

铁离子对斑马鱼肝脏细胞应激低氧胁迫的影响

李根芳, 胡瑞芹, 宋汝浩, 陈良标

Effect of iron on zebrafish liver cells under hypoxic stress

LI Genfang, HU Ruiqin, SONG Ruhao, CHEN Liangbiao

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210403380>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

低氧胁迫下斑马鱼鳃中核糖体蛋白基因家族的表达分析

Differential expression analysis of the ribosomal protein gene family in zebrafish gills under hypoxia stress

上海海洋大学学报. 2022, (2): 318 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210403367>

壳寡糖对黄曲霉毒素B₁诱导大鼠肝细胞毒性损伤的干预作用

Intervention effect of chitooligosaccharides on aflatoxin B₁-induced toxic damage of rat liver cells

上海海洋大学学报. 2021, 30(6): 1164 <https://doi.org/10.12024/jsou.20201103229>

水解单宁对副溶血弧菌感染凡纳滨对虾血液及血细胞免疫指标的影响

Effect of Hydrolyzable Tannins on Hemolymph and Cellular Immunological Responses of *Litopenaeus vannamei* Challenged by *Vibrio parahaemolyticus*

上海海洋大学学报. 2021, 41(3): 12 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2021.03.002>

马氏珠母贝酶解蛋白粉营养成分及其对斑马鱼学习记忆能力的影响

The Nutritional Composition of Enzymolysis Protein Powder of *Pinctada martensii* and Its Improving Effect on Learning and Memory Ability of Aging Zebrafish

上海海洋大学学报. 2021, 41(3): 74 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2021.03.010>

镉和低pH胁迫对中华绒螯蟹免疫应答及相关基因表达的影响

Effects of cadmium and low pH stress on immune response and expression of related genes in the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*)

上海海洋大学学报. 2022, (2): 373 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210303330>

文章编号: 1674-5566(2022)05-1048-09

DOI:10.12024/jsou.20210403380

铁离子对斑马鱼肝脏细胞应激低氧胁迫的影响

李根芳^{1,2,3}, 胡瑞芹^{1,2,3}, 宋汝浩⁴, 陈良标^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 4. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306)

摘要: 为探究铁离子浓度对鱼类应激低氧胁迫的影响, 本研究以模式生物斑马鱼的肝脏细胞 (zebrafish liver cells, ZFL) 为研究对象, 分别利用柠檬酸铁胺 (ammonium ferric citrate, FAC) 和去铁胺 (Defetoxamine, DFO) 对 ZFL 细胞进行外源铁补充和内源及外源铁清除处理, 比较不同铁离子浓度下 ZFL 细胞对低氧胁迫的应激反应。结果表明, 低氧胁迫显著降低了 ZFL 细胞的增殖能力和存活率以及铁代谢相关基因的表达水平, 而与对照组和内源及外源铁清除组相比, 补充外源铁能够明显增强 ZFL 细胞在低氧胁迫下的增殖能力、存活率和铁蛋白的表达水平。同时, 在外源铁补充组的 ZFL 细胞中, 与铁吸收 (*tfa*)、铁储存 (*fihl27* *fihl28* *fihl31*) 和铁输出 (*fpn*) 相关基因的 mRNA 表达水平均显著提高。进而又对低氧胁迫下 ZFL 细胞的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平进行检测, 发现补充外源铁能够在一定程度上恢复 ZFL 细胞中 ROS 的水平, 说明在一定范围内胞内 ROS 水平的增加有利于 ZFL 细胞应对低氧胁迫, 有助于提高其在低氧环境中的生存率。

关键词: 低氧胁迫; 斑马鱼肝脏细胞; 铁离子; 柠檬酸铁胺; 去铁胺; 活性氧

中图分类号: S 917

文献标志码: A

溶氧量 (dissolved oxygen, DO) 是水生态环境的关键理化因子之一, 也是鱼类养殖中的重要限制因素。低溶氧量即低氧, 会对鱼类的行为、生理学、免疫学和生长产生负面影响^[1-3]。在饲养中, 长时间缺氧会导致鱼类采食量降低, 生长迟缓且极易患病^[4-5]。研究^[6-7]表明, 鱼类缺氧后其红细胞 (red blood cell, RBC), 血红蛋白 (hemoglobin, Hb) 和/或血细胞比容 (hematocrit, Ht) 会迅速增加。血红蛋白是红细胞内运输氧的重要蛋白质, 因此, 在低氧条件下, 需要合成更多的血红蛋白以增加氧气的供应。

铁离子是血红蛋白的主要成分之一, 机体内有 60% ~ 75% 的铁用于血红蛋白的合成。同时, 铁还参与各种重要的生理活动, 例如 DNA 的合成和修复、多种酶活性的调节、各种代谢和免疫反应等^[8-10], 因此铁供应不足或过量都会引起机体病变。而肝脏作为机体对外界刺激反应最早、

最敏感的组织之一, 也是最早出现损伤的组织, 严重时则会使鱼类肝脏处于超负荷状态^[11]。同时, 肝脏在铁稳态中也起着重要作用, 其不仅是体内多余铁的储存场所, 而且在调节肠上皮细胞和巨噬细胞释放铁离子到血液中也起着至关重要的作用^[12-13]。

因此, 本研究通过建立缺氧或补铁或去铁的 ZFL 模型, 探究铁代谢对 ZFL 细胞在低氧适应过程中的影响, 旨在从分子机制层面研究 ZFL 细胞在低氧环境中的反应以及铁离子对其适应低氧胁迫的影响, 从而为今后深入研究鱼类应对低氧胁迫的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

主要试剂: 胎牛血清 (Gibco, 美国); DMEM F12 培养基 (Gibco, 美国); Alamar Blue 试剂盒

收稿日期: 2021-04-08 修回日期: 2021-07-24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0900600); 上海市科学技术委员会“一带一路”国际联合实验室项目 (19590750500); 上海市教育委员会研创新计划项目 (2017-01-07-00-10-E00060)

作者简介: 李根芳 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。E-mail: 2514231599@qq.com

通信作者: 陈良标, E-mail: lbchen@shou.edu.cn

(Invitrogen, 美国); 柠檬酸铁胺 (Sigma-Aldrich, 美国); 去铁胺 (Abcam, 英国); TRIzol 试剂 (Ambion, 美国); 反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本); SYBR Green I 荧光定量染料 (Roche, 瑞士); Ferritin 抗体 (杭州华安生物技术有限公司, 杭州); Actin 抗体 (杭州华安生物技术有限公司, 杭州); 蛋白显影液 (上海碧云天生物技术有限公司, 上海); H2DCFDA ROS 探针 (ThermoFisher, 美国)

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及低氧胁迫

取出保存于液氮中冻存的 ZFL 细胞系, 28 °C 溶解后 800 r/min 离心 5 min, 去掉上清, 细胞沉淀加入到含 10% 胎牛血清和 1% PS 抗生素的 DMEM 完全培养基中, 置于 28 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养。待细胞密度生长至 80% ~ 90% 时, 用 0.25% 胰酶进行消化传代。当获得足够数量的 ZFL 细胞时, 将一部分 ZFL 细胞进行低氧胁迫处理, 即通过不断的充入 N₂ 使培养箱内氧气含量恒定维持在 0.1%。对 ZFL 细胞低氧胁迫后, 分别提取实验组和对照组细胞的总 RNA 和总蛋白进行验证实验。

1.2.2 实验分组及处理

将生长状态良好的 ZFL 细胞分为 (1) 常氧组: ZFL 细胞在 28 °C、5% CO₂、21% O₂ 的正常培养箱中进行培养; (2) 低氧组: ZFL 细胞在 28 °C、5% CO₂、0.1% O₂ 的培养箱中培养 2 ~ 5 d; (3) FAC 组 (补充铁处理): 分别用含有不同浓度 FAC (0、0.1、0.25、0.5、0.75、1、2 mmol/L) 的培养基在 28 °C、5% CO₂、0.1% O₂ 的培养箱中培养 ZFL 细胞 2 ~ 5 d; (4) DFO 组 (清除铁处理): 分别用含有不同浓度 DFO (0、10、30、50、70、90、100 μmol/L) 的培养基在 28 °C、5% CO₂、0.1% O₂ 的培养箱中培养 ZFL 细胞 2 ~ 5 d。

1.2.3 Alamar blue 法检测细胞活力

将适量对数生长期的 ZFL 细胞接种于 96 孔板, 每组设置 4 个重复孔。细胞过夜培养后按照 1.2.2 节分组处理。分别在 2、3、4 和 5 d 各拿出 1 组常氧组、低氧组、FAC 组和 DFO 组细胞测定其在不同处理条件下的活力情况: 首先在培养基中加入 10 μL Alamar blue 溶液, 28 °C 继续培养细胞 3 h。然后使用微量酶标仪分别检测细胞在 570 nm 和 600 nm 波长下的吸光值, 并将常氧组

样品的吸光值设置为 100% 来计算不同处理后细胞的活力变化情况。细胞活力为处理组样品的 OD 值与常氧组样品的 OD 值之比。

1.2.4 蛋白免疫印迹检测细胞的铁蛋白表达水平变化

铁蛋白是机体内贮存铁的可溶性组织蛋白, 其分子量约为 500 ku, 由 2 种亚基按不同比例组成, 一种是重链亚基 (Heavy chain, H), 分子量约为 21 ku, 另一种是轻链亚基 (Light chain, L), 分子量约为 19 ku, 本研究主要以检测铁蛋白重链的表达水平来表示铁蛋白的表达水平^[14]。为了检测常氧组、低氧组、FAC 组和 DFO 组细胞中铁蛋白的表达情况, 首先取低氧处理 3 d 的 ZFL 细胞, 去掉培养基, 向各组的 ZFL 细胞中加入适量细胞裂解液 (RIPA-buffer), 再加入 1% 蛋白酶抑制剂 (PMSF), 4 °C 裂解 20 min 后, 15 000 r/min 离心 10 min, 获得的上清即为总蛋白溶液。然后利用 BCA 法测定各蛋白浓度后, 再用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白分离, 0.22 μm 的 PVDF 膜进行转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2.5 h, 3% 脱脂奶粉稀释的一抗 4 °C 过夜孵育, PBST 洗涤液清洗 3 次后, 孵育二抗 2 h, 洗涤后进行蛋白显影。

1.2.5 相对定量 PCR 检测细胞的铁代谢相关基因 mRNA 表达水平的变化

采用 TRIzol 法分别提取常氧和低氧处理 3 d 的各 ZFL 细胞的总 RNA, 并测定 RNA 的浓度和纯度。利用反转录试剂盒合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 并以 β-actin 为内参 (表 1)。采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算各基因的相对 mRNA 表达水平。

1.2.6 H2DCFDA 探针检测细胞 ROS 水平

收集低氧处理 3 d 的各 ZFL 细胞和对照组细胞, 按照说明书加入适量的 H2DCFDA 工作液。将细胞置于 28 °C 孵育 30 min 后, 去掉工作液, PBS 清洗 3 次, 利用 BD Accuri C6 流式细胞仪定量荧光强度, 并用 ZEISS 荧光显微镜观察 ROS 水平。

1.2.7 统计学处理

运用 GraphPad Prism 7 软件对数据进行作图分析, 所有实验均设 3 次重复, 利用 *t* 检验检测不同样品间的差异显著性 ($P < 0.05$ 表示有统计学差异; $P < 0.01$ 表示有显著统计学差异; $P < 0.001$ 表示有极其显著的统计学差异)。

2 结果

2.1 铁离子浓度影响低氧胁迫下 ZFL 细胞的存活率

2.1.1 低氧胁迫下补充铁离子可提高 ZFL 细胞的增殖能力和存活率

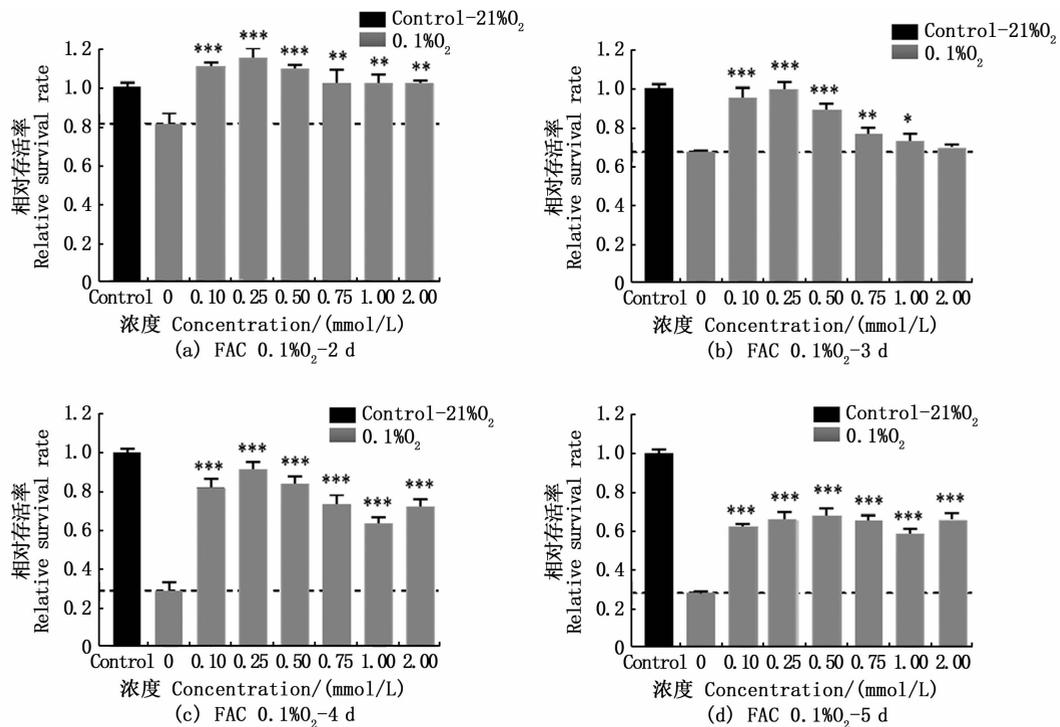
为了探究低氧胁迫下铁离子浓度对 ZFL 细胞生存能力的影响,利用 FAC 对 ZFL 细胞进行外源补铁。结果表明,随着低氧胁迫(0.1% O₂)时间的延长,与常氧组(control-21% O₂)相比,未补充 FAC 的 ZFL 细胞(0 mmol/L)的增殖能力和存活率逐渐下降。而补充不同浓度 FAC 的 ZFL 细胞较未补充外源铁的低氧组(0 mmol/L)的增殖能力和存活率显著提高(图 1)。并且在低氧胁迫 2 d 时,FAC 组(0.1、0.25、0.5 mmol/L)细胞的增殖能力和存活率甚至高于常氧组[图 1(a)]。而第 4、5 天时,与低氧组(0 mmol/L)相比,FAC 组 ZFL 细胞的存活率增加了约 2~3 倍。因此,补充

外源铁离子能够提高 ZFL 细胞在低氧条件下的增殖能力和存活率。

表 1 引物信息

Tab.1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
<i>tfa</i> -F	AGCAGCAGACATTGACTGTC
<i>tfa</i> -R	TTTGCTCCACTACTCTAACC
<i>tfr2</i> -F	AGCACTTTACCTCACACTGAC
<i>tfr2</i> -R	AGGAATGTTGTCCGGCTCG
<i>fhl27</i> -F	TGCGAGGCTTTGATCAACAAG
<i>fhl27</i> -R	TGGCAAATCCAGGAAGAGCC
<i>fhl28</i> -F	AAGATGATCAATCTGGAGC
<i>fhl28</i> -R	TTGAAGAACTTGGCAAATCC
<i>fhl31</i> -F	AGGCTGCCGATCAACAAGATG
<i>fhl31</i> -R	AGGAAGAGCCACATCGTC
<i>fpn</i> -F	ACATGCCCTCTCGACATGG
<i>fpn</i> -R	AGGAGTAAACTATTGCCATACAG
<i>actin</i> -F	TGTCCTGTATGCTCTGCT
<i>actin</i> -R	AACTCCAGACGGAGGATG



柱状图上方 * 表示与低氧组(0 mmol/L)相比在 $P < 0.05$ 水平有统计学差异; ** 表示在 $P < 0.01$ 水平有显著统计学差异; *** 代表在 $P < 0.001$ 水平有极其显著的统计学差异。

*. Represented statistical difference ($P < 0.05$) compared with the hypoxic group (0 mmol/L); **. There are significant statistical differences at $P < 0.01$ level; ***. There are significant statistical differences at $P < 0.001$ level.

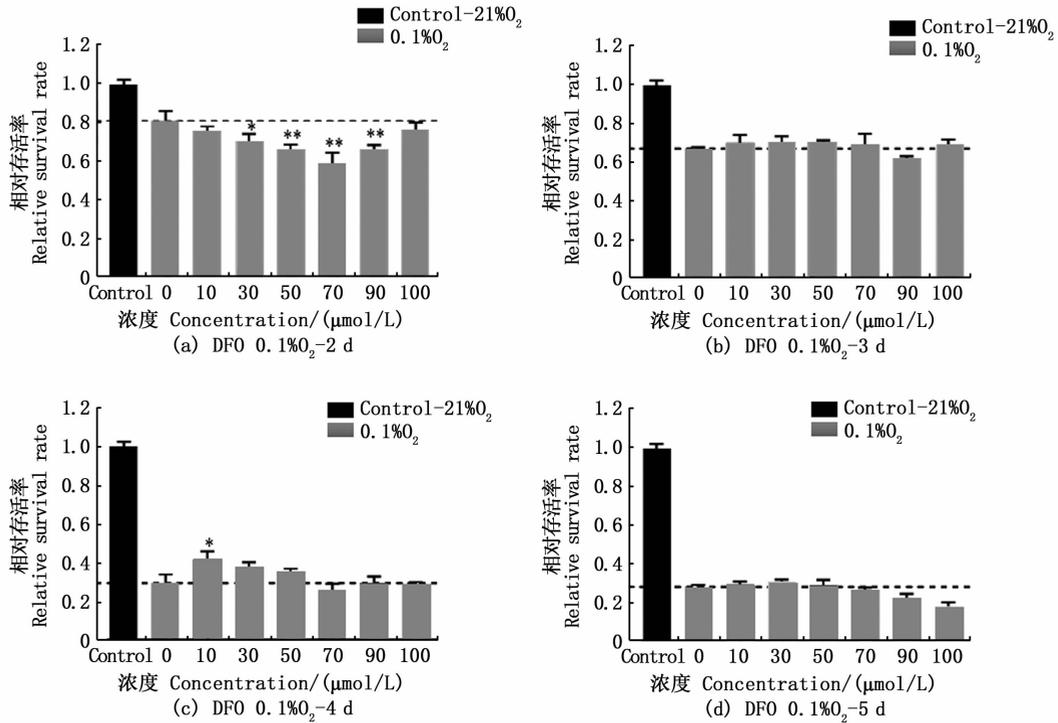
图 1 不同浓度 FAC 处理的 ZFL 细胞进行低氧胁迫 2~5 d 后的细胞存活率

Fig.1 Cell survival rate of ZFL cells treated with different concentrations of FAC after 2-5 days of hypoxic stress

2.1.2 低氧胁迫下清除铁离子可改变 ZFL 细胞的增殖能力和存活率

去铁胺(DFO)能够螯合游离铁、铁蛋白和含铁血黄素中的铁离子^[15],因此利用 DFO 清除 ZFL 细胞的内源及外源铁离子。实验结果表明,随着低氧胁迫(0.1% O₂)时间的延长,不同浓度的 DFO 处理后,仅在处理第 2 天时,ZFL 细胞的增殖能力和存活率比未清除铁的低氧组(0

μmol/L)略有下降,其中当 DFO 浓度为 70 μmol/L 时最为明显,约减少了 25% [图 2(a)]。但是处理第 4 天,当 DFO 浓度为 10 ~ 50 μmol/L 时,ZFL 细胞的增殖能力和存活率反而比低氧组(0 μmol/L)增加约 30%。而第 3 天和第 5 天无显著的变化。综上所述,清除内源和外源铁离子能在一定程度上改变 ZFL 细胞在低氧条件下的增殖能力和存活率。



柱状图上方 * 表明与低氧组(0 μmol/L)相比在 P < 0.05 水平有统计学差异; * * 表示在 P < 0.01 水平有显著统计学差异。
* . Represented statistical difference (P < 0.05) compared with the hypoxic group (0 μmol/L); * * . There are significantly statistical differences at P < 0.01 level.

图 2 不同浓度 DFO 处理的 ZFL 细胞进行低氧胁迫 2 ~ 5 d 后的细胞存活率
Fig. 2 Cell survival rate of ZFL cells treated with different concentrations of DFO after 2 ~ 5 days of hypoxic stress

2.2 FAC 提高低氧胁迫下 ZFL 细胞中铁离子的水平

为了进一步探究铁离子含量对 ZFL 细胞应激低氧胁迫的影响,对在低氧胁迫(0.1% O₂)条件下培养 3 d 的 FAC 组、DFO 组和 WT 组的细胞状态进行形态学观察,结果表明 FAC 组的活细胞数量显著多于 DFO 组和 WT 组,且细胞状态良好,死细胞较少[图 3(a)]。继而对铁蛋白重链(Ferritin heavy chain, FTH)的表达水平检测发现,与常氧组(21% O₂)相比,低氧胁迫后 ZFL 细胞中 FTH 的表达量明显减少,而 FAC 补铁后,细胞中的 FTH 表达量急剧增加,同时 DFO 去除 Fe³⁺后,则呈相反趋势[图 3(b)]。这些结果说明细

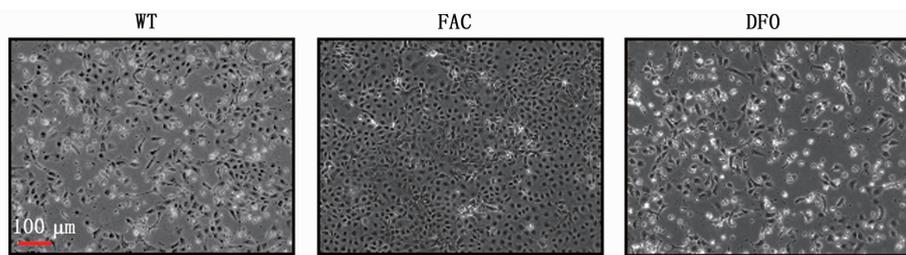
胞中铁离子的含量对 ZFL 细胞应对低氧胁迫至关重要,外源补铁能够提高低氧胁迫下 ZFL 细胞中铁离子的水平,从而提高低氧胁迫下 ZFL 细胞的存活率。

2.3 FAC 提高低氧胁迫下 ZFL 细胞中铁代谢相关基因的 mRNA 表达水平

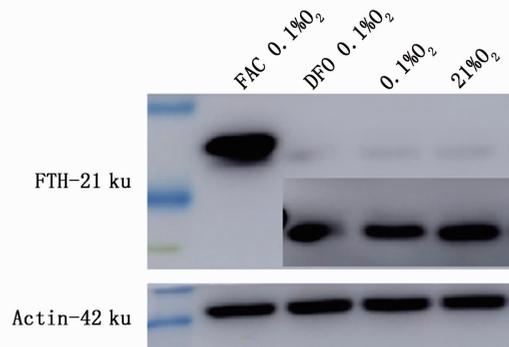
铁泵蛋白(Ferroportin, FPN)是脊椎动物细胞中目前已知的唯一铁跨膜外排蛋白,吸收进入小肠上皮的铁离子最终通过 FPN 进入血液循环系统^[16-17]。而转铁蛋白(transferrin, TF)是血浆中主要的含铁蛋白质,负责机体内铁的运输,携带铁离子的 TF 与发育中的红细胞表面的高亲和力转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TFR1) 结合,

Tf-Fe/TFR 复合体通过内吞进入细胞内,为细胞活动提供铁离子^[18-20]。血液循环中的铁,满足机体所需后,多余的铁则存储在铁蛋白(Ferritin)中^[21]。由此可见,这些蛋白的表达水平对铁代谢具有重要的调控作用。为了探究铁稳态在 ZFL 细胞应激低氧胁迫中的作用,利用相对定量 PCR 技术,检测 FAC 组、DFO 组、低氧组和常氧组的 ZFL 细胞中的铁泵蛋白、转铁蛋白和铁蛋白相关基因的 mRNA 表达水平。结果表明,与常氧组(21% O₂)相比,低氧胁迫后 ZFL 细胞中的铁泵蛋白基因(*fpn*)、转铁蛋白及其受体基因(*tfa* 和 *tfr2*)和铁蛋白基因(*fthl27*、*fthl28*、*fthl31*)的

mRNA 表达量均显著下降,从而导致低氧胁迫下细胞内的总铁水平及铁离子的利用率均降低。但是向细胞内添加 FAC 能够在一定程度上恢复这些基因的表达水平,其中铁蛋白基因(*fthl27*、*fthl28*、*fthl31*)的表达量甚至远高于常氧组,*fthl28* 的表达水平更是比常氧组增加了 7.5 倍,这一结果与铁蛋白表达量增加一致。内源及外源铁离子的清除进一步降低了这些与铁吸收、储存和外排相关基因的表达量(图 4)。因此,补充外源铁离子(Fe³⁺, FAC)可以提高低氧胁迫下 ZFL 细胞中铁离子代谢相关基因的表达水平,从而提高 ZFL 细胞中铁的含量以提高低氧胁迫下的存活率。



(a) 0.1%低氧胁迫ZFL细胞3 d后FAC组、DFO组和WT组细胞状态对比
Comparison of cell status of FAC group, DFO group, and WT group
after 3 days of 0.1% hypoxic stress on ZFL cells



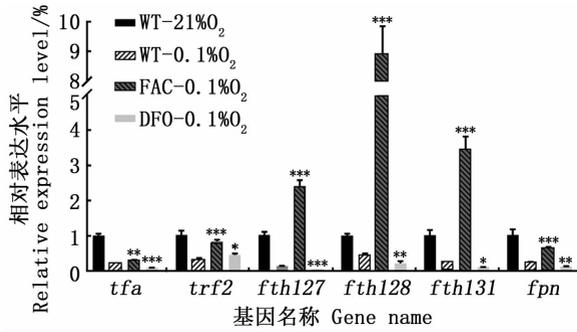
(b) 0.1%低氧胁迫3 d后FAC组、DFO组和低氧组及常氧组FTH表达水平检测
Expression level of ferritin heavy chain in FAC group, DFO group and
hypoxic group under 0.1% hypoxic stress for 3 days and normoxic group

图3 低氧胁迫下不同处理的 ZFL 细胞的显微观察和 FTH 表达水平检测
Fig. 3 Microscopic observation and ferritin heavy chain expression level
of ZFL cells with different treatments under hypoxic stress

2.4 FAC 提高低氧胁迫下 ZFL 细胞中 ROS 的水平

为了探究铁离子浓度对低氧胁迫下 ZFL 细胞中 ROS 水平的影响,利用 H2DCFDA 探针和流式细胞仪对 FAC 组、DFO 组、低氧组和常氧组进行 ROS 水平检测,结果表明低氧组(0.1% O₂) ZFL 细胞内 ROS 水平比常氧组(21% O₂)明显降低约 60%,而 FAC 组细胞内 ROS 水平比低氧组

增加约 20%,但 DFO 组的 ROS 水平无明显变化[图 5(a)]。利用荧光显微镜观察荧光强度[图 5(b)],其结果与流式细胞仪一致,即低氧组荧光强度较常氧组低,但是 FAC 组荧光强度较低氧组有所增强,DFO 组与低氧组一致。因此,同低氧组相比,补充 Fe³⁺可以适当恢复低氧胁迫下 ZFL 细胞内 ROS 的水平,说明在一定范围内 ROS 水平的增加有利于提高 ZFL 细胞在低氧下的存活率。

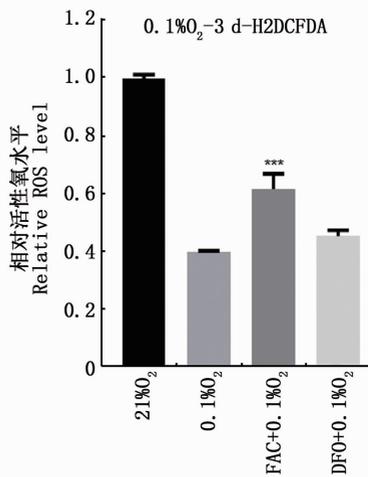


柱状图上方 * 表明与低氧组 (WT- 0.1% O₂) 相比在 P < 0.05 水平有统计学差异; * * 表示在 P < 0.01 水平有显著统计学差异; * * * 代表在 P < 0.001 水平有极其显著的统计学差异。The “*” above the bar represented statistical difference (P < 0.05) compared with the hypoxic group (WT- 0.1% O₂); * *. There are significantly statistical differences at P < 0.01 level; * * *. There are significant statistical differences at P < 0.001 level.

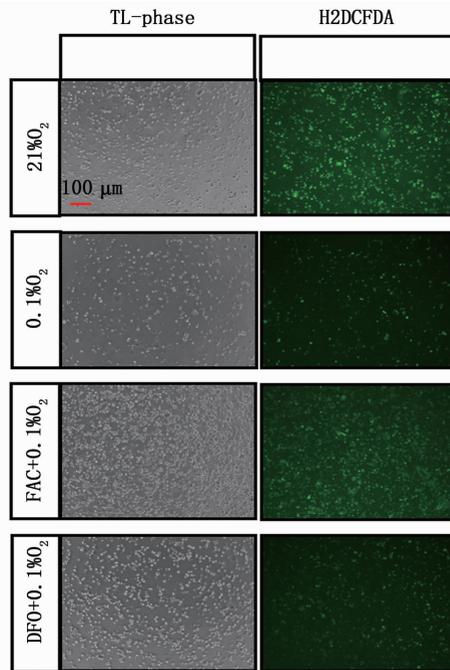
图4 0.1%低氧胁迫 ZFL 细胞 3 d 后 FAC 组、DFO 组和低氧组及常氧组铁代谢相关基因表达量的测定
Fig.4 Expression level of iron metabolism-related genes of ZFL cells in FAC group, DFO group and hypoxic group under 0.1% hypoxic stress for 3 days and normoxic group

3 讨论

在低氧条件下,机体需要通过增加红细胞和血红蛋白的数量、增强血液携带氧的能力来提高血氧含量和容量,以此发挥机体代偿作用机制^[22]。而铁是血红蛋白的重要成分,因此应对缺氧的反应也增加了机体对铁的需求。此外铁也是维持其他生命活动和支持几乎所有类型细胞生长所必需的元素。例如,在真核生物中,它大量存在于线粒体呼吸链的电子转移中心,并且是许多蛋白质和酶的活性位点^[23]。研究^[24]发现,从生长培养基中去除 Fe³⁺ 会导致铁依赖性酶-核糖核苷酸还原酶的活性降低,从而使细胞周期停滞在 G1 / S 期。因此,铁对于细胞增殖也是必不可少的。所以在低氧环境中,细胞对铁的吸收、转运、循环再利用等过程也会随之发生改变^[25]。本研究发现,低氧胁迫时给 ZFL 细胞补充 Fe³⁺, 能增加其胞内铁吸收、转运及储存相关基因的表达,从而促进细胞对铁的吸收以满足低氧环境下



(a) 流式细胞仪定量检测 0.1% O₂ 低氧胁迫 3 d 后 ZFL 细胞内的 ROS 水平
The ROS level of ZFL cells was quantitatively determined by flow cytometry after 3 days of 0.1% O₂ hypoxic stress



(b) 荧光显微镜观察 0.1% O₂ 低氧胁迫 3 d 后 ZFL 细胞内 ROS 的荧光强度
Fluorescence microscope was used to observe the changes of ROS fluorescence intensity in ZFL cells after 3 days of 0.1% O₂ hypoxic stress

柱状图上方 * * * 表明与低氧组 (0.1% O₂) 相比在 P < 0.001 水平有极其显著的统计学差异。

The “* * *” above the bar represented extremely significant statistical difference (P < 0.001) compared with the hypoxic group (0.1% O₂).

图5 低氧胁迫下不同处理的 ZFL 细胞的 ROS 水平检测
Fig.5 ROS levels of ZFL cells treated with different treatments under hypoxic stress

的需求,使细胞仍能维持正常的增殖等生命活动。相反,去除 Fe^{3+} 一定程度上会抑制细胞在低氧环境下的生理活动。但是 DFO 也用于缺氧模拟,因为它可以激活缺氧诱导因子(HIF-1 α)途径^[26]。HIF-1 α 是目前发现的唯一一个在特异性缺氧状态下发挥活性的转录因子,是介导缺氧信号的转导中枢^[27]。缺氧诱导因子 1(HIF-1)与促红细胞生成素、血管内皮生长因子和其他基因中的顺式作用缺氧反应元件结合,以在缺氧细胞中激活转录。此外,它还可以诱导控制葡萄糖代谢、细胞增殖和血管形成的相关蛋白表达^[28],从而调控细胞产生一系列应对缺氧的代偿反应,在机体的生长发育及生理和病理过程中发挥重要作用。在本研究中利用 DFO 去除 ZFL 细胞的内源及外源铁离子后,可能激活了 HIF-1 α 信号通路,所以 ZFL 细胞的生存状态与低氧组相比没有明显的恶化。这表明 ZFL 细胞在适应低氧时,除了铁需求增加以外,还有其他机制在调节铁的储存和使用中起着积极的作用。

所有的多细胞生物都依赖于消耗氧气并通过氧化磷酸化途径来产生 ATP,但是其中约有 2% 的氧气会与未能传递到末端氧化酶的电子结合并形成 ROS^[29]。此外游离铁可直接通过 Fenton 和 Haber-Weiss 反应生成高反应性 ROS^[30]。ROS 积累是多种细胞应激反应的触发因素,包括 DNA 损伤反应和其他与信号转导相关的反应^[31]。ROS 的过度积累和氧化损伤与多种疾病有关,因此 ROS 一直被认为是代谢的不可避免的毒性副产物^[32]。然而,ROS 的产生对于机体来说并不总是有害的。事实上,分子氧引发氧化应激产生的 ROS 和自由基(Free radical, FR)是正常细胞代谢的结果,它们的副产物是有效的杀菌剂,能积极地破坏入侵性病原体,并且在各种代谢途径中也起着关键作用^[33-34]。另外,少量的线粒体 ROS(mROS)诱导可以作为分子警报系统促进细胞对应激源的适应性,如低氧下的 HIF 活化、饥饿下的自噬活化、病原体感染下炎症细胞因子的产生、受体依赖性刺激下的分化,这些活动都促进了细胞存活^[35]。

有研究发现,鲮鱼(*Fundulus heteroclitus*)、虾虎鱼(*Percottus glenii*)等鱼类长期暴露于恒定或间歇性缺氧环境下会增加其抗氧化酶活性并降低线粒体 ROS 的释放率^[36-38]。同时有研究^[39]认

为缺氧会降低线粒体的丰度,降低骨骼肌氧化磷酸化的能力,从而下调 ROS 水平,这可能有助于平衡氧气供需的适应性状。本研究发现,低氧胁迫显著降低了 ZFL 细胞内的 ROS 水平,以帮助其适应低氧环境,相应的,补铁恢复了 ROS 水平,暗示增加铁源缓解了 ZFL 细胞的低氧应激反应,并且细胞内存在一定的 ROS 对其生命活动是有利的。但是,调节 ROS 水平的具体机制尚不清楚。

综上所述,补充外源铁离子能够缓解 ZFL 细胞应对低氧胁迫的压力,所以补充铁源或许可以作为养殖鱼类抵抗低氧胁迫的有效方法。但是补充铁源的方式以及用量还需进一步在养殖鱼体内进行探究。

参考文献:

- [1] QIANG J, ZHONG C Y, BAO J W, et al. The effects of temperature and dissolved oxygen on the growth, survival and oxidative capacity of newly hatched hybrid yellow catfish larvae (*Tachysurus fulvidraco* ♀ × *Pseudobagrus vachellii* ♂) [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 86: 102436.
- [2] VALAVANIDIS A, VLAHOIANNI T, DASSENAKIS M, et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 64(2): 178-189.
- [3] 吴志昊, 尤锋, 王英芳, 等. 低氧和高氧对大菱鲆幼鱼红细胞核异常及氧化抗氧化平衡的影响 [J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(6): 808-813.
WU Z H, YOU F, WANG Y F, et al. The effects of hypoxia and hyperoxia on nucleus anomaly, SOD, CAT activities and MDA content in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(6): 808-813.
- [4] PÖRTNER H O. Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(6): 881-893.
- [5] 张冬梅, 赵柳兰, 刘巧, 等. 大口黑鲈 *leptin A* 基因的组织表达及其对急性低氧胁迫的响应 [J]. *水产学报*, 2020, 44(10): 1609-1618.
ZHANG D M, ZHAO L L, LIU Q, et al. Tissue expression of *leptin A* gene in *Micropterus salmoides* and its response to acute hypoxia stress [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(10): 1609-1618.
- [6] AFFONSO E G, POLEZ V L P, CORRÊA C F, et al. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2002, 133(3): 375-382.

- [7] CRISPO E, CHAPMAN L J. Geographic variation in phenotypic plasticity in response to dissolved oxygen in an African cichlid fish[J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2010, 23(10): 2091-2103.
- [8] OEXLE H, GNAIGER E, WEISS G. Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1999, 1413(3): 99-107.
- [9] SHAH Y M, XIE L W. Hypoxia-inducible factors link iron homeostasis and erythropoiesis[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(3): 630-642.
- [10] PUIG S, RAMOS-ALONSO L, ROMERO A M, et al. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair[J]. *Metallomics*, 2017, 9(11): 1483-1500.
- [11] KIETZMANN T. Liver zonation in health and disease: hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors as concert masters[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(9): 2347.
- [12] ANDERSON E R, SHAH Y M. Iron homeostasis in the liver[J]. *Comprehensive Physiology*, 2013, 3(1): 315-330.
- [13] RISHI G, SUBRAMANIAM V N. The liver in regulation of iron homeostasis[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2017, 313(3): G157-G165.
- [14] KNOVICH M A, STOREY J A, COFFMAN L G, et al. Ferritin for the clinician[J]. *Blood Reviews*, 2009, 23(3): 95-104.
- [15] HERSHKO C, KONIJN A M, NICK H P, et al. ICL670A: a new synthetic oral chelator; evaluation in hypertransfused rats with selective radioiron probes of hepatocellular and reticuloendothelial iron stores and in iron-loaded rat heart cells in culture[J]. *Blood*, 2001, 97(4): 1115-1122.
- [16] TROADEC M B, WARD D M, LO E, et al. Induction of FPN1 transcription by MTF-1 reveals a role for ferroportin in transition metal efflux[J]. *Blood*, 2010, 116(22): 4657-4664.
- [17] DONOVAN A, BROWNLIE A, ZHOU Y, et al. Positional cloning of zebrafish *ferroportin1* identifies a conserved vertebrate iron exporter[J]. *Nature*, 2000, 403(6771): 776-781.
- [18] KAWABATA H, GERMAIN R S, VUONG P T, et al. Transferrin receptor 2- α supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and *in vivo*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(22): 16618-16625.
- [19] GIANNETTI A M, HALBROOKS P J, MASON A B, et al. The molecular mechanism for receptor-stimulated iron release from the plasma iron transport protein transferrin[J]. *Structure*, 2005, 13(11): 1613-1623.
- [20] WALLY J, HALBROOKS P J, VONRHEIN C, et al. The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(34): 24934-24944.
- [21] HARRISON P M, AROSIO P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1996, 1275(3): 161-203.
- [22] RENASSIA C, PEYSSONNAUX C. New insights into the links between hypoxia and iron homeostasis[J]. *Current Opinion in Hematology*, 2019, 26(3): 125-130.
- [23] LE N T V, RICHARDSON D R. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2002, 1603(1): 31-46.
- [24] COTRUVO J A JR, STUBBE J. Class I ribonucleotide reductases: metallocofactor assembly and repair in vitro and in vivo[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, 80(1): 733-767.
- [25] XU M M, WANG J, XIE J X. Regulation of iron metabolism by hypoxia-inducible factors[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2017, 69(5): 598-610.
- [26] VRTA ČNIK P, MARC J, OSTANEK B. Hypoxia mimetic deferoxamine influences the expression of histone acetylation- and DNA methylation-associated genes in osteoblasts[J]. *Connective Tissue Research*, 2015, 56(3): 228-235.
- [27] 杨梦思,周娜,王志钢,等. 转录因子 HIF-1 α 及其信号通路在疾病发生中的作用研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(8): 8-13.
- YANG M S, ZHOU N, WANG Z G, et al. Research progress on the role of transcription factor HIF-1 α and its signal pathway in the pathogenesis[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(8): 8-13.
- [28] JIANG B H, ZHENG J Z, LEUNG S W, et al. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(31): 19253-19260.
- [29] FUHRMANN D C, BRÜNE B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia[J]. *Redox Biology*, 2017, 12: 208-215.
- [30] KEHRER J P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity[J]. *Toxicology*, 2000, 149(1): 43-50.
- [31] RAY P D, HUANG B W, TSUJI Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling[J]. *Cellular Signalling*, 2012, 24(5): 981-990.
- [32] VAAHTERA L, BROSCHE M, WRZACZEK M, et al. Specificity in ROS signaling and transcript signatures[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 21(9): 1422-1441.
- [33] CROSS C E, HALLIWELL B, BORISH E T, et al. Oxygen radicals and human disease[J]. *Annals of Internal Medicine*, 1987, 107(4): 526-545.
- [34] DONG M, LIANG Y M, RAMALINGAM R, et al. Proteomic characterization of the interactions between fish serum proteins and waterborne bacteria reveals the suppression of

- anti-oxidative defense as a serum-mediated antimicrobial mechanism[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 62: 96-106.
- [35] SENA L A, CHANDEL N S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species[J]. *Molecular Cell*, 2012, 48(2): 158-167.
- [36] DU S N N, MAHALINGAM S, BOROWIEC B G, et al. Mitochondrial physiology and reactive oxygen species production are altered by hypoxia acclimation in killifish (*Fundulus heteroclitus*) [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2016, 219(8): 1130-1138.
- [37] LUSHCHAK V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 13-30.
- [38] LUSHCHAK V I, BAGNYUKOVA T V. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Percottus glenii*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 148(4): 390-397.
- [39] HORSCROFT J A, MURRAY A J. Skeletal muscle energy metabolism in environmental hypoxia: climbing towards consensus[J]. *Extreme Physiology & Medicine*, 2014, 3(1): 19.

Effect of iron on zebrafish liver cells under hypoxic stress

LI Genfang^{1,2,3}, HU Ruiqin^{1,2,3}, SONG Ruhao⁴, CHEN Liangbiao^{1,2,3}

(1. *International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 3. *National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 4. *College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*)

Abstract: Acute hypoxia in water has always been a thorny problem in aquaculture, and iron metabolism plays an important role in hypoxic stress in fish. To explore the effect of iron concentration on hypoxic stress in fish, Ammonium ferric citrate (FAC) and Deferoxamine (DFO) were used to supplement exogenous iron and remove endogenous and exogenous iron in ZFL cells, so as to compare the response of ZFL cells to hypoxic stress at different iron concentrations. The results showed that hypoxic stress significantly reduced the proliferation ability and survival rate of ZFL cells and the expression of iron metabolism-related genes, while supplementation of exogenous iron significantly enhanced the proliferation ability and survival rate of ZFL cells under hypoxic stress compared with the control group and the group of scavenging of endogenous and exogenous iron. Meanwhile, the mRNA expression levels of iron absorption (*tfa*), iron storage (*fhl27*, *fhl28*, *fhl31*) and iron output (*fpn*) were significantly increased, when ZFL cells under hypoxic stress were supplemented with exogenous iron. Furthermore, the detection of reactive oxygen species (ROS) levels in ZFL cells under hypoxic stress showed that supplemental exogenous iron could restore ROS levels in ZFL cells to a certain extent, indicating that the increase of intracellular ROS level in a certain range is beneficial to the resistance of ZFL cells to hypoxic stress. In conclusion, this study found that when ZFL cells were in acute hypoxia, supplemental exogenous iron ions could increase intracellular iron level, thus producing certain beneficial ROS and contributing to improving their survival rate in hypoxia environment.

Key words: hypoxic stress; zebrafish liver cells (ZFL); iron ions; ammonium ferric citrate (FAC); desferrioxamine (DFO); reactive oxygen species (ROS)