
- [13] BIRK R W, GRATCHEV A, HAKIY N, et al. Alternative aktivierung antigen prsentierender zellen Konzept und klinische Bedeutung [J]. *Der Hautarzt*, 2001, 52(3): 193 – 200.
- [14] DALMO R A, INGEBRIGTSEN K, B GWALD J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1997, 20: 241 – 273.
- [15] SOLEM S T, JORGENSEN 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: 475 – 491.
- [16] 李庆飞, 崔坤, 艾庆辉, 等. 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性反应的影响 [J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 810 – 819.
- [17] SU B C, CHEN J Y. Epinecidin-1: An orange-spotted grouper antimicrobial peptide that modulates *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid-induced inflammation in macrophage cells [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 99: 362 – 367.
- [18] 黄行许, 陈练波, 马晓东, 等. ROS 对小鼠腹腔巨噬细胞凋亡的影响 [J]. *基础免疫学*, 2000, 5(16): 334 – 338.
- [19] PRATHEESHKUMAR P, SON Y, DIVYA S P, et al. Luteolin inhibits Cr(VI)-induced malignant cell transformation of human lung epithelial cells by targeting ROS mediated multiple cell signaling pathways [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 281: 230 – 241.
- [20] LIU J D, LIU W B, ZHANG C Y, et al. Dietary glutathione supplementation enhances antioxidant activity and protects against lipopolysaccharide induced acute hepatopancreatic injury and cell apoptosis in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 97: 440 – 454.
- [21] REN G, XU L, LU T, et al. Protective effects of lentinan on lipopolysaccharide induced inflammatory response in intestine of juvenile taimen (*Hucho taimen*, Pallas) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 317 – 325.
- [22] JIANG W, LUO F, LU Q, et al. The protective effect of Trillin LPS-induced acute lung injury by the regulations of inflammation and oxidative state [J]. *Chemico-biological Interactions*, 2016, 243: 127 – 134.
- [23] ZHANG T T, YIN H C, HUANG W. Protective effect of *Bacillus subtilis* peptidoglycan (PG) on β -conglycinin-induced intestinal epithelial cells damage of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2019, 11(2): 56 – 61.
- [24] 王红权, 唐德约, 赵玉蓉, 等. 牛膝多糖对草鱼免疫和抗氧化功能的影响 [J]. *水生生物学报*, 2013, 37(2): 351 – 355.
- [25] SHU Y, LIU X B, MA X H, et al. Immune response mechanism of mouse monocytes/macrophages treated with κ -carrageenan polysaccharide [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2017, 53: 191 – 198.
- [26] 顾丽霞, 郑斌, 相兴伟, 等. 硒化低聚氨基多糖对 RAW264.7 细胞的免疫调节作用 [J]. *食品科学*, 2018, 39(13): 198 – 204.
- [27] HANADA T, YOSHIMURA A. Regulation of cytokine signaling and inflammation [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2002, 13: 413 – 421.

Effects of Pathogen-associated Molecular Patterns on the Immunologic Function of the Head Kidney Macrophages from Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*)

LIU Xiaocen¹, ZHOU Yongcan^{1,2}, CAO Zhenjie¹, SUN Yun¹

(1. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea/Key Laboratory of Tropical Hydrobiology and Biotechnology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Department of Aquaculture, College of Marine Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: In order to study the effects of pathogen-associated molecular patterns on the immunologic function of the head kidney macrophages (HKMs) from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), the head kidney macrophages from *L. crocea* were extracted and then incubated with lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan (PGN), lipoteichoic acid (LTA), muramyl dipeptide (MDP), respectively, and their respiratory burst activity, antioxidant enzyme (SOD & CAT) activity, lysozyme activity and expression of immune-related cellular inflammatory factors (TNF α , IL1 β , IL8, IL10, CXCL9, MYD88, TLR3, and TLR8) were detected. The results showed that the LPS, PGN, LTA, and MDP increased the respiratory burst activity and lysozyme activity of HKMs from *L. crocea*, but reduced the activities of the two antioxidant enzymes SOD and CAT. The expression levels of TNF α , IL1 β , IL8, IL10, CXCL9, MYD88, TLR3, and TLR8 were significantly up-regulated under the LPS and LTA stimulation, and other six immune-related cellular inflammatory factors except IL8 and CXCL9 were significantly up-regulated under the PGN and MDP stimulation. These results suggested that the four pathogen-associated molecular patterns, LPS, PGN, LTA and MDP, have significant effect on the non-specific immunity and the expression of immune-related cellular inflammatory factors of HKMs from *L. crocea*.

Keywords: *Larimichthys crocea*; macrophages; pathogen-associated molecular patterns; non-specific immunity; cellularinflammatory factors

(责任编辑:叶静)