

# 鳊诺卡氏菌对大口黑鲈头肾巨噬细胞的侵染过程

刘文文<sup>1,2</sup>, 邓玉婷<sup>\*2,3</sup>, 朱雪晴<sup>1,2</sup>, 赵飞<sup>2</sup>, 谭爱萍<sup>2</sup>, 王芳<sup>2</sup>, 张美超<sup>1,2</sup>, 黄志斌<sup>2</sup>

1 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

2 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部渔用药物创制重点实验室 广东省水产动物免疫与绿色养殖重点实验室, 广东 广州 510380

3 农业农村部水产品质量安全控制重点实验室, 北京 100141

刘文文, 邓玉婷, 朱雪晴, 赵飞, 谭爱萍, 王芳, 张美超, 黄志斌. 鳊诺卡氏菌对大口黑鲈头肾巨噬细胞的侵染过程[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2602-2623.

LIU Wenwen, DENG Yuting, ZHU Xueqing, ZHAO Fei, TAN Aiping, WANG Fang, ZHANG Meichao, HUANG Zhibin. Infection process of primary macrophages derived from kidney of *Micropterus salmoides* by *Nocardia seriolae*[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2602-2623.

**摘要:**【背景】鱼类诺卡氏菌病潜伏期和病程较长, 感染率和死亡率较高, 给水产养殖业带来较大的经济损失, 其病原鳊诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)是胞内寄生菌, 侵入细胞后引起慢性感染是主要的致病机制。【目的】构建鳊诺卡氏菌侵染大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)头肾巨噬细胞体外模型, 观察鳊诺卡氏菌侵染巨噬细胞的过程并探究鳊诺卡氏菌对巨噬细胞的凋亡作用。【方法】采用密度梯度离心法分离巨噬细胞, 通过特异性染色和PCR扩增巨噬细胞表达基因 *mpeg1* 对细胞进行鉴定, 并通过CCK-8法和氧呼吸暴发活性测定检测巨噬细胞的活性; 通过倒置荧光显微镜和流式细胞术观察侵染过程中细菌与细胞的形态与数量变化; 通过双荧光流式细胞术检测、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放试验及线粒体膜电位检测, 探究鳊诺卡氏菌对巨噬细胞的凋亡作用。【结果】从大口黑鲈头肾分离获得纯度高的巨噬细胞, 经染色和PCR法鉴定为巨噬细胞; 筛选出最优的体外培养条件为1640培养基+1%青霉素链霉素+1%胎牛血清。在脂多糖刺激后, 巨噬细胞的氧呼吸暴发能力显著提高( $P < 0.05$ )。GFP-鳊诺卡氏菌侵染细胞2 h后细菌被细胞吞噬, 4 h细胞变圆且贴壁率降低, 6 h细菌大量繁殖并包围细胞, 8 h后细胞大量死亡。凋亡相关实验结果表明, 侵染初期巨噬细胞凋亡率增加, LDH释放增加, 线粒体膜电位下降; 随着侵染时间延长,

资助项目: 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2021SJ-XT3, 2020TD45, 2022GH04); 广东省自然科学基金(2020A1515011584)

This work was supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund of Chinese Academy of Fishery Sciences (2021SJ-XT3, 2020TD45, 2022GH04) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2020A1515011584).

\*Corresponding author. E-mail: dengyt@prfri.ac.cn

Received: 2022-09-10; Accepted: 2022-09-28; Published online: 2022-11-11

细胞凋亡率下降、LDH 释放量及线粒体膜电位下降减少, 说明鳊诺卡氏菌对巨噬细胞起先促进后抑制凋亡的作用。【结论】通过密度梯度离心法成功分离大口黑鲈头肾巨噬细胞, 并通过鳊诺卡氏菌侵染细胞后初步摸清鳊诺卡氏菌在细胞水平的致病机理, 建立了鳊诺卡氏菌侵染大口黑鲈头肾巨噬细胞的体外模型; 证实了鳊诺卡氏菌可侵染巨噬细胞并抑制细胞凋亡, 从而达到在巨噬细胞内存活, 为进一步开展鳊诺卡氏菌与巨噬细胞相互作用并阐明鳊诺卡氏菌的致病机制奠定了研究基础。

关键词: 大口黑鲈; 鳊诺卡氏菌; 巨噬细胞; 细胞凋亡

## Infection process of primary macrophages derived from kidney of *Micropterus salmoides* by *Nocardia seriolae*

LIU Wenwen<sup>1,2</sup>, DENG Yuting<sup>\*2,3</sup>, ZHU Xueqing<sup>1,2</sup>, ZHAO Fei<sup>2</sup>, TAN Aiping<sup>2</sup>, WANG Fang<sup>2</sup>, ZHANG Meichao<sup>1,2</sup>, HUANG Zhibin<sup>2</sup>

1 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Immunology and Sustainable Aquaculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China

3 Key Laboratory of Aquatic Product Quality and Safety Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100141, China

**Abstract:** [Background] Nocardiosis has a long incubation period and long disease duration, with high infection rate and mortality rate, which brings serious economic losses to aquaculture. *Nocardia seriolae*, the pathogen causing Nocardiosis, is an intracellular bacterium. The main pathogenesis of this disease is the chronic infection of *N. seriolae*. This pathogen invading largemouth bass (*Micropterus salmoides*) can cause white nodules, the products of the interaction between pathogen and macrophages. The bacteria are wrapped by necrotic cells in the white nodules, which make it difficult for antibiotic to kill the bacteria, resulting in death of fish. [Objective] To establish an *in vitro* model for the infection of largemouth bass head kidney macrophages by *N. seriolae*, observe the progression of infection, and elucidate the infection-induced apoptosis of macrophages. [Methods] The macrophages were isolated by density gradient centrifugation and identified by morphological observation, specific staining, and PCR amplification of macrophage-expressed gene *mpeg1*. The activity and function of macrophages were detected by CCK-8 method and oxygen respiratory burst activity assay. The morphological and quantitative changes of *N. seriolae* and macrophages during infection were observed via inverted fluorescence microscopy and flow cytometry. The apoptosis of macrophages was investigated by double fluorescence flow cytometry, lactate dehydrogenase (LDH) release assay, and mitochondrial membrane potential assay. [Results] High-purity macrophages were isolated from head kidney of largemouth bass and were identified as macrophages by staining and PCR methods. The medium was optimized as 1640 medium + 1% penicillin-streptomycin + 1% fetal bovine serum, in which the cells could survive for 72 h *in*

*vitro*, with the survival rate as high as 80%±1.03% within 24 h. The oxygen respiratory burst activity of macrophages enhanced after lipopolysaccharide stimulation ( $P<0.05$ ). The GFP-*N. seriolae* were phagocytosed by the macrophages at 2 h, became rounded with decreased adherence rate at 4 h, and proliferated and surrounded the macrophages at 6 h. A number of macrophages died at 8 h. The initial stage of infection witnessed the increase in the apoptosis rate of macrophages, the increase in the release of LDH, and the decrease in the mitochondrial membrane potential. With the prolongation of infection, the apoptosis rate, the amount of LDH released, and the mitochondrial membrane potential decreased. It implied that apoptosis was promoted in the initial of infection and then inhibited as the infection prolonged. **[Conclusion]** This study successfully established an *in vitro* model for the infection of largemouth bass head kidney macrophages by *N. seriolae*. It confirmed that *N. seriolae* infected and survived in macrophages by inhibiting apoptosis. This study provided information for further studying the interaction between *N. seriolae* and macrophages and elucidating the pathogenic mechanism of *N. seriolae*.

**Keywords:** *Micropterus salmoides*; *Nocardia seriolae*; macrophages; apoptosis

鱼类诺卡氏菌病(fish nocardiosis)是一种系统性的慢性肉芽肿疾病,是我国水产养殖业中常见细菌性病害之一。近年来鱼类诺卡氏菌病在中国、日本、韩国等国家和东南亚地区呈上升趋势,患病鱼的种类不断增加,已报道感染 42 种淡水鱼和海水鱼<sup>[1]</sup>。我国主要感染的品种为大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、乌斑杂交鳊[*Channa maculata*(♀)×*Channa argus*(♂)]、海鲈(*Lateolabrax japonicus*)和卵形鲳鲆(*Trachinotus ovatus*)等<sup>[1-2]</sup>。鳊诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)是引起鱼类诺卡氏菌病的主要病原菌,为革兰氏阳性丝状杆菌,属于放线菌目(*Actinomycetales*)诺卡氏菌科(*Nocardiaceae*)诺卡氏菌属(*Nocardia*)。诺卡氏菌病潜伏期和病程较长,感染率和死亡率较高,目前尚缺乏有效的治疗措施,给水产养殖业带来较大的经济损失<sup>[1]</sup>。鳊诺卡氏菌感染后会引起鱼体皮肤的亚急性炎症,肝、肾、脾、心等组织纤维化并形成白色结节,病理切片为界限清楚的肉芽肿结构,由坏死的组织碎片及中央被包围的细菌组成,外周还有上皮样细胞聚集<sup>[1]</sup>。本实验室前期研究

发现,鳊诺卡氏菌感染实验动物透明虎刺鱼(*Puntius tetrazona*)后通过血液循环到达靶器官,在靶器官固着增殖并被局部的巨噬细胞吞噬,激活巨噬细胞和机体的免疫反应,进而导致细胞凋亡和坏死<sup>[3]</sup>。巨噬细胞是鳊诺卡氏菌生存和繁殖的主要靶细胞,目前关于鳊诺卡氏菌对巨噬细胞的侵染机制及其与巨噬细胞相互作用的分子机制尚不清楚。

近年来,随着微生物学、细胞生物学和免疫学等的发展,关于胞内寄生菌与宿主作用机制的研究越来越受到广泛的重视<sup>[4]</sup>。巨噬细胞作为先天性免疫的重要组成部分,在抵御外界病原菌的过程中发挥重要作用,又是许多胞内寄生菌侵染的主要靶细胞。水产动物病原菌如迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)<sup>[5]</sup>、海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)<sup>[6]</sup>和鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)<sup>[7]</sup>等已被证实是胞内寄生菌,可入侵巨噬细胞并在胞内寄居和繁殖,但是关于胞内寄生菌侵染巨噬细胞及在巨噬细胞内的存活机制仍缺乏清晰的认识。研究发现,胞内寄生菌可通过呼吸道、消化道、皮肤黏膜

等不同途径侵入机体, 在与巨噬细胞相互作用中, 通过抑制细胞氧化杀伤和凋亡从而规避天然免疫机制, 维持自身的生存与繁殖, 并造成慢性感染<sup>[8]</sup>。凋亡在病原菌与宿主细胞相互作用中发挥着重要作用, 细菌侵染细胞后可引起细胞凋亡的发生, 进而抑制其生长和增殖; 然而胞内寄生菌为了在宿主细胞内生存, 通过调控信号抑制凋亡防止被胞内物质杀死, 同时利用凋亡促进自身在细胞间传播<sup>[9]</sup>。

大口黑鲈俗称加州鲈, 是我国重要的淡水养殖品种之一<sup>[10]</sup>。2020年全国鲈鱼的养殖产量为61.95万t, 2021年养殖产量增长到70.21万t, 是近年来养殖产量增长最快的品种之一<sup>[11]</sup>。广东省是大口黑鲈的主产区, 其2021年的养殖产量为36.86万t, 位居全国第一<sup>[11]</sup>。随着大口黑鲈养殖密度增加, 养殖过程中病害不断, 造成较大经济损失<sup>[12-13]</sup>。鳊诺卡氏菌是大口黑鲈诺卡氏菌病(俗称“结节病”)的主要病原。头肾作为大口黑鲈的重要免疫器官, 是巨噬细胞等免疫细胞的发源地<sup>[14]</sup>, 又是鳊诺卡氏菌侵染的主要靶器官。由于水生动物无商品化的巨噬细胞系, 为建立水生动物病原菌侵染巨噬细胞模型, 可通过组织分离和体外培养获取原代巨噬细胞。国外关于冷水鱼巨噬细胞的分离培养技术已趋于成熟, 如鲑科鱼类(*Salmonidae*)、大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)和金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)等<sup>[15-18]</sup>, 近几年国内也开始养殖鱼类巨噬细胞分离培养技术的探索<sup>[19-21]</sup>, 许多鱼类的巨噬细胞被成功分离, 主要开展了鱼类免疫学方面的研究<sup>[22-23]</sup>。目前关于大口黑鲈巨噬细胞的研究较少, 只有袁军法等<sup>[24]</sup>建立的大口黑鲈脑细胞系和 Zeng 等<sup>[25]</sup>建立的大口黑鲈心肌成纤维细胞系。本研究通过从大口黑鲈头肾分离原代巨噬细胞作为研究对象, 构建鳊诺卡氏菌侵染大口黑鲈头肾巨噬细胞体外模型, 以期初步探究

鳊诺卡氏菌在细胞水平的致病机制, 并为水产养殖业中诺卡氏菌病的防治奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验用大口黑鲈购自佛山市某养殖场, 平均体重为(250±10) g。在(25±1) °C的水温条件下于实验室暂养4周, 暂养期间正常喂食, 检查确认鱼体健康状况, 取体表无明显损伤、无寄生虫和病原菌感染的健康鱼为后续提取细胞做准备。

### 1.2 培养基、主要试剂和仪器

Percoll细胞分离液, Thermo公司; 1640培养基、DMEM (dulbecco's modification of eagle's medium dulbecco) (高糖)培养基和M199培养基, Biological Industries公司; LB培养基, 北京沃凯生物科技有限公司; L-15培养基, Gibco公司。RIPA裂解液、MS-222、胰蛋白酶消化液、青霉素-链霉素(双抗) (100×), 新赛美生物科技有限公司; 特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), Gibco公司; 台盼蓝染液, 北京索莱宝科技有限公司; 酸性 $\alpha$ -醋酸萘酚酯酶染色液、姬姆萨染液, 珠海贝索生物技术有限公司; 动物组织/细胞总RNA提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; Prime Script<sup>TM</sup> Reagent Kit with gDNA Eraser、2×Taq PCR Mix、大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 宝生物工程(大连)有限公司; CCK-8试剂盒, MCE公司; 佛波醇-12-十四酸酯-13-乙酸酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA), 上海麦克林生化科技有限公司; 氯化硝基四氮唑蓝(nitrotetrazolium blue chloride, NBT), 广州赛国生物科技有限公司; 氨苄西林, 北京佰凯生物科技有限公司; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 南京伟沃生物科技有限公司; Annexin V-m Cherry/SYTOX Green

细胞凋亡检测试剂盒、乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒及线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1),上海碧云天生物技术有限公司。

二氧化碳培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;多功能酶标仪, BioTek 公司;水平离心机,凯达科学仪器有限公司;倒置荧光显微镜, Zeiss 公司;流式细胞仪, Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 头肾巨噬细胞的分离和培养

#### 1.3.1 头肾巨噬细胞的分离

配制细胞清洗液、细胞培养液与细胞分离液。细胞清洗液为培养基[DMEM(高糖)、L-15 培养基、M199 培养基、1640 培养基]+2%双抗+100 ng/mL 肝素钠,细胞培养液为培养基+1%双抗+不同浓度的 FBS (1%、5%、10%、20%),细胞分离液 1、2 分别为 34%、51%的 Percoll 分离液。将实验鱼用 MS-222 麻醉后进行尾静脉放血,然后将鱼放入 75%酒精中浸泡 10–15 min。解剖鱼体后,将磨碎的头肾组织用细胞清洗液冲洗过滤 3–4 次,制成的细胞悬液放入冰盒中备用。

采用密度梯度离心法<sup>[26]</sup>分离巨噬细胞,在无菌硅化离心管中制备梯度界面,按照细胞分离液 1、分离液 2 与细胞悬液 1:1:1 (体积比)的比例顺序加入。将加好样的无菌硅化离心管于 4 °C、450×g 离心 30 min 后,将中间白色细胞层吸到另一个新的无菌硅化离心管,加入细胞清洗液混匀,250×g 离心 2 次,每次 10 min,清洗结束后倒掉细胞清洗液,重新加入新的细胞培养液重悬,分别加到 12 孔板,放置在细胞培养箱中培养。

#### 1.3.2 巨噬细胞培养条件的优化

选用 1640 培养基、L-15 培养基、DMEM (高糖)培养基及 M199 培养基,每种培养基分别用 1%、5%、10%和 20%这 4 个浓度的 FBS 摸索

适合大口黑鲈巨噬细胞生长的培养基和血清浓度。细胞放置在(28±1) °C 含 5% CO<sub>2</sub> 或无 CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱培养。用倒置荧光显微镜观察不同时间段(6、12、24、48、72 h)和不同培养条件下(上述 4 种培养基分别搭配 4 种浓度的血清在 24 孔板培养)的细胞生长状态,从而确定大口黑鲈巨噬细胞体外最佳培养条件。

### 1.4 头肾巨噬细胞的鉴定

#### 1.4.1 染色及形态学鉴定

采用台盼蓝染色、姬姆萨染色和非特异性酯酶染色 3 种方法对巨噬细胞进行形态学鉴定。将分离出的细胞置于 12 孔板在 28 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱过夜至细胞完全贴壁。吸掉细胞培养液,用 PBS 清洗细胞 2–3 遍。按照上述 3 种染色液说明书分别配制台盼蓝染色工作液、姬姆萨工作液及酸性 α-醋酸奈酚酯酶染色工作液,分别对细胞进行染色,室温自然干燥后镜检。

#### 1.4.2 分子生物学鉴定

根据 NCBI 数据库中大口黑鲈巨噬细胞的特异性表达基因(macrophage-expressed gene 1, *mpeg1*) 全长序列 (GenBank 登录号为 XM\_038703624)设计特异性引物(LU-mpeg F: 5'-CCAGAGTGCAAGTTCGTAACCTT-3'; LU-mpeg R: 5'-TTGTCATCGTCAAGTGTGTCAG-3')。将分离出的巨噬细胞体外培养一段时间,待细胞的贴壁率达到 80%时用胰蛋白酶消化后收集细胞,用动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,反转录为 cDNA 并以此为模板,用 LU-mpeg 引物对其进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×Taq PCR Mix 12.5 μL, 上游引物 F (10 μmol/L) 1.0 μL, 下游引物 R (10 μmol/L) 1.0 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR

产物切胶回收后与 PMD18-T 载体相连, 转入到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄西林的 LB 琼脂平板, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜后挑选阳性单克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序并在 NCBI 上进行序列比对。

## 1.5 大口黑鲈巨噬细胞的活性检测

### 1.5.1 CCK-8 检测巨噬细胞的活性

将培养好的巨噬细胞用胰蛋白酶消化下来制备成细胞悬液(实验组), 同时设置空白细胞培养液(对照组), 分别置于 96 孔细胞培养板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , (28 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中静置培养至细胞贴壁, 在 0、6、12、24、48 和 72 h 时分别加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 溶液。在培养箱避光孵育 3 h。使用多功能酶标仪测  $OD_{450}$ , 0 h 的细胞活性基于台盼蓝染色结果。细胞存活率计算公式:

$$\text{细胞存活率}(\%) = (\text{实验组 } OD_{450} - \text{对照组 } OD_{450}) / (0 \text{ h 的 } OD_{450} - \text{对照组 } OD_{450}) \times 100。$$

### 1.5.2 巨噬细胞氧呼吸暴发活性测定

将贴壁牢固的细胞用胰蛋白酶消化下来, 分别用 1640 完全培养基重悬(对照组)和含有 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 的 1640 完全培养基重悬(实验组), 将细胞浓度调整至  $2 \times 10^6$  个/mL, 接种至 96 孔细胞培养板, 接种量为 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 每组每个培养时间点重复 3 孔, 将 96 孔板于 (28 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱分别培养 6、12、24 和 36 h, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$ 、1  $\text{mg}/\text{mL}$  NBT (含 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMA), 置于培养箱 (28 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$  作用 1 h。然后, 每孔加入 120  $\mu\text{L}$  无水甲醇作用 15 min, 于 96 孔板水平式离心机 1 280 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 70% 甲醇溶液洗 3 次, 每孔再加入 120  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和 140  $\mu\text{L}$  2 mol/L KOH 溶液, 涡旋振荡 5 min, 生成蓝色沉淀, 使用多功能酶标仪测定  $OD_{620}$ 。实

验结果用每组 3 个重复孔的平均光密度值 ( $OD_{620}$  平均值 $\pm$ SD) 表示, 并对实验组和对照组的氧呼吸暴发活性进行统计学分析。

## 1.6 GFP-鲷诺卡氏菌侵染巨噬细胞荧光表征分析

将本实验室构建好的可表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的鲷诺卡氏菌复苏成功后在 (28 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱培养 3 d 至对数生长期, GFP-鲷诺卡氏菌在 (28 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养条件下, 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 100:1 (即 100 个细菌:1 个细胞) 的比例侵染巨噬细胞, 侵染时间分别设置 2、4 和 6 h 这 3 个组, 并设置空白对照组 (不加菌液的培养基)。侵染结束后, 在倒置荧光显微镜下观察巨噬细胞吞噬情况。

为进一步观察鲷诺卡氏菌进入巨噬细胞的情况, 通过流式细胞仪检测 GFP-鲷诺卡氏菌在不同时间侵染巨噬细胞的比例。GFP-鲷诺卡氏菌按上述方法侵染巨噬细胞后, PBS 洗涤细胞 2-3 遍, 加入胰蛋白酶消化细胞。收集细胞悬液至离心管, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入 70% 冷乙醇固定后用流式细胞仪检测, 激发波长为 488 nm, 每份样品检测细胞  $10^6$  个以上。所测数据使用流式细胞分析软件 FlowJo V10.0 分析处理, 比较流式细胞二维散点图, 左下象限为正常活细胞, 右下象限为带绿色荧光的巨噬细胞, 分析不同侵染时间下各象限细胞的比例变化。

## 1.7 鲷诺卡氏菌引起巨噬细胞凋亡检测

### 1.7.1 Annexin V-m Cherry/SYTOX Green 细胞凋亡检测

将消化好的细胞用 1640 完全培养基重悬, 控制细胞数量为  $1 \times 10^6$  个/mL, 加到 6 孔细胞培养板放置在 28  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养过夜至细胞完全贴壁。将稀释好的鲷诺卡氏菌菌液

按照 MOI=100:1 的比例侵染细胞, 侵染时间分别为 2、4、6 h。细菌侵染结束后, PBS 洗涤细胞 2–3 遍, 加入胰蛋白酶消化细胞。收集细胞液至离心管, 1 000×g 离心 5 min 弃上清。加入 194  $\mu\text{L}$  Annexin V-m Cherry Binding buffer 轻轻重悬细胞, 再加入 5  $\mu\text{L}$  红色荧光探针 Annexin V-m Cherry 和 1  $\mu\text{L}$  绿色荧光探针 SYTOX Green, 轻轻混匀。室温(20–25  $^{\circ}\text{C}$ )避光孵育 15 min, 随后置于冰浴中。处理后的细胞用流式细胞仪检测细胞凋亡与坏死情况。流式细胞仪激发波长为 488 nm, 所测数据使用流式细胞分析软件 FlowJo V10.0 分析处理, 通过比较流式细胞二维散点图, 左下象限显示为活细胞; 右上象限为坏死细胞; 右下象限为凋亡细胞, 分析不同侵染时间下各类细胞的比例变化。

### 1.7.2 乳酸脱氢酶细胞毒性检测

将消化好的细胞用完全培养基重悬, 调整细胞数量为  $1 \times 10^6$  个/mL, 接种至 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 培养过夜至细胞完全贴壁。将稀释好的菌液按照 MOI=100:1 的比例侵染细胞, 侵染时间分别为 2、4、6 h, 每个时间点设 3 个平行。细菌侵染结束后, 将细胞培养板置于水平离心机, 400×g 离心 5 min。分别取各孔上清液 120  $\mu\text{L}$ , 加入到另一个 96 孔板相应孔中, 然后分别加入 60  $\mu\text{L}$  乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测工作液。混匀后室温(约 25  $^{\circ}\text{C}$ )避光孵育 30 min, 使用多功能酶标仪测定其  $OD_{490}$ 。

### 1.7.3 线粒体膜电位检测

将消化好的细胞用 1640 完全培养基重悬, 调整细胞数量为  $1 \times 10^6$  个/mL, 接种至 6 孔板, 每孔 1 mL, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养过夜至细胞完全贴壁。将稀释好的菌液按照 MOI=100:1 的比例侵染细胞, 侵染时间分别为 2、4、6 h, 并设置空白对照组。细菌侵染结束后, PBS 清

洗细胞 2–3 遍, 加入胰蛋白酶消化细胞。收集细胞悬液至离心管, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。按照线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)说明书步骤操作, 在重悬细胞中加入 JC-1 探针。处理后的细胞用流式细胞仪检测细胞早期凋亡情况。所测数据使用流式细胞分析软件 FlowJo V10.0 分析处理, 通过比较流式细胞散点图, 左下象限显示为未嵌入探针的活细胞; 左上象限为线粒体膜电位升高红色荧光的细胞比例; 右下象限为线粒体膜电位下降绿色荧光的凋亡细胞, 分析不同侵染时间段各类细胞的比例变化<sup>[27]</sup>。

## 1.8 统计分析

所有实验数据经过 3 次独立实验的验证, 实验结果用 GraphPad Prism 7.0 和 SPSS18 统计软件处理数据, 组间比较采用单因素方差(ANOVA)统计分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 头肾巨噬细胞体外培养条件的优化结果

为确定大口黑鲈头肾巨噬细胞体外培养最适条件, 通过倒置显微镜观察不同培养基搭配不同血清浓度的细胞生长状态和计算不同培养条件下的细胞贴壁率来筛选最优培养条件。图 1 结果显示, 添加不同血清浓度的 1640 培养基条件下细胞贴壁率远高于其他 3 种培养基, 而且添加 1% FBS 时细胞体外培养 24 h 后贴壁率高达  $82.00\% \pm 1.07\%$ , 添加 5% 或 10% FBS 时贴壁率也在 60% 以上; 添加 5% FBS 的 L-15 培养基条件下巨噬细胞体外培养 24 h 后贴壁率也达到  $60.00\% \pm 1.01\%$ , 添加其他血清浓度的则较低; DMEM (高糖) 和 M199 培养基在添加不同血清浓度条件下细胞的贴壁率都低于 50%。

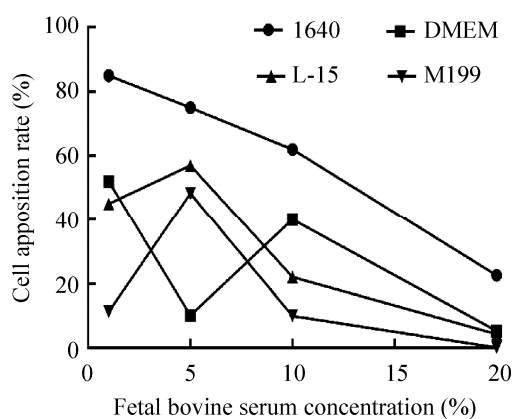


图 1 不同培养条件下巨噬细胞贴壁率  
Figure 1 Adhesion rate of macrophages under different culture conditions.

不同血清浓度对巨噬细胞的生长有一定影响,图 2 展示了添加不同血清浓度 1640 培养基培养 24 h 后巨噬细胞的生长形态:巨噬细胞在添加 1% FBS 的培养基上生长状态良好,伸出伪足明显,细胞贴壁牢固(图 2A);在添加 5% FBS 条件下贴壁率较低(图 2B);添加 10% FBS

和 20% FBS 条件下巨噬细胞贴壁数量较少,较多细胞悬浮在培养基中(图 2C、2D)。

图 3 展示了 4 种培养基添加最适血清浓度下的细胞形态:细胞在 1640+1% FBS 的完全培养基培养 24 h 后生长状态良好,贴壁牢固,形态发生变化,伸出伪足且细胞之间联系紧密(图 3A);在 L-15+5% FBS 的完全培养基且无 CO<sub>2</sub> 培养条件下细胞才能生长,在 24 h 之前细胞生长状态良好,大部分细胞具有巨噬细胞的特性且贴壁好成活率高(图 3B);在 DMEM (高糖)+5% FBS 的完全培养基培养 12 h 后细胞开始大量死亡,24 h 后全部死亡,细胞无法贴壁生长且细胞质皱缩、细胞变小(图 3C);在 M199+5% FBS 的完全培养基培养 24 h 内细胞生长较为缓慢,细胞较小且活性差(图 3D)。综合以上结果表明,大口黑鲈头肾巨噬细胞的体外最佳培养条件为:1640 培养基+1%双抗+1% FBS, (28±1) °C, 5% CO<sub>2</sub>。

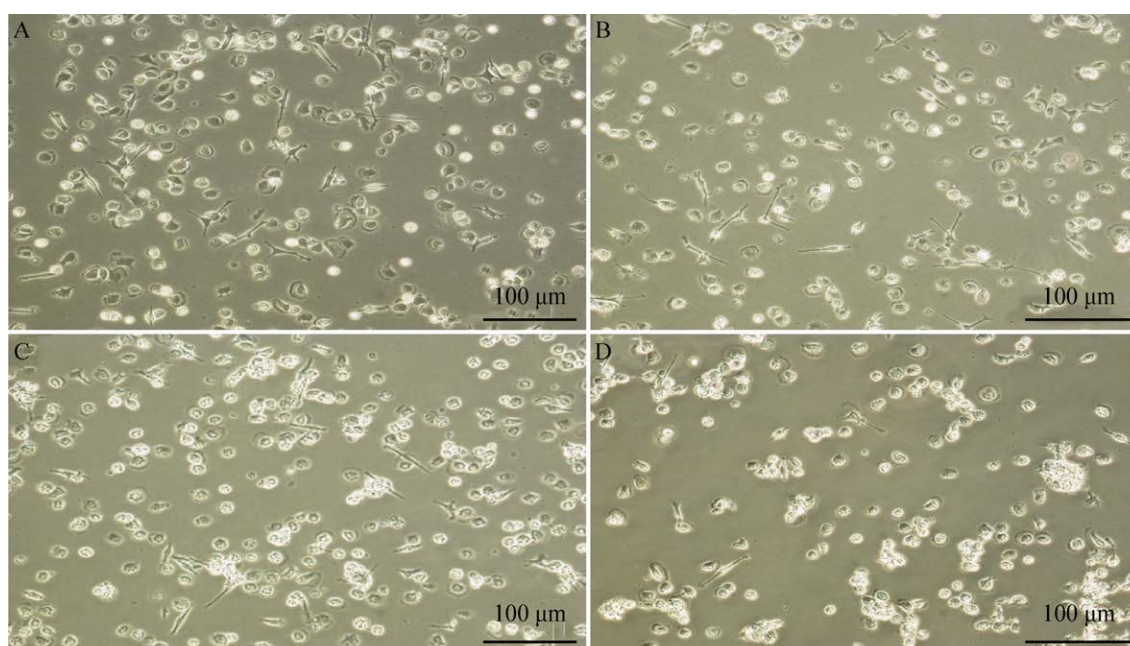
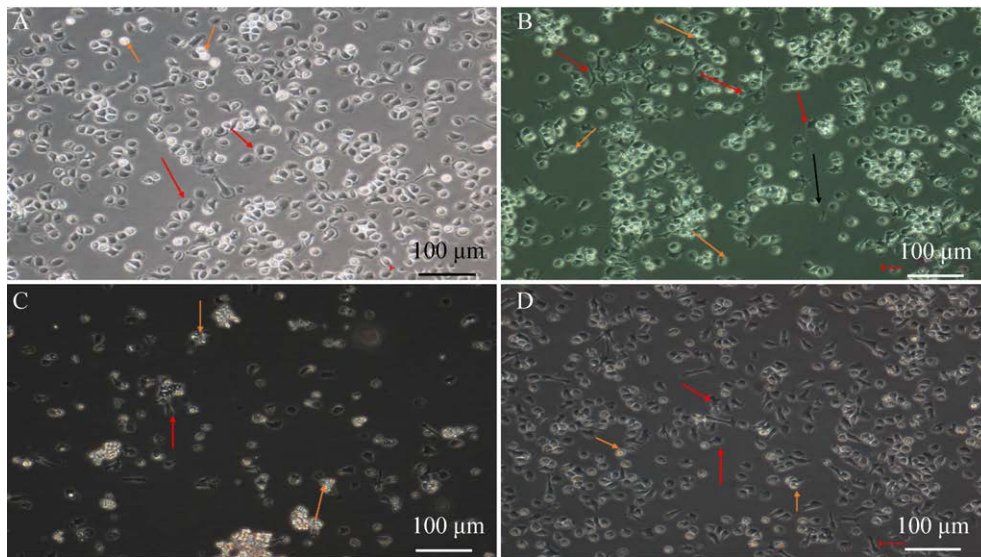


图 2 不同培养条件下巨噬细胞的生长状态(×200)  
Figure 2 Growth status of macrophages under different culture conditions (×200). A: 1640+1% FBS. B: 1640+5% FBS. C: 1640+10% FBS. D: 1640+20% FBS.





**图 3** 不同培养基巨噬细胞的生长状态(200×) A: 1640+1% FBS 完全培养基. B: L-15+5% FBS 完全培养基. C: DMEM (高糖)+5% FBS 完全培养基. D: M199+5% FBS 完全培养基. 红色箭头表示成活贴壁细胞, 橙色箭头表示死亡悬浮细胞

Figure 3 Photomicrograph of macrophages cultured in different types of media (200×). A: 1640+1% FBS complete medium. B: L-15+5% FBS complete medium. C: DMEM (high sugar)+5% FBS complete medium. D: M199+5% FBS complete medium. Red arrows indicate viable adherent cells; Orange arrows indicate dead suspension cells.

## 2.2 头肾巨噬细胞的鉴定结果

### 2.2.1 倒置显微镜下的巨噬细胞

大口黑鲈头肾分离纯化后的巨噬细胞在细胞板培养 48 h 至细胞完全贴壁, 倒置显微镜下观察可见巨噬细胞呈圆形或椭圆形, 甚至出现多角形态; 随着体外培养时间的增加, 大量巨噬细胞开始出现伪足, 细胞之间接触增加以维持更好的贴壁状态, 完全符合巨噬细胞的形态(图 4A)。

### 2.2.2 巨噬细胞不同染色鉴定

台盼蓝可以将死细胞染成蓝色, 而活细胞不着色, 以此检测巨噬细胞的活性。将分离出的巨噬细胞通过台盼蓝染色后发现, 大量巨噬细胞存活并且生长状态良好(图 4B)。巨噬细胞的姬姆萨染色结果显示细胞核被染成紫色, 较大且偏向一侧, 而胞浆则被染成蓝色(图 4C)。非特异性酯酶为巨噬细胞的特异性染料, 着色

后会出现强阳性反应, 倒置显微镜下可观察到巨噬细胞的整个细胞浆呈棕红色, 其染色后可直观地鉴别巨噬细胞(图 4D)。

### 2.2.3 巨噬细胞特异性基因 *mpeg1* 鉴定

取体外培养的巨噬细胞 cDNA 为模板 PCR 扩增 *mpeg1* 基因, 通过琼脂糖凝胶电泳确定基因条带大小为 926 bp, 与目的基因条带大小一致(图 5)。测序结果及比对分析显示此序列与大口黑鲈巨噬细胞 *mpeg1* 基因序列相似度高达 98% (图 6), 说明分离得到的巨噬细胞中表达了 *mpeg1* 基因。

## 2.3 巨噬细胞的活性检测结果

### 2.3.1 CCK-8 检测巨噬细胞的活性结果

在倒置显微镜下观察发现, 巨噬细胞在 24–48 h 生长状态良好, 体积增大并且有明显的延展性, 培养至 72 h 后细胞才开始出现贴壁状态变差甚至漂浮的现象(图 7)。通过 CCK-8

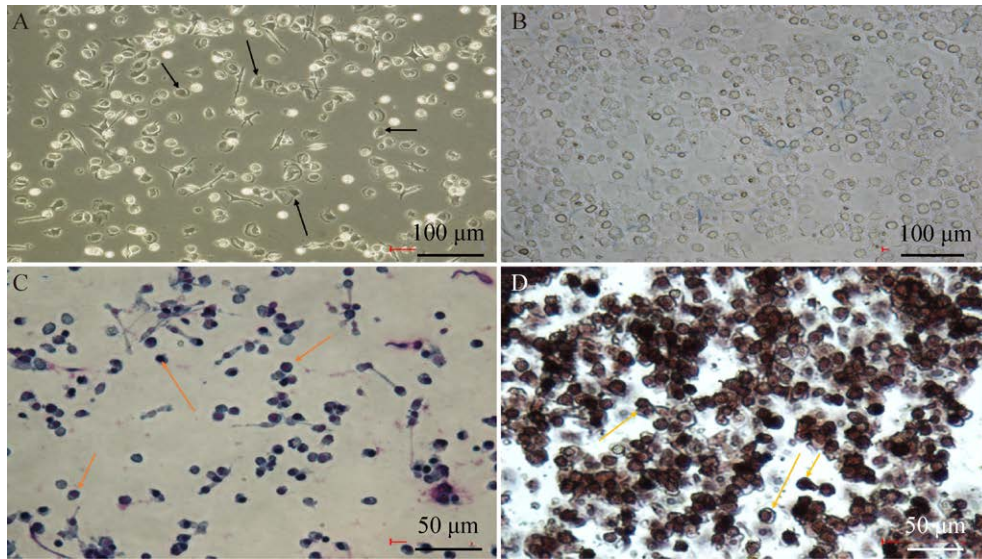


图 4 不同染色方法对大口黑鲈巨噬细胞的鉴定(200×) A: 倒置显微镜下贴壁巨噬细胞. B: 巨噬细胞的台盼蓝染色. C: 巨噬细胞的姬姆萨染色. D: 巨噬细胞的非特异性酯酶染色. 黑色箭头表示不同形态的巨噬细胞; 蓝色箭头表示死亡细胞; 橙色箭头表示姬姆萨染色后的巨噬细胞核; 黄色箭头表示非特异性酯酶染色下的巨噬细胞

Figure 4 Identification of primary macrophages derived from *Micropterus salmoides* using multiple staining method (200×). A: Morphology of macrophages under inverted microscope. B: Trypan blue staining. C: Giemsa staining. D: Non-specific esterase staining. The black arrows indicate different morphology of macrophages; The blue arrow indicates the dead cell; The orange arrows indicate that the nuclei of macrophages were stained with Giemsa solution; The yellow arrows indicate that the macrophages were stained with non-specific esterase staining solution.

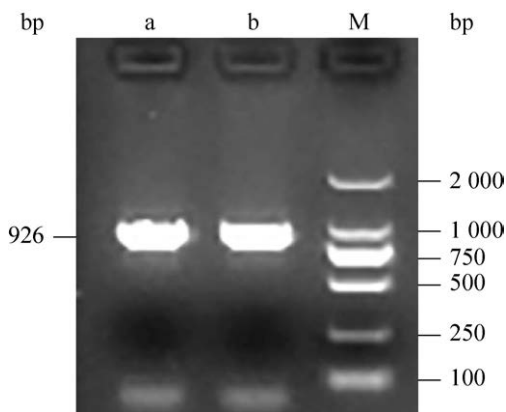


图 5 大口黑鲈头肾巨噬细胞 *mpeg1* 基因扩增结果 M: DL2000 DNA Marker; a、b: 原代巨噬细胞  
Figure 5 Amplification results of *mpeg1* gene in *Micropterus salmoides* head kidney macrophages. M: DL2000 DNA Marker; a, b: Primary macrophages.

试剂盒检测不同时间段巨噬细胞的活性, 结果发现 6-24 h 巨噬细胞的存活率始终保持在  $80.00\% \pm 1.03\%$ , 24-48 h 细胞存活率开始骤降, 最后到 72 h 细胞存活率降至  $20.00\% \pm 0.54\%$  (图 8)。在培养 24 h 后, 巨噬细胞在显微镜下观察的状态与用 CCK-8 检测的结果不太一致, 可能与 CCK-8 实验中巨噬细胞在 96 孔板生长空间受限、贴壁状态变差和培养基营养供给不够有关, 因此 CCK-8 检测的细胞的存活率低于显微镜下的观察。

### 2.3.2 巨噬细胞氧呼吸暴发活性测定结果

采用 NBT 法<sup>[20]</sup>用 LPS 刺激巨噬细胞, 通过多功能酶标仪分别检测不同时间段巨噬细胞的氧呼吸暴发活性, 实验结果表明, 巨噬细胞

<i>mpeg1</i> .seq	CCAGAGTGCAGTTCGTAACCTTCATCTACACAGTTAAGGCTTATCCGGACTTCACTCTGGACGCTCGCTTTGCTCAACA	79
XM_038703624.seq	CCAGAGTGCAGTTCGTAACCTTCATCTACACAGTTAAGGCTTATCCGGACTTCACTCTGGACGCTCGCTTTGCTCAACA	79
Consensus	ccagagtgcagttcgttaacttcattctacacagtttaaggcttatccggacttcaactctggacgctcgctttgctcaaca	
<i>mpeg1</i> .seq	AGCCAAAGAGATAGCTGATGCAATTGAAAACAACCAACAAGGAATGCAAACTATCTCTCAGAGAAGATGGTGTGGAC	158
XM_038703624.seq	AGCCAAAGAGATAGCTGATGCAATTGAAAACAACCAACAAGGAATGCAAACTATCTCTCAGAGAAGATGGTGTGGAC	158
Consensus	agccaaagagatagctgatgcaattgaaaacaaccaacaaggaatgcaaaactatctctcagagaagatgggtgtggac	
<i>mpeg1</i> .seq	TATGGAACCCATGTTATCACTAGTGTGATGCGGGGGCTACTTTGGTGCAGGAAGACTACCTCCGTTCCCTACATCGTGT	237
XM_038703624.seq	TATGGAACCCATGTTATCACTAGTGTGATGCGGGGGCTACTTTGGTGCAGGAAGACTACCTCCGTTCCCTACATCGTGT	237
Consensus	tatggaacccatgttatcactagtgtgatgcgggggctactttgggtgcaggaagactacctccgttccctacatcggtgt	
<i>mpeg1</i> .seq	CGGACAGTGTGGCAGAAAGTTCCTCAATCAAAGCACAGGCAGGGTTAAACTTTTTTGACAACTCAAGTTTGACATAAG	316
XM_038703624.seq	CGGACAGTGTGGCAGAAAGTTCCTCAATCAAAGCACAGGCAGGGTTAAACTTTTTTGACAACTCAAGTTTGACATAAG	316
Consensus	cggacagtgtggcagaaagtccctcaatcaaagcacaggcagggttaaactttttgacaaactcaagtttgacataag	
<i>mpeg1</i> .seq	CAGTCAAAGTCCCAACAGAGCTCATCACCITCAAACGTATCAGTCCAACATTCAGTACTCTCTTATCCAAAGCCACGGT	395
XM_038703624.seq	CAGTCAAAGTCCCAACAGAGCTCATCACCITCAAACGTATCAGTCCAACATTCAGTACTCTCTTATCCAAAGCCACGGT	395
Consensus	cagtcaaagtcccaacagagctcatcaccitcaaacgtatcagtccaacattcagtactctcttataccaaagccacggt	
<i>mpeg1</i> .seq	GGCGGCACACCTTTCTATCCTGGCATCACTCTGCAGAAGTGGCAGGAAAGTATCCAGGAACAACCTGGTGGCTATTGA	473
XM_038703624.seq	GGCGGCACACCTTTCTATCCTGGCATCACTCTGCAGAAGTGGCAGGAAAGTATCCAGGAACAACCTGGTGGCTATTGA	473
Consensus	ggcggcacacctttctatcctggcatcactctgcagaagtggcaggaaagta ccaggaacaacctgggtggcta ttga	
<i>mpeg1</i> .seq	TCGGTCAGGATTTCCCTGCACTACTTTATAAATACCAACACCTTCCCTGACCTGCCACACCTTACAGTTGGCAAA	552
XM_038703624.seq	TCGGTCAGGATTTCCCTGCACTACTTTATAAATACCAACACCTTCCCTGACCTGCCACACCTTACAGTTGGCAAA	549
Consensus	tccgtcaggatttccc tgcactactttataaataccaacaccttccct gacctgccaca cct tacagt tggcaaa	
<i>mpeg1</i> .seq	GTTGGCTGTTACAGTGAGTCAGGCCATAGAGCGCTACTAGCAGGTCAACATCCGCGCCTGGATGTGTCAACATCGACTC	631
XM_038703624.seq	GTTGGCTGTTACAGTGAGTCAGGCCATAGAGCGCTACTAGCAGGTCAACATCCGCGCCTGGATGTGTCAACATCGACTC	626
Consensus	gttggctgttacagtgagtcaggccatagagcgc tactagcaggtcaacatccgcgccctggatgtgtcaacatcgactc	
<i>mpeg1</i> .seq	CAAGGAACCTTTAACTTTCAAGCCAACGTTGATGATGCATCCTGTGAGGGCCCGCTACAAACCTTAGTTTTGGTGGTGT	710
XM_038703624.seq	CAAGGAACCTTTAACTTTCAAGCCAACGTTGATGATGCATCCTGTGAGGGCCCGCTACAAACCTTAGTTTTGGTGGTGT	704
Consensus	caa gaaactttaactttcaagccaacgttgatgatgcatacctgtgagggc ccgctacaaaaccttagttttgggtgggtgt	
<i>mpeg1</i> .seq	CTACCAGCAGTGATTTCCCTTAGCTCAGATGCAGGTCCCTATATGTGATGCCCTGGCCAGAAAAACCCGAAACAGGT	789
XM_038703624.seq	CTACCAGCAGTGATTTCCCTTAGCTCAGATGCAGGTCCCTATATGTGATGCCCTGGCCAGAAAAACCCGAAACAGGT	783
Consensus	ctaccagcagtgatttcccttagctcagatgcaggtccctatatgtgatgccctggccagaaaaacccgaaacaggt	
<i>mpeg1</i> .seq	GACTTCTCCTGTGGTCCGCCTTACTCCCCAATTTACTGAGGTGAGAAGAAAGACAGCAGGGTTACTACTAGTATGACT	868
XM_038703624.seq	GACTTCTCCTGTGGTCCGCCTTACTCCCCAATTTACTGAGGTGAGAAGAAAGACAGCAGGGTTACTACTAGTATGACT	862
Consensus	gacttctcctgtggtccgccttactcccccaatttactgaggtgagaagaaagacagcagggttactactagtatgact	
<i>mpeg1</i> .seq	GCTATGATGAAACCTACAGTTGCGGGTTTTCTTGGGTTTTTCGATTGTCATCGTCAAGTGTGTCA	932
XM_038703624.seq	GCTATGATGAAACCTACAGTTGCGGGTTTTCTTGGGTTTTTCGATTGTCATCGTCAAGTGTGTCA	926
Consensus	gctatgatgaaacctacagttgcggggtttcttgggtttttcggattgtcatcggtcaagtgtgtca	

图6 *mpeg1* 基因序列比对图Figure 6 *mpeg1* gene sequence alignment.

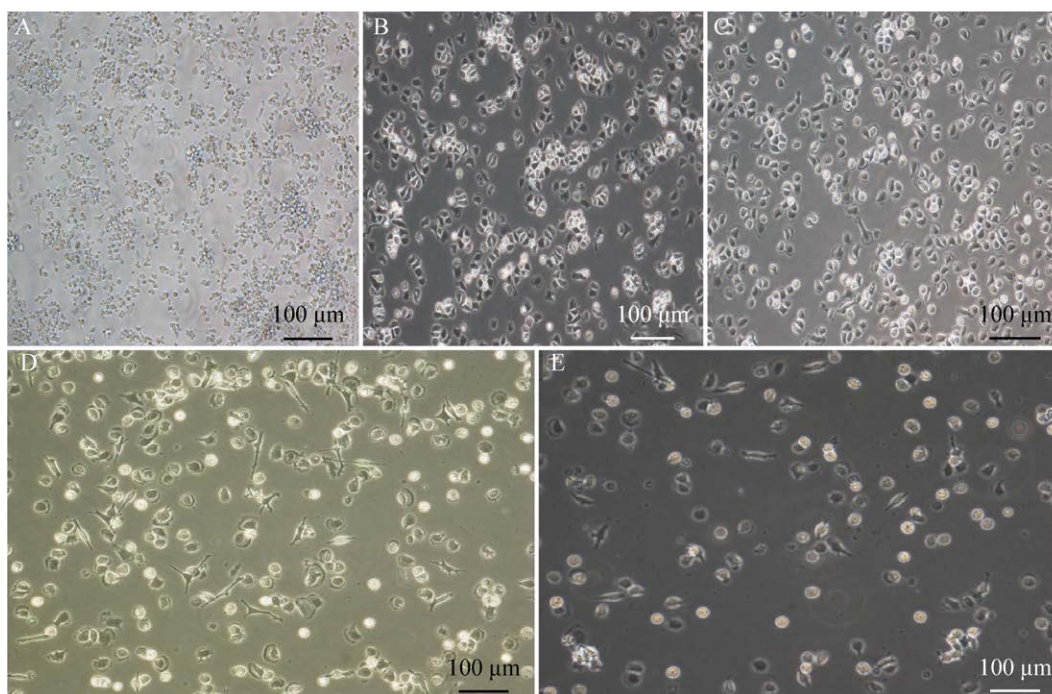


图 7 不同时间倒置显微镜下巨噬细胞生长状态(200×) A: 培养 6 h 的细胞. B: 培养 12 h 的细胞. C: 培养 24 h 的细胞. D: 培养 48 h 的细胞. E: 培养 72 h 的细胞

Figure 7 Photomicrograph of macrophages at different culture time (200×). A: 6 h of cell plating. B: 12 h of cell plating. C: 24 h of cell plating. D: 48 h of cell plating. E: 72 h of cell plating.

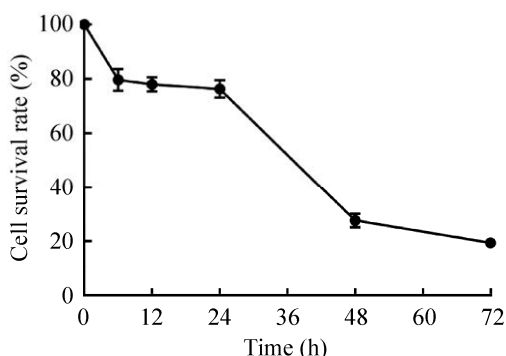


图 8 CCK-8 法检测头肾巨噬细胞在不同培养时间的细胞活性

Figure 8 Activity of macrophages derived from head kidney at different culture time determined by the CCK-8 method.

胞在不同时间段都能产生氧自由基但能力不尽相同。实验数据表明, 6–24 h 之间实验组的氧呼吸暴发活性显著高于对照组( $P < 0.05$ ) (图 9)。巨噬细胞在 LPS 刺激 12 h 后氧呼吸暴发活性最

高, 到 36 h 后实验组和刺激组的氧呼吸暴发无显著性差异。

#### 2.4 GFP-鲰诺卡氏菌侵染巨噬细胞结果

为观察鲰诺卡氏菌侵染大口黑鲈头肾巨噬细胞的过程, 本实验通过 GFP-鲰诺卡氏菌与巨噬细胞共孵育, 用倒置荧光显微镜观察不同侵染时间鲰诺卡氏菌和巨噬细胞形态和数量上的变化。未被细菌侵染的巨噬细胞贴壁状态良好, 细胞成活率高(图 10A); 共孵育 2 h 后, 巨噬细胞数量明显下降, 细胞贴壁率降低, 一部分荧光细菌黏附在细胞表面, 一部分细菌被细胞吞噬(图 10B); 共孵育 4 h 后, 细胞贴壁率和细胞成活率较前一阶段明显下降, 细胞形态变圆且黏附率降低, 大部分细菌聚集在巨噬细胞周围, 并被巨噬细胞吞噬(图 10C); 共孵育 6 h 后, 丝状杆状的菌体形态明显, 将巨噬细胞包围起来,

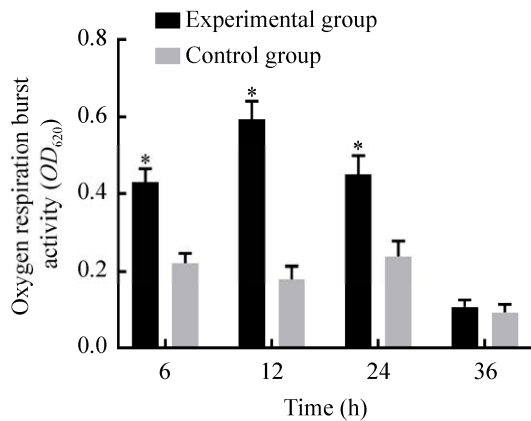


图9 不同时间段巨噬细胞的氧呼吸暴发活性  
Figure 9 Oxygen respiration burst activity of macrophages at different time periods. \*:  $P < 0.05$ .

被巨噬细胞吞噬的荧光菌明显增加(图 10D); 共孵育 8 h 以后, 巨噬细胞大量死亡。采用流式细胞仪检测不同时间段侵入巨噬细胞的细菌数, 共孵育 2 h 后已有鳕诺卡氏菌侵入巨噬细胞内, 但随着侵染时间的增加, 吞噬了荧光细菌的细胞比例逐渐减少, 可能与细胞大量死亡有关(图 11)。

## 2.5 鳕诺卡氏菌引起巨噬细胞凋亡

### 2.5.1 双荧光法检测细胞凋亡

为检测鳕诺卡氏菌引起巨噬细胞凋亡或坏死的情况, 采用双荧光凋亡试剂盒检测巨噬细胞的凋亡或坏死的细胞比例, 实验结果表明, 细菌侵染 2 h 后, 凋亡的细胞比例占 21.64%; 侵染 4 h 后, 凋亡细胞的比例有所下降, 为 20.42%; 侵染 6 h 后, 凋亡细胞的比例下降到 17.77%。随着侵染时间的增加, 细胞的坏死数量也逐渐增加; 未侵染组细胞只有个别检测到红绿荧光, 细胞的凋亡和坏死数量属于正常范围(图 12)。

### 2.5.2 乳酸脱氢酶检测结果

LDH 的释放量可间接反映细胞膜的受损程度<sup>[28]</sup>。图 13 结果显示, 侵染 2 h 后, 实验组的 LDH 释放高于对照组; 随着侵染时间的增加, 实验组的 LDH 释放始终高于对照组, 但总的释放量也随之下落。

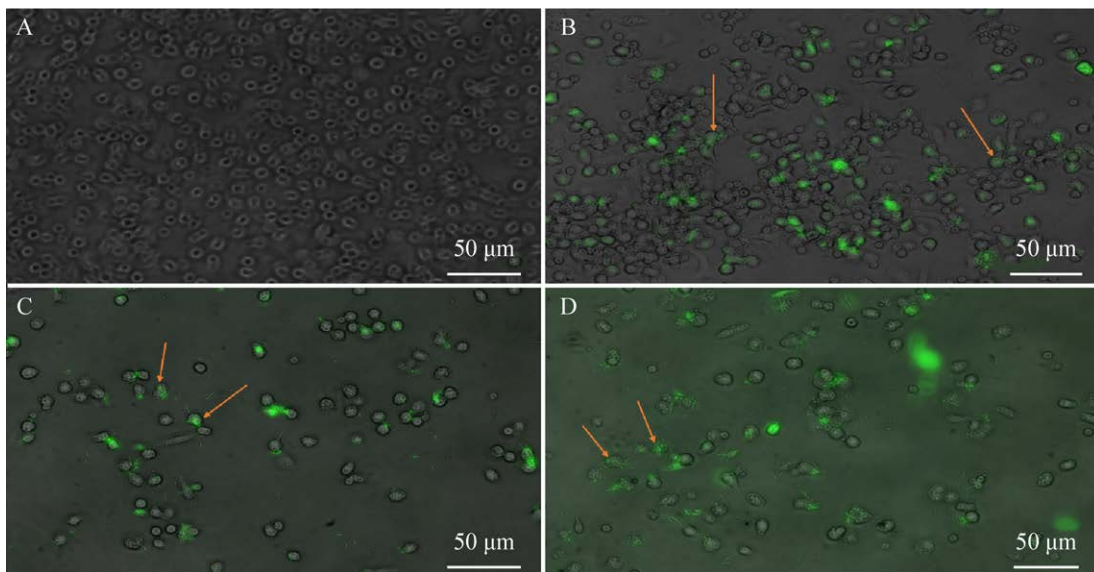


图 10 不同时间段巨噬细胞吞噬 GFP-鳕诺卡氏菌的情况( $\times 400$ ) A: 未侵染的巨噬细胞. B: 侵染 2 h. C: 侵染 4 h. D: 侵染 6 h. 橙色箭头表示巨噬细胞吞噬 GFP-鳕诺卡氏菌

Figure 10 Phagocytosis of macrophages incubated with GFP-*Nocardia seriolae* at different culture time ( $\times 400$ ). A: Uninfected macrophages. B: Infection for 2 h. C: Infection for 4 h. D: Infection for 6 h. The orange arrows indicate that GFP-*Nocardia seriolae* were phagocytosed by macrophages.

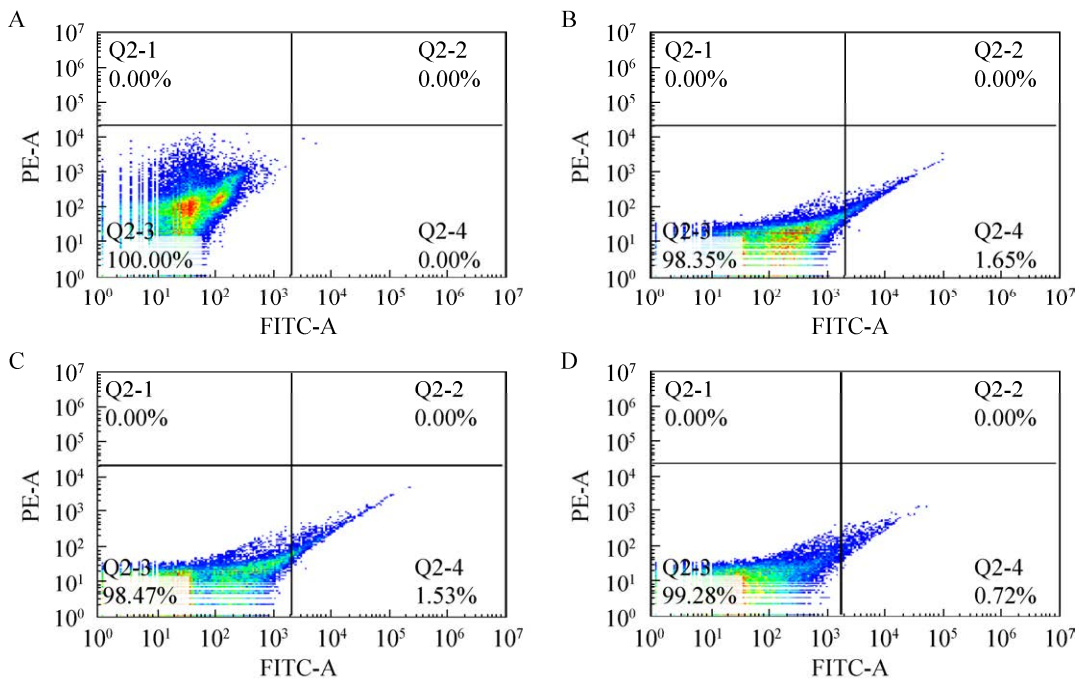


图 11 GFP-鲰诺卡氏菌侵染巨噬细胞的荧光表征分析 A: 对照组. B: 2 h. C: 4 h. D: 6 h

Figure 11 Fluorescence characterization analysis of GFP-*Nocardia seriolae*-infected macrophages. A: Control. B: 2 h. C: 4 h. D: 6 h.

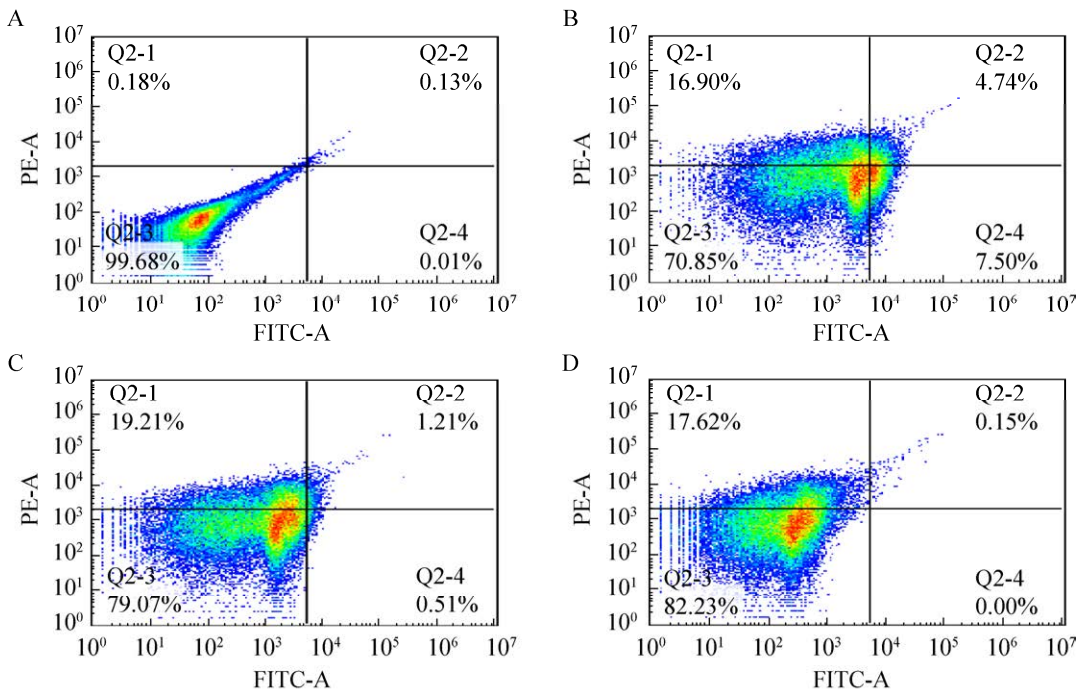


图 12 不同侵染时间段巨噬细胞凋亡与坏死情况 A: 对照组. B: 2 h. C: 4 h. D: 6 h

Figure 12 Apoptosis and necrosis of macrophages at different time periods after infection. A: Control. B: 2 h. C: 4 h. D: 6 h.

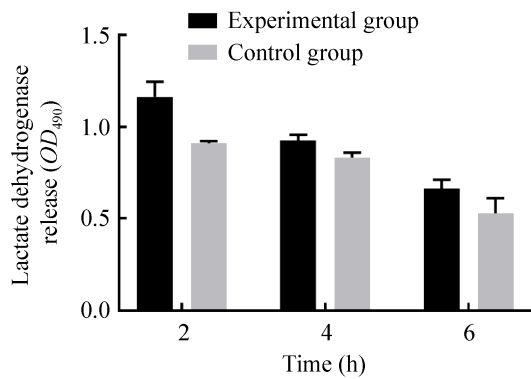


图 13 不同侵染时间段 LDH 释放量  
Figure 13 LDH release at different time periods after infection.

### 2.5.3 线粒体膜电位检测结果

线粒体膜电位的下降是细胞早期凋亡的指标之一<sup>[27]</sup>。通过流式细胞仪检测,结果显示,侵染 2 h 后,左上象限线粒体膜电位高的红色荧光细胞比例为 0.39%,右下象限线粒体膜电位降低带有绿色荧光的凋亡细胞占 3%;侵染 4 h 后,左上象限膜电位较高红色荧光细胞比例下降至 0.21%,右下象限膜电位下降的绿色凋亡细胞的比例下降到 1.58%,持续侵染到 6 h,凋亡细胞的比例下降到 1.42%;未侵染组细胞的凋亡数量处于正常范围(图 14)。

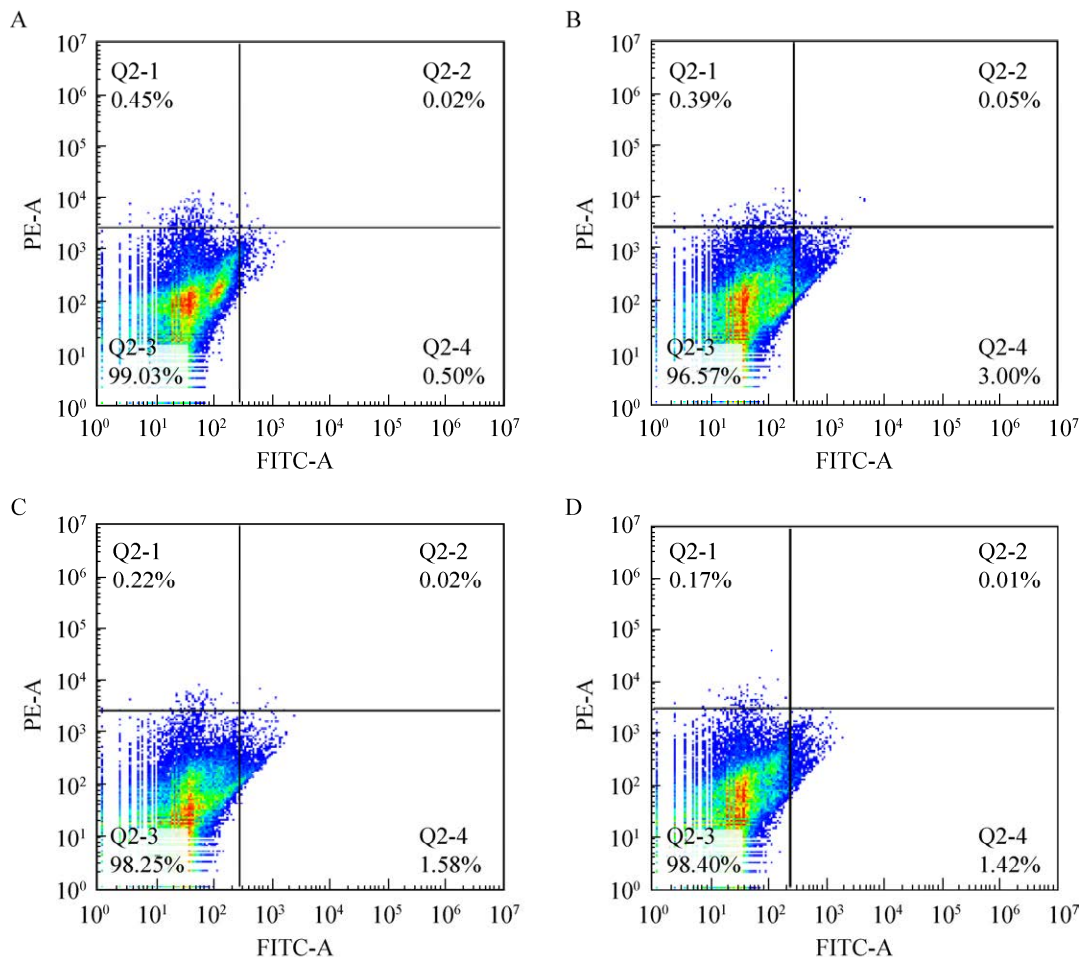


图 14 不同时间段线粒体膜电位检测 A: 对照组. B: 2 h. C: 4 h. D: 6 h  
Figure 14 Detection of mitochondrial membrane potential at different time periods. A: Control. B: 2 h. C: 4 h. D: 6 h.

### 3 讨论与结论

#### 3.1 大口黑鲈头肾巨噬细胞的分离与体外培养条件优化

巨噬细胞常用作病原学、免疫学、药理学等研究的体外侵染模型。正常机体几乎所有组织都含有巨噬细胞, 但不同物种、不同组织器官的巨噬细胞存在异质性, 在形态、表型、功能等方面也存在差异<sup>[29]</sup>。目前, 国内外已报道了多种鱼类组织巨噬细胞的分离及体外培养方法, 常见鱼类分离巨噬细胞的组织有肾、脾、肠、腹腔和外周血等<sup>[19,30-32]</sup>。巨噬细胞是不能繁殖的细胞群, 在适宜条件下可原代培养 3 d 至 3 周不等<sup>[19]</sup>。商品化的巨噬细胞只有哺乳动物的建有无限细胞系, 如小鼠巨噬细胞 RAW264.7、ANA-1 等, 这些细胞均能传代培养<sup>[26]</sup>。除了野鲮鱼(*Labeo niloticus*)<sup>[33]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus*)<sup>[34]</sup>、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[19]</sup>建立了巨噬细胞细胞系外, 大部分鱼类细胞免疫学研究中均使用原代巨噬细胞作为细胞材料。由于不同物种不同组织分离的巨噬细胞在体外生存条件不一样, 为了开展后续研究, 原代巨噬细胞体外培养条件的优化尤为重要。

在培养基选择上, 不同鱼类组织分离后的巨噬细胞, 适宜其体外生存的培养基以 1640 培养基和 L-15 培养基为主, 如香鱼(*Plecoglossus altivelis*)<sup>[35]</sup>头肾分离的、尼罗罗非鱼<sup>[19]</sup>腹腔分离的、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肠<sup>[20]</sup>分离的巨噬细胞最适培养基为 1640 培养基, 而团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)<sup>[23]</sup>、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[21]</sup>和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)<sup>[22]</sup>头肾分离的巨噬细胞最适培养基为 L-15 培养基。本实验中, 从大口黑鲈头肾分离的巨噬细胞分别在 4 种培养基培养后, 细胞在 1640 培养基中贴壁率高、细胞活性好、存活时间长。胎

牛血清作为原代细胞在体外生存的主要营养源, 其浓度的高低直接影响细胞的体外成活率。在不同血清浓度选择上, 不同鱼类组织分离的巨噬细胞也有差异, 如奥尼罗非鱼[奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)♂×尼罗罗非鱼♀]腹腔分离<sup>[36]</sup>的和草鱼肠分离<sup>[20]</sup>的巨噬细胞在添加了 10% FBS 和 5% 本品种鱼血清时生长最好, 金鱼(*Carassius auratus*)<sup>[37]</sup>、牙鲆<sup>[21]</sup>和大黄鱼<sup>[22]</sup>头肾分离的巨噬细胞在添加 5% FBS 的 L-15 培养基中生长最好, 斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)<sup>[38]</sup>头肾分离的巨噬细胞则在 2% FBS 的 L-15 培养基中生长最好。本实验中, 巨噬细胞在添加 1% FBS 的 1640 培养基或添加 5% FBS 的 L-15 培养基中比在其他培养基培养时生长好, 前者的贴壁率更高; 当 1640 培养基或 L-15 培养添加血清浓度为 10%或以上时巨噬细胞贴壁数量减少, 与牙鲆头肾分离巨噬细胞<sup>[21]</sup>的结果相似。以上结果表明, 巨噬细胞作为终末分化的细胞可能对血清营养的需求不及体细胞高, 鱼类体细胞体外培养需要添加 10%左右的 FBS<sup>[25]</sup>, 而已经终末分化的巨噬细胞则需要 5%或更低的血清浓度即可促进细胞生长。由于不同培养基的成分不一样, CO<sub>2</sub> 可能会影响培养基的 pH 值, 对细胞的生长有很大的影响, 本研究发现, L-15 培养基在无 CO<sub>2</sub> 的条件下细胞能更好地贴壁, 而其他 3 种培养基在有 CO<sub>2</sub> 的条件下细胞生长状态更好。细胞培养温度则与鱼类适宜生长温度保持一致。综合比较各种条件, 筛选出大口黑鲈头肾巨噬细胞的体外最佳培养条件为 1640 培养基+1%双抗+1% FBS、(28±1) °C、5% CO<sub>2</sub>, 细胞体外生存可达 72 h, 细胞纯度在 85%左右, 可满足后期实验需求。

#### 3.2 大口黑鲈头肾巨噬细胞的鉴定与活性检测

在硬骨鱼中, 虽然很多种物种中已发现了



单核/巨噬细胞, 由于单核细胞和巨噬细胞有相似的特征, 因此需要通过形态学、吞噬功能等方法对分离的巨噬细胞进行鉴定<sup>[39]</sup>。巨噬细胞的常规鉴定主要通过染色观察其形态特征, 包括姬姆萨染色和非特异性酯酶染色等<sup>[30,40]</sup>。本研究将巨噬细胞培养至完全贴壁的状态, 用姬姆萨染液快速染色, 可观察到巨噬细胞呈圆形、椭圆形、不规则形状, 伸出伪足明显, 细胞核呈紫色较大且偏向一侧, 胞浆呈蓝色, 与草鱼、牙鲮、鲫(*Carassius auratus*)等巨噬细胞形态保持一致<sup>[19,21,32]</sup>。成熟的巨噬细胞大致可以分为3个亚群: R1、R2和R3型巨噬细胞<sup>[40-41]</sup>。R1型巨噬细胞含有酸性磷酸酶, 但是缺乏过氧化物酶和非特异性酯酶。R2型巨噬细胞类似于哺乳动物的成熟组织巨噬细胞, 对非特异性酯酶呈阳性反应<sup>[42]</sup>。基于此, 本研究对巨噬细胞进行非特异性酯酶染色发现, 巨噬细胞着色后出现强阳性反应, 整个细胞呈现棕红色, 这与鲫鱼巨噬细胞的染色结果<sup>[32]</sup>一致。本研究通过各种染色方法可确定大口黑鲈头肾巨噬细胞具有相应的形态学特征。鱼类巨噬细胞在基因水平方面的鉴定也已经趋于成熟, 巨噬细胞表达基因(*mpeg1*)被认为是人和小鼠巨噬细胞中特有的表达基因<sup>[43]</sup>, 随后在其他哺乳类动物<sup>[44]</sup>和斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[45]</sup>的巨噬细胞鉴定中被用作巨噬细胞谱系的标记基因。王宣刚等<sup>[21]</sup>通过设计牙鲮 *mpeg1* 基因特异性引物, 在分离的细胞中成功扩增出该基因, 并且牙鲮淋巴细胞、鳃细胞和卵巢细胞作为阴性对照并未扩增, 说明 *mpeg1* 基因为巨噬细胞特有的标记性基因。本研究根据大口黑鲈 *mpeg1* 基因设计特异性引物, 通过 PCR 扩增与测序比对, 该序列与大口黑鲈 *mpeg1* 基因序列相似度高达 98%, 通过分子方法进一步对分离的巨噬细胞进行

了鉴定。

为验证体外培养条件下头肾巨噬细胞的活性与功能, 本研究采用了 CCK-8 活性检测及氧呼吸暴发活性测定。常藕琴等<sup>[46]</sup>通过 CCK-8 法检测草鱼中性粒细胞的活性, 结果显示在体外培养 24 h 的细胞存活率最高, 达 89.91%±3.56%, 细胞活力随培养时间的延长呈下降趋势, 72 h 下降至 29.69%±1.64%。本实验结果与常藕琴等<sup>[46]</sup>的相似, 在 6–24 h 巨噬细胞的存活率始终保持在 80%左右, 24–48 h 细胞存活率开始骤降, 最后到 72 h 细胞存活率降至 20%左右。巨噬细胞在显微镜下的状态与用 CCK-8 检测的结果不太一致, 可能与细胞在 96 孔板生长空间受限、贴壁状态变差和培养基营养供给不够有关, 因此 CCK-8 检测的细胞存活率低于显微镜下的观察。巨噬细胞杀灭病原菌的主要机制是通过活性氧来抑制病原菌的存活, 因此可通过外源物 LPS 刺激巨噬细胞后检测巨噬细胞氧呼吸暴发活性, 从而了解巨噬细胞产生氧自由基的能力。本研究分离的巨噬细胞在 LPS 的刺激下检测不同时间段氧呼吸暴发活性, LPS 刺激 12 h 后氧呼吸暴发活性最高, 与陶会竹等<sup>[20]</sup>分离的草鱼肠巨噬细胞氧呼吸暴发活性检测结果相似, 但在 36 h 后实验组和对照组无显著差异, 可能是因为 96 孔板中培养基的营养耗尽, 不足以维持巨噬细胞体外生存, 致使细胞大量死亡, 外源刺激物无法对细胞起作用。

### 3.3 鳊诺卡氏菌侵染大口黑鲈头肾巨噬细胞过程及对细胞凋亡的作用

本实验通过 GFP-鳊诺卡氏菌与巨噬细胞共孵育, 用倒置荧光显微镜和流式细胞术观察鳊诺卡氏菌侵染巨噬细胞的过程。通过倒置荧光显微镜下观察细菌与细胞之间的状态与位置来判断巨噬细胞吞噬细菌的情况。巨噬细胞未

被细菌侵染前细胞成活率高、细胞状态良好而且贴壁率高; 细菌侵染巨噬细胞后, 一部分细菌聚集在巨噬细胞周围; 另一部分被巨噬细胞吞噬; 随着侵染时间的增加, 巨噬细胞逐渐死亡, 与前期实验室 Wang 等<sup>[3]</sup>用 GFP-鳊诺卡氏菌侵染实验鱼, 在实验鱼体内观察到巨噬细胞吞噬细菌的现象一致, 也与刘春等<sup>[47]</sup>建立的 GFP-爱德华菌侵染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的实验结果类似。本实验通过流式细胞术, 进一步验证了巨噬细胞吞噬了 GFP-鳊诺卡氏菌, 说明鳊诺卡氏菌具有胞内寄生菌的特征, 并且与巨噬细胞存在相互作用关系。水产动物病原菌如迟缓爱德华氏菌<sup>[5]</sup>、海分枝杆菌<sup>[6]</sup>和鲁氏耶尔森菌<sup>[7]</sup>等已证实是胞内寄生菌, 可入侵巨噬细胞并在胞内寄居和繁殖。迟缓爱德华菌与布鲁氏菌在巨噬细胞中的生存方式相似, 具体表现为少数的细菌能够避免溶酶体的融合作用, 并重新将其贩运到最终的复制位点, 而大多数细菌会在巨噬细胞的吞噬溶酶体内被破坏<sup>[48]</sup>。耶尔森菌在入侵巨噬细胞后会被封存在巨噬细胞的间隔内, 不会与初级溶酶体融合。随着侵染时间的增加, 细菌会在细胞间隔中进行自我复制, 从而达到持续侵染细胞的作用<sup>[7]</sup>。

凋亡是细胞的一种程序性死亡, 当机体受到细菌等病原体刺激时, 作为对病原体天然免疫反应的形式之一, 机体就会发出特定的信号使正常细胞以特定的途径发生凋亡。但是胞内寄生菌对巨噬细胞凋亡存在两个方面的影响, 既能诱导细胞凋亡, 也能抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>。秦蕾等<sup>[49]</sup>用不同毒力的迟缓爱德华氏菌侵染大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 头肾巨噬细胞, 强毒株能显著抑制巨噬细胞凋亡。本研究通过双荧光试剂盒检测到巨噬细胞在 2 h 出现凋亡, 并且随着侵染时间的增加, 巨噬细胞的凋亡率出现下降, 细胞的坏死率上升, 推测在侵染初期,

鳊诺卡氏菌主要促进细胞凋亡, 到 4 h 后, 鳊诺卡氏菌为了在巨噬细胞内存活从而产生抑制凋亡作用。LDH 的释放和线粒体膜电位的下降都属于细胞凋亡的表现<sup>[50]</sup>, LDH 的释放可间接反映细胞凋亡过程中细胞膜的损伤程度。线粒体作为巨噬细胞中重要的细胞器, 参与细胞的多种代谢反应。当线粒体的呼吸链受到抑制时, 跨膜电位就会发生改变, 细胞色素 C 和多种凋亡诱导因子的释放会引起细胞凋亡的级联反应, 从而导致细胞凋亡<sup>[51]</sup>。本研究结果显示 LDH 的释放量以及线粒体膜电位均随着侵染时间的延长逐渐减少, 与双荧光法流式细胞术检测实验结果相吻合, 进一步证实了鳊诺卡氏菌在侵染中期起到了抑制凋亡的作用。本研究通过检测鳊诺卡氏菌侵染后不同时间段巨噬细胞的凋亡数量, 发现凋亡的细胞数量随着侵染时间的延长先出现增加后呈现下降, 表现出对巨噬细胞的凋亡有调控作用, 这与结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)<sup>[52]</sup>、布鲁氏菌 (*Brucella*)<sup>[53]</sup>、海分枝杆菌<sup>[6]</sup>、单核细胞李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)<sup>[54]</sup> 等胞内寄生菌对巨噬细胞凋亡作用的结果相似。但与上述胞内菌采用稳定的商品化小鼠巨噬细胞 RAW264.7 构建侵染模型不同, 本研究使用的是鱼类的原代巨噬细胞, 对鳊诺卡氏菌的刺激异常敏感, 随着细菌侵染的时间增加, 细胞容易大量死亡, 对侵染过程中侵染细胞的获取有一定影响。

综上所述, 本研究通过分离大口黑鲈头肾巨噬细胞, 成功建立了鳊诺卡氏菌侵染鱼类巨噬细胞的模型; 证实了鳊诺卡氏菌可侵染巨噬细胞并通过抑制细胞凋亡从而达到在巨噬细胞内存活的目的, 本研究为进一步开展鳊诺卡氏菌与巨噬细胞相互作用、阐明鳊诺卡氏菌的致病机制奠定了研究基础。

## REFERENCES

- [1] LIU YS, CHEN GQ, XIA LQ, LU YS. A review on the pathogenic bacterium *Nocardia seriolae*: aetiology, pathogenesis, diagnosis and vaccine development[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2022: 1-21.
- [2] 罗愿, 邓玉婷, 赵飞, 谭爱萍, 张美超, 姜兰. 9株鱼源鳟诺卡氏菌生物学特征和致病性比较[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(8): 2733-2749.
- LUO Y, DENG YT, ZHAO F, TAN AP, ZHANG MC, JIANG L. Comparative on characteristics and pathogenicity of *Nocardia seriolae* isoalted from 9 fishes[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(8): 2733-2749 (in Chinese).
- [3] WANG F, WANG XG, LIU C, CHANG OQ, FENG YY, JIANG L, LI KB. Transparent Tiger barb *Puntius tetrazona*, a fish model for *in vivo* analysis of nocardial infection[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 211: 67-73.
- [4] 赵江丽, 陈宣男, 姜铮, 王芳, 袁静, 甄清. 病原微生物胞内寄生机制的研究进展[J]. *中国热带医学*, 2011, 11(1): 119-122.
- ZHAO JL, CHEN XN, JIANG Z, WANG F, YUAN J, ZHEN Q. Advance in the research of intracellular parasitic mechanism of pathogenic microorganisms[J]. *China Tropical Medicine*, 2011, 11(1): 119-122 (in Chinese).
- [5] LEUNG KY, SIAME BA, TENKINK BJ, NOORT RJ, MOK YK. *Edwardsiella tarda*-virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen[J]. *Microbes and Infection*, 2012, 14(1): 26-34.
- [6] DAVIS JM, RAMAKRISHNAN L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection[J]. *Cell*, 2009, 136(1): 37-49.
- [7] RYCKAERT J, BOSSIER P, D'HERDE K, DIEZ-FRAILE A, SORGELOOS P, HAESBROUCK F, PASMANS F. Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(4): 648-655.
- [8] BEHAR SM, BRIKEN V. Apoptosis inhibition by intracellular bacteria and its consequence on host immunity[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2019, 60: 103-110.
- [9] 吴移谋, 王建业. 胞内寄生菌与宿主细胞凋亡的相互作用分子机制研究[J]. *中南医学科学杂志*, 2021, 49(3): 249-252.
- WU YM, WANG JY. Advances in molecular mechanisms of the interaction between intracellular pathogens and host cell apoptosis[J]. *Medical Science Journal of Central South China*, 2021, 49(3): 249-252 (in Chinese).
- [10] 杨超, 董浚键, 刘志刚, 孙成飞, 赵飞, 叶星. 大口黑鲈源维氏气单胞菌的分离鉴定[J]. *南方水产科学*, 2021, 17(3): 54-61.
- YANG C, DONG JJ, LIU ZG, SUN CF, ZHAO F, YE X. Isolation and identification of *Aeromonas veronii* from diseased *Micropterus salmoides*[J]. *South China Fisheries Science*, 2021, 17(3): 54-61 (in Chinese).
- [11] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2022中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2022 China Fishery Statistics Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022 (in Chinese).
- [12] BAI JJ, LUTZ-CARRILLO DJ, QUAN YC, LIANG SX. Taxonomic status and genetic diversity of cultured largemouth bass *Micropterus salmoides* in China[J]. *Aquaculture*, 2008, 278(1/2/3/4): 27-30.
- [13] 张晗, 邓捷, 马红英, 赵虎, 吴艳, 王启军, 张红星, 孔飞. 大口黑鲈相关疾病及防治技术研究进展[J]. *河北渔业*, 2022(2): 38-44.
- ZHANG H, DENG J, MA HY, ZHAO H, WU Y, WANG QJ, ZHANG HX, KONG F. Research progress on related diseases and control techniques of largemouth bass[J]. *Hebei Fisheries*, 2022(2): 38-44 (in Chinese).
- [14] DOCKRELL HM. Immunology: a comparative approach[J]. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995, 89(3): 343-344
- [15] BRAUN-NESJE R, KAPLAN G, SELJELID R. Rainbow trout macrophages *in vitro*: morphology and phagocytic activity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1982, 6(2): 281-291.
- [16] TELES M, MACKENZIE S, BOLTAÑA S, CALLOL A, TORT L. Gene expression and TNF-alpha secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 340-346.
- [17] MACKENZIE S, PLANAS JV, GOETZ FW. LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and *in vitro* differentiated macrophages[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003, 27(5): 393-400.

- [18] NOWAK BF, DANG M, WEBBER C, NEUMANN L, BRIDLE A, BERMUDEZ R, EVANS D. Changes in the splenic melanomacrophage centre surface area in southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) are associated with blood fluke infections[J]. Pathogens: Basel, Switzerland, 2021, 10(1): 79.
- [19] 张永德, 潘传燕, 余艳玲, 冯鹏霏, 罗洪林. 永生化的尼罗罗非鱼巨噬细胞系的建立及鉴定[J]. 水产学报, 2018, 42(3): 376-387.
- ZHANG YD, PAN CY, YU YL, FENG PF, LUO HL. Establishment and identification of immortalized macrophage cell line of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(3): 376-387 (in Chinese).
- [20] 陶会竹, 肖宁, 赵雨婷, 房慧, 李槿年. 草鱼肠巨噬细胞的分离培养与鉴定[J]. 水产学报, 2018, 42(10): 1606-1614.
- TAO HZ, XIAO N, ZHAO YT, FANG H, LI JN. Isolation, cultivation and identification of *Ctenopharyngodon idella* intestinal macrophages[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(10): 1606-1614 (in Chinese).
- [21] 王宣刚, 孔祥福, 王欣桐, 李恒顺, 刘金相, 王志刚, 于海洋. 牙鲆头肾巨噬细胞的分离培养与鉴定[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 55-61.
- WANG XG, KONG XF, WANG XT, LI HS, LIU JX, WANG ZG, YU HY. Isolation, culture, and characterization of macrophages from the head kidney of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 55-61 (in Chinese).
- [22] 李庆飞, 崔坤, 艾庆辉, 麦康森. 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[J]. 水产学报, 2019, 43(4): 810-819.
- LI QF, CUI K, AI QH, MAI KS. Effects of culture temperature on antioxidant capacity and inflammatory responses of LPS-induced macrophages from head kidney of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(4): 810-819 (in Chinese).
- [23] 郝明君, 刘立春, 张涓, 汤孝成, 刘小玲, 林鑫. 3种壳聚糖对团头鲂体外头肾吞噬细胞呼吸爆发功能的影响[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(3): 72-77.
- XI MJ, LIU LC, ZHANG J, TANG XC, LIU XL, LIN L. Effect of three chitosan on respiratory burst activity of head-kidney phagocytes in Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(3): 72-77 (in Chinese).
- [24] 袁军法, 戴彩蛟, 余利, 李莉娟. 一种大口黑鲈脑细胞系及其应用: CN113025574A[P]. 2022-07-26.
- YUAN JF, DAI CJ, YU L, LI LJ. *Micropterus salmoides* brain cell line and application thereof: CN113025574A[P]. 2022-07-26 (in Chinese).
- [25] ZENG WW, DONG HX, CHEN XY, BERGMANN SM, YANG Y, WEI XX, TONG GX, LI H, YU H, CHEN YF. Establishment and characterization of a permanent heart cell line from largemouth bass *Micropterus salmoides* and its application to fish virology and immunology[J]. Aquaculture, 2022, 547: 737427.
- [26] 许丹, 律颖, 朱小语, 陈晓文, 冯金秋, 范爱琴, 许雅君. 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW<sub>264.7</sub>)的培养及其在诱导破骨细胞中的应用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(10): 1355-1360.
- XU D, LÜ Y, ZHU XY, CHEN XW, FENG JQ, FAN AQ, XU YJ. Culture skill of RAW<sub>264.7</sub> and its application in osteoclastic differentiation[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2016, 22(10): 1355-1360 (in Chinese).
- [27] 岳磊, 张垚, 张楠曦. 流式细胞仪检测线粒体膜电位方法的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2015, 31(4): 393-397.
- YUE L, ZHANG Y, ZHANG NX. Study on methods for detecting mitochondrial membrane potential by flow cytometry[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2015, 31(4): 393-397 (in Chinese).
- [28] 胡廷仪, 仓绍义. 应用乳酸脱氢酶释放试验评定巨噬细胞膜通透性的变化[J]. 中国环境科学, 1990(6): 470-473.
- HU TY, CANG SY. The changes of macrophage membrane permeability were evaluated by lactate dehydrogenase release test[J]. China Environmental Science, 1990(6): 470-473 (in Chinese).
- [29] MARTINEZ FO, GORDON S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment[J]. F1000prime Reports, 2014, 6: 13.
- [30] LI QF, AI QH, MAI KS, XU W, ZHENG YF. A comparative study: *in vitro* effects of EPA and DHA on immune functions of head-kidney macrophages isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(3): 933-940.
- [31] 陈明, 王秋华, 王瑞, 甘西, 李莉萍, 雷爱莹, 梁万文, 黄维义. 重组 tHsp70 对罗非鱼腹腔巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 145-153.
- CHEN M, WANG QH, WANG R, GAN X, LI LP, LEI AY, LIANG WW, HUANG WY. Effects of recombinant

- tHsp70 on immune function of tilapia peritoneal macrophages[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 145-153 (in Chinese).
- [32] QIU WH, LIU S, CHEN JS, HU L, WU MH, YANG M. The primary culture of carp (*Cyprinus carpio*) macrophages and the verification of its phagocytosis activity[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 2016, 52(1): 10-19.
- [33] AWASTHI A, RATHORE G, PRADHAN PK, REBELLO SC, KHAN MY, LAKRA WS. Isolation and characterization of head kidney derived macrophages of *Labeo rohita*[J]. Journal of Environmental Biology, 2014, 35(5): 949-954.
- [34] PHAM PH, LUMSDEN JS, TAFALLA C, DIXON B, BOLS NC. Differential effects of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotypes IVa and IVb on gill epithelial and spleen macrophage cell lines from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(2): 632-640.
- [35] 徐德志, 陆新江, 鲁建飞, 陈炯. 香鱼 *IGF-1* 基因特性及其对单核巨噬细胞的功能调控[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(5): 785-798.  
XU DZ, LU XJ, LU JF, CHEN J. Gene characterization of ayu (*Plecoglossus altivelis*) *IGF-1* and its functional regulation on monocytes/macrophages[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(5): 785-798 (in Chinese).
- [36] 王秋华, 陈明, 黄维义, 王瑞, 李莉萍, 甘西, 雷爱莹, 黄均, 梁万文. 罗非鱼腹腔巨噬细胞分离与培养[J]. 华北农学报, 2011, 26(S2): 224-228.  
WANG QH, CHEN M, HUANG WY, WANG R, LI LP, GAN X, LEI AY, HUANG J, LIANG WW. Separation and cultivation of *Tilapia* peritoneal macrophage[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2011, 26(S2): 224-228 (in Chinese).
- [37] GRAYFER L, WALSH JG, BELOSEVIC M. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor- $\alpha$ [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2008, 32(5): 532-543.
- [38] 胡先勤, 周建军, 胡骏鹏, 王学东, 王文彪, 王锐. 斑点叉尾[鱼回]头肾巨噬细胞分离及初步应用[J]. 齐鲁渔业, 2019(6): 7-10.  
HU XQ, ZHOU JJ, HU JP, WANG XD, WANG WB, WANG R. Separation and preliminary application of head kidney macrophages in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Shandong Fisheries, 2019(6): 7-10 (in Chinese).
- [39] LU XJ, CHEN J. Specific function and modulation of teleost monocytes/macrophages: polarization and phagocytosis[J]. Zoological Research, 2019, 40(3): 146-150.
- [40] NEUMANN NF, BARREDA DR, BELOSEVIC M. Generation and functional analysis of distinct macrophage sub-populations from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney leukocyte cultures[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2000, 10(1): 1-20.
- [41] STAFFORD JL, MCLAUCHLAN PE, SECOMBES CJ, ELLIS AE, BELOSEVIC M. Generation of primary monocyte-like cultures from rainbow trout head kidney leukocytes[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(5-6): 447-459.
- [42] DREVETS DA, CANONO BP, CAMPBELL PA. Measurement of bacterial ingestion and killing by macrophages[J]. Current Protocols in Immunology, 2015, 109: 14.6.1-14.6.14.6.17.
- [43] SPILSBURY K, O'MARA MA, WU WM, ROWE PB, SYMONDS G, TAKAYAMA Y. Isolation of a novel macrophage-specific gene by differential cDNA analysis[J]. Blood, 1995, 85(6): 1620-1629.
- [44] KARLSSON KR, COWLEY S, MARTINEZ FO, SHAW M, MINGER SL, JAMES W. Homogeneous monocytes and macrophages from human embryonic stem cells following coculture-free differentiation in M-CSF and IL-3[J]. Experimental Hematology, 2008, 36(9): 1167-1175.
- [45] ZAKRZEWSKA A, CUI C, STOCKHAMMER OW, BENARD EL, SPAINK HP, MEIJER AH. Macrophage-specific gene functions in Spi1-directed innate immunity[J]. Blood, 2010, 116(3): e1-e11.
- [46] 常藕琴, 霍礼霞, 罗满林, 石存斌, 张德峰, 潘厚军, 任燕. 草鱼肾中性粒细胞的分离鉴定与活性检测[J]. 中国水产科学, 2021, 28(12): 1515-1522.  
CHANG OQ, HUO LX, LUO ML, SHI CB, ZHANG DF, PAN HJ, REN Y. Isolation, identification, and activity detection of neutrophils from the grass carp kidney[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(12): 1515-1522 (in Chinese).
- [47] 刘春, 陈晓虹, 姜兰, 曹际振, 李凯彬, 王英英, 常藕琴, 王芳, 石存斌, 林明辉, 王庆. 鲮爱德华氏菌的红色荧光蛋白标记及其应用[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(3): 661-666.  
LIU C, CHEN XH, JIANG L, CAO JZ, LI KB, WANG YY, CHANG OQ, WANG F, SHI CB, LIN MH, WANG

- Q. Construction and application of *Edwardsiella ictaluri* strain labelled with mCherry fluorescent protein[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 35(3): 661-666 (in Chinese).
- [48] QIN L, SUN YY, ZHAO YJ, XU J, BI KR. *In vitro* model to estimate *Edwardsiella tarda*-macrophage interactions using RAW<sub>264.7</sub> cells[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 177-184.
- [49] 秦蕾, 孙玉英, 毕可然, 高迎莉. 迟缓爱德华氏菌对大菱鲆巨噬细胞相关生物效应分子产生的影响[J]. *水产科学*, 2018, 37(2): 239-243.
- QIN L, SUN YY, BI KR, GAO YL. Effects of *Edwardsiella tarda* on development of related effector molecules by macrophage from turbot[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(2): 239-243 (in Chinese).
- [50] 毛伟平, 张娜娜, 魏传静, 周雷, 冯娟, 刘洪云. 镉对 HEK 293 细胞线粒体损伤作用[J]. *中国公共卫生*, 2008, 24(12): 1531-1533.
- MAO WP, ZHANG NN, WEI CJ, ZHOU L, FENG J, LIU HY. Cadmium induced mitochondrial damage in HEK 293 cell[J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2008, 24(12): 1531-1533 (in Chinese).
- [51] 竺飞燕, 张雄, 王百辰, 胡智伟. 鱼藤酮诱导 PC12 细胞凋亡及线粒体膜电位变化[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(2): 266-269.
- ZHU FY, ZHANG X, WANG BC, HU ZW. Rotenone induces apoptosis of PC12 cells and alteration in mitochondrial membrane potential[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2014, 30(2): 266-269 (in Chinese).
- [52] 王楚涵, 罗涛, 鲍朗. 结核分枝杆菌感染引起的细胞损伤与死亡[J]. *国际免疫学杂志*, 2020, 43(2): 178-183.
- WANG CH, LUO T, BAO L. Cell damage and cell death caused by *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *International Journal of Immunology*, 2020, 43(2): 178-183 (in Chinese).
- [53] 李杨, 周栋, 尹彦龙, 张广冻, 相彩霞, 支飞杰, 白芙蓉, 林鹏飞, 靳亚平, 王爱华. 布鲁氏菌 OMP16 对 RAW<sub>264.7</sub> 细胞凋亡与免疫活性的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(8): 2642-2651.
- LI Y, ZHOU D, YIN YL, ZHANG GD, XIANG CX, ZHI FJ, BAI FR, LIN PF, JIN YP, WANG AH. Effects of *Brucella* outer membrane protein 16 on apoptosis and immune activity of RAW<sub>264.7</sub> cells[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(8): 2642-2651 (in Chinese).
- [54] CZUCZMAN MA, FATTOUH R, VAN RIJN JM, CANADIEN V, OSBORNE S, MUISE AM, KUCHROO VK, HIGGINS DE, BRUMELL JH. *Listeria monocytogenes* exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread[J]. *Nature*, 2014, 509(7499): 230-234.