

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230401001

http://www.yykxjz.cn/

刘雨曦, 孙亦如, 王思进, 马思思, 喻伟峰, 尹绍武, 王涛. 暗纹东方鲀肠上皮细胞体外培养方法的建立及皮质醇对其生理生化的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(5): 119–133

LIU Y X, SUN Y R, WANG S J, MA S S, YU W F, YIN S W, WANG T. *In vitro* culture method for intestinal epithelial cells of *Takifugu fasciatus* and the cortisol effect on its physiological characteristic. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(5): 119–133

暗纹东方鲀肠上皮细胞体外培养方法的建立 及皮质醇对其生理生化的影响*

刘雨曦^{1,2} 孙亦如^{1,2} 王思进^{1,2} 马思思^{1,2}
喻伟峰^{1,2} 尹绍武^{1,2①} 王涛^{1,2①}

(1. 南京师范大学海洋科学与工程学院 江苏 南京 210023;
2. 江苏省特色水产育种与绿色高效养殖技术工程研究中心 江苏 南京 210023)

摘要 应激反应对暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)养殖业危害极大, 而皮质醇(cortisol)是判断鱼类应激反应的重要标志物。肠道是鱼体与外界环境接触的媒介, 肠道生理状态能反映鱼体的应激水平, 但目前肠道在鱼类响应应激反应中的作用不详。本研究以暗纹东方鲀肠上皮细胞为对象, 分别采用胰蛋白酶和 DMEM 培养基、胰蛋白酶和 1640 培养基、I 型胶原酶和 DMEM 培养基、I 型胶原酶和 1640 培养基 4 种方法对其进行原代培养, 旨在建立暗纹东方鲀原代肠上皮细胞体外培养方法, 并在此基础上探讨皮质醇对暗纹东方鲀肠上皮细胞氧化应激、细胞凋亡和脂代谢的影响。利用 CCK-8 法检测肠上皮细胞活力, 透射电镜观察皮质醇处理后细胞内线粒体的形态结构, 荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测氧化应激相关基因、细胞凋亡相关基因及脂代谢相关基因在肠上皮细胞内的表达模式, Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡等。结果显示, 在 4 种培养方法中, 采用胰蛋白酶消化和 DMEM 培养基进行培养的肠上皮细胞增殖率最高, 贴壁情况最佳; 与对照组相比, 当皮质醇浓度高于 2 000 nmol/L 时, 肠上皮细胞活力显著下降($P<0.05$); 透射电镜显示, 所有皮质醇处理组肠上皮细胞内线粒体结构发生改变, 线粒体数量增加; 随皮质醇处理浓度的升高, 肠上皮细胞内氧化应激相关基因(*sod*、*cat* 和 *gsh-px*)及促凋亡基因(*caspase-3*、*caspase-7*、*caspase-9*、*bax* 和 *p53*)表达量和凋亡指数均显著上升, 抗凋亡基因 *bcl-2* 表达量显著下降($P<0.05$); 脂肪合成相关基因(*g6pd*、*6gpd*、*ppary*、*fas* 和 *acc*)表达量显著下降, 脂肪分解相关基因(*hsl*、*ppara*、*lpl* 和 *cpt-1*)表达量显著上升($P<0.05$); 甘油三酯和总胆固醇含量显著下降, 游离脂肪酸含量显著上升($P<0.05$)。结果表明, 皮质醇能够促进暗纹东方鲀肠上皮细胞的氧化应激和细胞凋亡, 同时促进脂肪的分解并抑制脂肪的合成。本研究以期为暗纹东方鲀抗应激养殖提供一定的参考资料。

关键词 暗纹东方鲀; 肠上皮细胞; 皮质醇; 氧化应激; 细胞凋亡; 脂代谢

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)05-0119-15

* 江苏省农业科技自主创新资金(CX(22)2029)、江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目(JBGS[2021]034)和江苏省第六期“333 人才”培养支持项目共同资助。刘雨曦, Email: 528515250@qq.com

① 通信作者: 尹绍武, 教授, Email: yinshaowu@163.com; 王涛, 副教授, Email: seawater88@126.com

收稿日期: 2023-04-01, 收修改稿日期: 2023-06-10

暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)属鲀形目(Tetraodontiformes)、鲀科(Tetrodantidae)、东方鲀属(*Takifugu*),广泛分布于我国黄海、东海、渤海和通海的江河下游,是一种典型的江海洄游鱼类,因其肉质鲜嫩、营养丰富,受到广大消费者的喜爱(袁新程等, 2021)。暗纹东方鲀在洄游过程中,容易受到外界不良环境因子胁迫从而产生应激反应,导致下丘脑-脑垂体-肾间轴(HPI)的兴奋和一系列物质代谢的变化。皮质醇(cortisol)又称“氢化可的松”,是鱼类肾间细胞分泌的一种关键的皮质类固醇类激素,可参与鱼类的渗透调节与生长发育(Carbajal *et al*, 2019; Jerez-Cepa *et al*, 2019),是鱼类是否受到外界环境胁迫的主要检测指标(Ramsay *et al*, 2006)。研究表明,当鱼类受到外界不良环境胁迫后,其HPI轴的激活可引起血浆内皮质醇含量升高(Cockrem *et al*, 2019; Reichard *et al*, 2023)。Samaras等(2022)研究指出,真鲷(*Pagrus major*)血浆中皮质醇浓度与温度呈负相关。目前,皮质醇对鱼类的影响主要集中在生长发育(Vargas-Chacoff *et al*, 2021)、免疫应答(Vallejos-Vidal *et al*, 2022)和性别分化(Goikoetxea *et al*, 2022)方面,关于皮质醇对鱼类肠道氧化应激、细胞凋亡和脂代谢方面的影响研究鲜有报道。

当氧化应激发生时,机体会激活体内酶抗氧化系统以清除过量的活性氧(ROS),从而维持机体稳态(Foyer *et al*, 2011)。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是鱼类主要的抗氧化物酶(Gauvreau *et al*, 2022)。过往研究表明,鱼类在受到外界刺激后,其细胞中的皮质醇含量与SOD、CAT和GSH-Px的活性呈现一定的相关性(Xie *et al*, 2023),暗示皮质醇会激活鱼体的抗氧化防御系统。细胞凋亡又称编程性死亡,是由基因控制的为维持机体内环境稳态而发生的细胞自主死亡(Belushkina *et al*, 2001)。Takagi等(2011)指出,10 nmol/L皮质醇刺激可促进青鳉(*Oryzias latipes*)肠上皮细胞凋亡,且反应具有剂量依赖性。鱼类生长发育过程中的细胞凋亡大多是由半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族介导(Yamashita, 2003), Bcl-2-Associated X蛋白基因(*bax*)、B淋巴细胞瘤-2基因(*bcl-2*)和*p53*基因也均与细胞凋亡相关(齐志涛等, 2021; 公洁等, 2023)。

在鱼类中,皮质醇激素能够影响脂肪吸收、合成和分解的平衡,该过程涉及到许多关键基因(Leger *et al*, 2021)。*g6pd*和*6gpd*是产生NADPH的关键基因(Sebastian *et al*, 2022),*acc*、*fas*和*ppary*基因也在脂肪的合成中起到了重要的作用(Kang *et al*, 2022)。

ppara、*hsl*、*lpl*、*cpt-1*是参与甘油三酯(TG)水解和细胞内 β 氧化的重要基因(Hummasti *et al*, 2006; Kerner *et al*, 2000; 黄陈翠等, 2020),总胆固醇(TC)和游离脂肪酸(NEFA)也是检测脂代谢的关键指标(Liang *et al*, 2020)。

目前,研究皮质醇对鱼类生理生化的影响主要以活体动物的肝脏为研究对象(Kostyniuk *et al*, 2018),以鱼类肠道为模型的研究罕见。肠道作为消化系统的一部分,是鱼体与外界环境接触的重要媒介。由于机体中存在多种激素的交互作用,难以确定具体某一种激素对机体的影响(Leung *et al*, 2010)。研究表明,体外细胞培养可以保持组织的大部分生理功能(Battle *et al*, 2001)。因此,本研究以从暗纹东方鲀肠道分离的肠上皮细胞为研究对象,通过在离体培养的肠上皮细胞中加入不同浓度的皮质醇,探讨皮质醇对暗纹东方鲀肠上皮细胞氧化应激、细胞凋亡和脂代谢的影响,研究结果可为暗纹东方鲀健康养殖提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用健康的暗纹东方鲀(1龄)由江苏中洋集团股份有限公司提供,体长为 (15.00 ± 1.55) cm,重量为 (35.00 ± 1.65) g。将实验鱼暂养于实验室鱼类专用养殖水缸中,养殖条件:温度 (25.0 ± 0.5) °C、盐度约为3、溶解氧浓度 >7 mg/L、光照时间12 h昼/12 h夜、pH 7.0 ± 0.5 ,使用江苏中洋集团股份有限公司提供的商业饲料(包含粗蛋白42.0%、粗脂肪8.0%、钙0.35%~0.5%、磷1.2%、氯化钠0.3%~2.5%)进行投喂,每天2次。正式实验前禁食24 h。

1.2 暗纹东方鲀原代肠上皮细胞的分离和培养

参考骆源等(2016)的胰蛋白酶消化法,分离肠上皮细胞。将实验鱼用MS-222(Sigma, 美国)麻醉,并用75%酒精对其腹部表面进行消毒。在无菌环境下,迅速取出肠道组织,并置于含有100 IU/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素(碧云天生物技术有限公司, 中国)的PBS缓冲液(生航生物技术有限公司, 中国)中。用高压灭菌的剪刀和镊子除去肠系膜和肠道内食物残渣,将清洗好的肠道组织放入装有0.25%胰蛋白酶(Solarbio, 中国)的离心管内,剪碎,置于28 °C恒温金属浴中消化,30 min后加入含有20%胎牛血清(Gibco, 美国)和100 IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的完全培养基停止消化反应,用100目细胞筛网将

细胞悬液过滤至 50 mL 离心管中, 4 °C 1 000 r/min 离心 5 min, 去除上清液, 然后加入完全培养基重悬细胞, 调整细胞浓度后置于 28 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3 暗纹东方鲀肠上皮细胞最佳培养条件的确定

分别使用 0.25%胰蛋白酶和 DMEM 培养基(生工生物工程有限公司, 中国)(记为 T+DMEM)、0.25%胰蛋白酶和 1640 培养基(生工生物工程有限公司, 中国)(记为 T+1640)、I 型胶原酶(1 mg/mL)(Gibco, 美国)和 DMEM 培养基(记为 C+DMEM)及 I 型胶原酶(1 mg/mL)和 1640 培养基(记为 C+1640)分离和培养细胞。培养基中均添加 20%胎牛血清和 100 IU/mL 青霉素、100 µg/mL 链霉素。将大约 1×10⁶ 个细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 每个处理设置 6 个生物学重复和 3 个技术重复共 18 个复孔, 于 28 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 5 d, 在培养 1、2、3、4 和 5 d 后, 用 CCK-8 法检测细胞增殖率, 绘制肠上皮细胞在不同分离和培养条件下的生长曲线, 并在培养 24 h 后显微镜下观察细胞生长状态。

1.4 不同浓度皮质醇对肠上皮细胞活力的影响

采用 CCK-8 细胞活力检测试剂盒(诺唯赞生物科技有限公司, 中国)测定细胞活力(姚朝瑞等, 2021)。将培养 24 h 后的肠上皮细胞接种到 96 孔板中(5×10⁴ 个/mL), 随后, 加入用完全培养基稀释好的皮质醇(Sigma, 美国)溶液, 使皮质醇在细胞培养基中的终浓度分别为 0、100、1 000、2 000、3 000 和 5 000 nmol/L, 每个浓度至少设置 6 个复孔, 于 28 °C, 5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h 后, 每孔加入 10 µL CCK-8 溶液, 28 °C, 5% CO₂ 培养箱内孵育 4 h, 用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔吸光度值。以上研究结果得出后续最佳皮质醇处理浓度。

1.5 不同浓度皮质醇对肠上皮细胞超微结构的影响

根据上述研究结果, 皮质醇最佳处理浓度为 1 000 nmol/L 以内。肠上皮细胞培养 24 h 后, 加入含有不同浓度皮质醇的完全培养基(0、10、100 和 1 000 nmol/L), 再次培养 24 h 后收集细胞, 加入电镜固定液(Solarbio, 中国), 4 °C 固定 12 h, 接着进行琼脂预包埋, 1%戊二醛后固定 1 h, 随后, 使用不同浓度梯度乙醇脱水, 然后进行渗透包埋、聚合、超薄切片和染色, 最后用 H7650 型透射式电子显微镜(日立, 中国)进行拍照观察。

1.6 不同浓度皮质醇对肠上皮细胞凋亡的影响

采用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(南京建成生物工程研究所, 中国)检测细胞凋亡。肠上皮细胞培养 24 h 后, 加入含有不同浓度皮质醇的完全培养基(0、10、100 和 1 000 nmol/L), 每个浓度至少设置 6 个复孔, 再次培养 3、6、12 和 24 h 后收集细胞, 随后, 将细胞轻轻重悬在 500 µL 结合液中, 依次加入 5 µL Annexin V-FITC 和 5 µL PI 染色液, 轻轻混匀, 在室温下避光孵育 10 min 后, 用 eN1610-FL 荧光显微镜(Nexcop, 中国)测定细胞凋亡百分比, 定量分析细胞凋亡指数。

1.7 肠上皮细胞氧化应激、细胞凋亡和脂代谢相关基因的时序表达分析

采用荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测氧化应激相关基因(*sod*、*cat* 和 *gsh-px*)、细胞凋亡相关基因(*caspase-3*、*caspase-7*、*caspase-9*、*bax*、*p53* 和 *bcl-2*)和脂代谢相关基因(*g6pd*、*6gpd*、*ppar γ* 、*fas*、*acc*、*hsl*、*ppara*、*lpl* 和 *cpt-1*)的表达情况。采用 Trizol(雷根生物技术有限公司, 中国)提取肠上皮细胞总 RNA, 使用 Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (翌圣生物科技有限公司, 中国)将纯化的 RNA 逆转录成 cDNA。根据相关基因序列, 运用 Prime 5.0 软件设计上下游引物, 引物序列、扩增片段长度及扩增效率见表 1, 其中, 18S RNA 为内参基因, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。qRT-PCR 反应体系: 上下游引物各 0.4 µL, SYBR qPCR Master Mix 10 µL (诺唯赞生物科技有限公司, 中国), ddH₂O 7.2 µL, cDNA 模板 2.0 µL; 反应条件: 预变性 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 55 °C 30 s; 95 °C 15 s; 55 °C 60 s 共 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算基因的相对表达量, 每个样品进行 3 次生物学重复。

1.8 不同浓度皮质醇对肠上皮细胞生理生化指标的影响

肠上皮细胞培养 24 h 后, 加入含有不同浓度皮质醇的完全培养基(0、10、100 和 1 000 nmol/L), 每个浓度至少设置 6 个复孔, 再次培养 24 h 后收集细胞。采用试剂盒(南京建成生物工程研究所, 中国)测定肠上皮细胞内的总蛋白(TP)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和游离脂肪酸(NEFA)含量。具体实验步骤参照试剂盒使用说明书。

1.9 数据统计分析

使用 SPSS 27.0 (IBM 公司)软件对数据进行统

计分析, 实验数据均采用平均值 $\pm$ 标准差(Means $\pm$ SD)表示。采用 Shapiro-Wilk's 检验数据是否符合正态分布, 采用双因素方差分析(Two-way ANOVA)

评价皮质醇浓度和作用时间的交互作用, 采用独立样本 t 检验统计组间差异显著性, 以 $P<0.05$ 表示差异显著。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Tab.1 qRT-PCR primers for genes

基因名称 Gene name	引物 Primer	引物序列(5'~3') Primer sequences (5'~3')	扩增片段长度 Length/bp	扩增效率 Efficiency/%
18S RNA	<i>18s rna</i> -F	AGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	146	94.38
	<i>18s rna</i> -R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC		
<i>sod</i>	<i>sod</i> -F	GCAGACAACATCGCCAAGATTGAC	132	99.03
	<i>sod</i> -R	GCTCTCCTCGTTGCCTCCTTTTC		
<i>cat</i>	<i>cat</i> -F	ATGTGGGACTTCTGGAGCCTGAG	116	102.33
	<i>cat</i> -R	AAGGTGTGGGAGCCGTAGCC		
<i>gsh-px</i>	<i>gsh-px</i> -F	CTGCTGTCGGGTGAAGTTCTGAG	189	95.02
	<i>gsh-px</i> -R	GGTGTAATCCCTGGCTGTTGTTCC		
<i>caspase-3</i>	<i>caspase-3</i> -F	GACAACAGTCGGGTTCGTCT	208	97.79
	<i>caspase-3</i> -R	CCGAGGCTCGAGAACACTTT		
<i>caspase-7</i>	<i>caspase-7</i> -F	AGGGATGAATGTACGCAACGG	182	94.50
	<i>caspase-7</i> -R	TTAGCAGGATGCAGGCGAAAC		
<i>caspase-9</i>	<i>caspase-9</i> -F	ACTTTGGTTGAGTTACTTCAGGATG	213	96.82
	<i>caspase-9</i> -R	ACTGGGATGACAGGTGCTTTA		
<i>bcl-2</i>	<i>bcl-2</i> -F	ACTTGTGCTTTTCAGTGACCTG	162	104.79
	<i>bcl-2</i> -R	TTGACTCCATCCCTAAATACCT		
<i>bax</i>	<i>bax</i> -F	TTTACTTTGCCTGTCGCCTCG	140	98.68
	<i>bax</i> -R	CCTTACCCATCCACCCTGCT		
<i>p53</i>	<i>p53</i> -F	CCTGGGTAATCGGTGGTAA	205	95.56
	<i>p53</i> -R	ATCTGTGGGAGAATGTGGC		
<i>g6pd</i>	<i>g6pd</i> -F	TCTCCGAGCTCAACACACAC	157	94.30
	<i>g6pd</i> -R	AACGCTGTGGTAGATGGTGG		
<i>6gpd</i>	<i>6gpd</i> -F	CGGGAGAGCCTTGTGTGAT	224	101.93
	<i>6gpd</i> -R	CCGTCTTGTTCCAGTCGTCA		
<i>pparγ</i>	<i>pparγ</i> -F	GTAACCAGGACTCGGTGTGG	145	98.82
	<i>pparγ</i> -R	GATCTCCGATTGGTCGCTGT		
<i>fas</i>	<i>fas</i> -F	GCAGCTTTCTTTGGCGTTCA	139	98.85
	<i>fas</i> -R	TCTGATCCACTCACCCGAT		
<i>acc</i>	<i>acc</i> -F	GTGAAAATCCCGACGAGGGT	178	97.71
	<i>acc</i> -R	CCACGAGAAACAGTGTCCGA		
<i>hsl</i>	<i>hsl</i> -F	GAGGTCAGCAGCAGGAAGTT	121	96.85
	<i>hsl</i> -R	CGGCAACATCTTCATGCGAG		
<i>ppara</i>	<i>ppara</i> -F	AGCATCCTCAGTGGCAAGAC	92	98.52
	<i>ppara</i> -R	ATCTTTGCCACCAGGGTCTG		
<i>lpl</i>	<i>lpl</i> -F	CTGTAGGAAGAACCGCTGCA	133	104.46
	<i>lpl</i> -R	TCTTGAGGTACAGCTTGCGG		
<i>cpt-1</i>	<i>cpt-1</i> -F	GGGCAGGACTGAGACTGTTC	99	100.67
	<i>cpt-1</i> -R	AACAAACGCCTGCACACATC		

2 结果

2.1 不同消化酶和培养基对暗纹东方鲀肠上皮细胞生长的影响

为确定暗纹东方鲀肠上皮细胞体外培养的最佳条件, 分析比较了 0.25%胰蛋白酶和 DMEM 培养基(T+DMEM)、0.25%胰蛋白酶和 1640 培养基(T+1640)、I 型胶原酶(1 mg/mL)和 DMEM 培养基(C+DMEM)及 I 型胶原酶(1 mg/mL)和 1640 培养基(C+1640) 4 种培养方法在 28 °C 时对原代肠上皮细胞生长的影响。结果如图 1 所示, T+DMEM 组的细胞增殖率在第 2~5 天时均高于其他处理组, 所有处理组的细胞增殖率均在第 3 天达到峰值。双因素方差分析结果表明, 培养基种类对肠上皮细胞增殖率产生了显著影响。由图 2 可知, 肠上皮细胞在 28 °C 培养 24 h 后, C+1640 组和 T+1640 组的细胞多数呈卵圆形, 贴壁数量较少, C+DMEM 组和 T+DMEM 组的细胞形态多数为成纤维样细胞, 贴壁数量增加。经实验证实, 暗纹东方鲀肠上皮细胞最适分离培养方法为使用 0.25%胰蛋白酶和 DMEM 培养基分离培养。

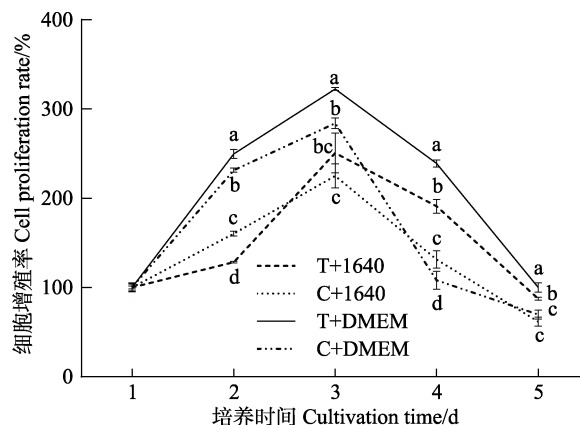


图1 不同消化酶和培养基对肠上皮细胞增殖率的影响
Fig.1 Effects of different digestive enzymes and media on cell proliferation rate in intestinal epithelial cells

T+1640: 胰蛋白酶+1640 培养基; C+1640: I 型胶原酶+1640 培养基; T+DMEM: 胰蛋白酶+DMEM 培养基; C+DMEM: I 型胶原酶+DMEM 培养基。不同小写字母表示同一时间各个处理组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

T+1640: Trypsin+RPMI 1640; C+1640: Type I collagenase+RPMI 1640; T+DMEM: Trypsin+DMEM medium; C+DMEM: Type I collagenase+DMEM medium. Values with different lowercase letters are significantly different among treatments at the same time ($P < 0.05$).

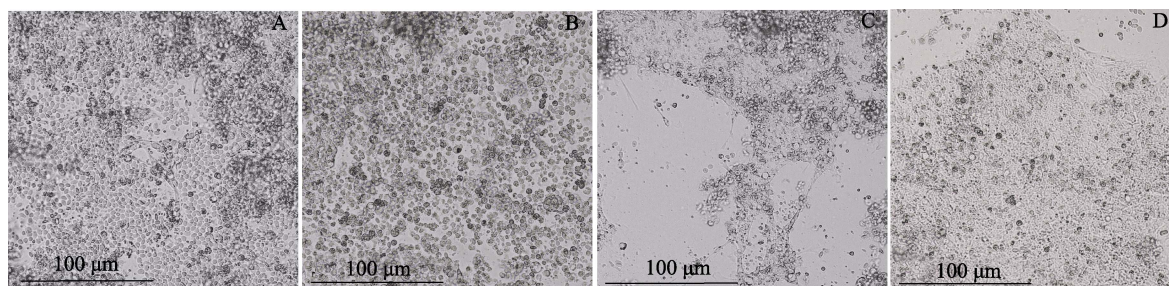


图2 不同消化酶和培养基培养 24 h 后原代肠上皮细胞状态

Fig.2 Status of primary intestinal epithelial cells after 24 h incubation with different digestive enzymes and media

A: Type I collagenase+RPMI 1640 (C+1640); B: Trypsin+RPMI 1640 (T+1640);

C: Type I collagenase+DMEM medium (C+DMEM); D: Trypsin+DMEM medium (T+DMEM)

2.2 皮质醇对暗纹东方鲀肠上皮细胞活力的影响

如图 3 所示, 肠上皮细胞在经过皮质醇处理 24 h 后, 细胞活力随皮质醇处理浓度的上升而显著性下降 ($P < 0.05$)。1 000 nmol/L 皮质醇组的细胞活力为对照组的 0.80 倍, 且 1 000 与 2 000 nmol/L 皮质醇组的细胞活力无显著性差异 ($P > 0.05$)。当皮质醇浓度高于 2 000 nmol/L 时, 肠上皮细胞活力大幅下降, 当浓度达到 5 000 nmol/L 时, 肠上皮细胞活力仅为对照组的 0.37 倍。根据预实验得到在 1 000 nmol/L 皮质醇刺激下, 肠上皮细胞可产生生理生化响应, 且该浓度下细胞存活

率较高, 故选择 1 000 nmol/L 为皮质醇最适处理浓度。

2.3 皮质醇对暗纹东方鲀肠上皮细胞氧化应激的影响

如图 4 所示, 对照组肠上皮细胞在透射电镜下细胞形态结构规则, 细胞核完整, 线粒体呈卵圆形、外膜和内膜平滑。肠上皮细胞经皮质醇处理后出现线粒体损伤, 与对照组相比, 10 nmol/L 和 100 nmol/L 皮质醇组细胞内线粒体数量增加, 线粒体结构受损。1 000 nmol/L 皮质醇组细胞结构弥散, 线粒体数量显著上升, 线粒体发生肿胀, 部分线粒体甚至出现外膜破裂、内容物溢出现象。

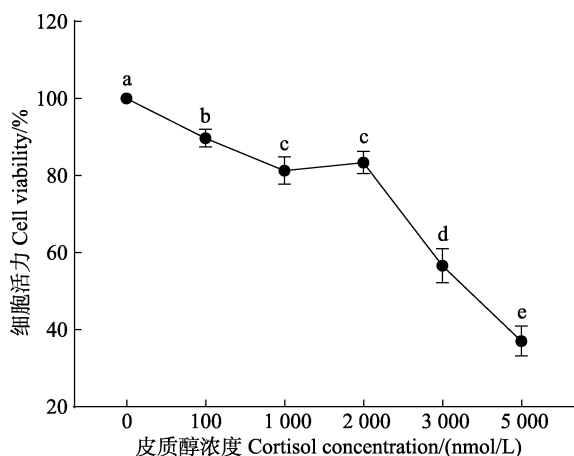


图3 皮质醇对肠上皮细胞活力的影响

Fig.3 Effects of the cortisol on cell viability in intestinal epithelial cells

不同小写字母表示不同皮质醇浓度处理组间存在显著性差异($P<0.05$)。

Data with the different lowercase letters are significantly different among treatments at different cortisol concentrations ($P<0.05$).

由图5可知,与对照组相比,*sod*、*cat*和*gsh-px*基因的表达量随着皮质醇处理浓度的上升而上升,且在100 nmol/L和1 000 nmol/L皮质醇组之间无显著性差异($P>0.05$)。当皮质醇浓度为10 nmol/L时,与对照组相比,*sod*和*cat*基因的表达量显著性上升($P<0.05$),*gsh-px*基因的表达量无显著性差异($P>0.05$)。所有皮质醇处理组的*sod*、*cat*和*gsh-px*基因的表达量均随着作用时间的上升而呈上升趋势,且在24 h时达到最大值。双因素方差分析结果表明,皮质醇浓度与作用时间和二者的交互作用对肠上皮细胞*sod*、*cat*和*gsh-px*基因的表达量均产生了显著性影响($P<0.05$)。

2.4 皮质醇对暗纹东方鲀肠上皮细胞凋亡的影响

如图6所示,随着皮质醇处理浓度的上升,细胞凋亡率逐渐上升。与对照组相比,10 nmol/L皮质醇组的凋亡率无显著性差异($P>0.05$),100 nmol/L和1 000 nmol/L皮质醇组凋亡率均显著性上升($P<0.05$)。由双因素方差分析结果可知,肠上皮细胞凋亡率受到皮质醇浓度、作用时间及这二者交互作用的影响。与皮质醇孵育3 h相比,在孵育12 h和24 h后,所有皮质醇处理组的细胞凋亡率均显著上升($P<0.05$)。

qRT-PCR结果如图7所示,随着皮质醇处理浓度的上升,*caspase-3*、*caspase-7*、*caspase-9*、*bax*和*p53*基因的表达量与对照组相比均显著上升($P<0.05$),而*bcl-2*基因表达量显著下降($P<0.05$),其中*caspase-7*、*caspase-9*、*bax*、*p53*和*bcl-2*基因的表达量在100和1 000 nmol/L皮质醇组之间无显著性差异($P>0.05$)。随着皮质醇作用时间的延长,所有皮质醇处理组的*caspase-3*、*bax*和*p53*基因表达量与皮质醇处理时间呈正相关,并在24 h时达到最大值;*caspase-7*和*caspase-9*基因的表达量则呈先上升后下降的趋势,且分别在12 h和6 h时达到最大值;*bcl-2*基因的表达量则呈先下降后上升的趋势,并在12 h时到达最小值。双因素方差分析结果表明,皮质醇浓度、作用时间及二者的交互作用对肠上皮细胞*caspase-3*、*caspase-7*、*caspase-9*、*bax*、*p53*和*bcl-2*基因的表达量均产生了显著影响($P<0.05$)。

2.5 皮质醇对暗纹东方鲀肠上皮细胞脂代谢的影响

如图8所示,肠上皮细胞中脂代谢相关基因表达模式受到皮质醇浓度和作用时间的影响。随着皮质醇处理浓度的上升,*g6pd*、*6gpd*、*ppary*、*fas*和*acc*基因的表达量均呈下降的趋势,*6gpd*和*ppary*基因的表

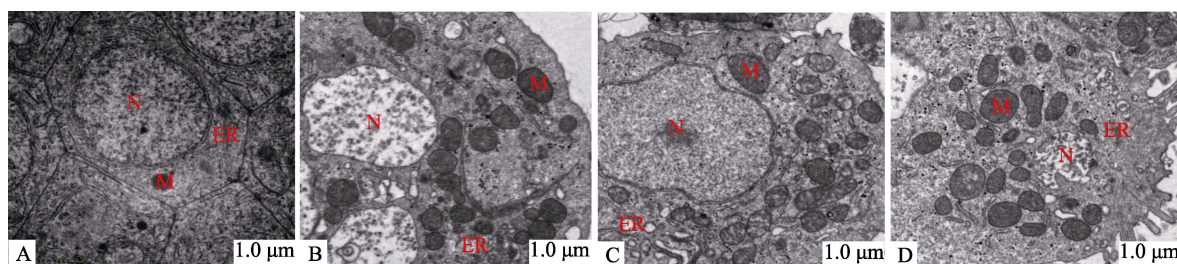


图4 皮质醇对肠上皮细胞超微结构的影响

Fig.4 Effects of the cortisol on ultrastructure in intestinal epithelial cells

A: 对照组; B: 10 nmol/L 皮质醇组; C: 100 nmol/L 皮质醇组; D: 1 000 nmol/L 皮质醇组;

M: 线粒体; ER: 内质网; N: 细胞核。

A: Control group; B: 10 nmol/L cortisol group; C: 100 nmol/L cortisol group; D: 1 000 nmol/L cortisol group;

M: Mitochondrion; ER: Endoplasmic reticulum; N: Nucleus.

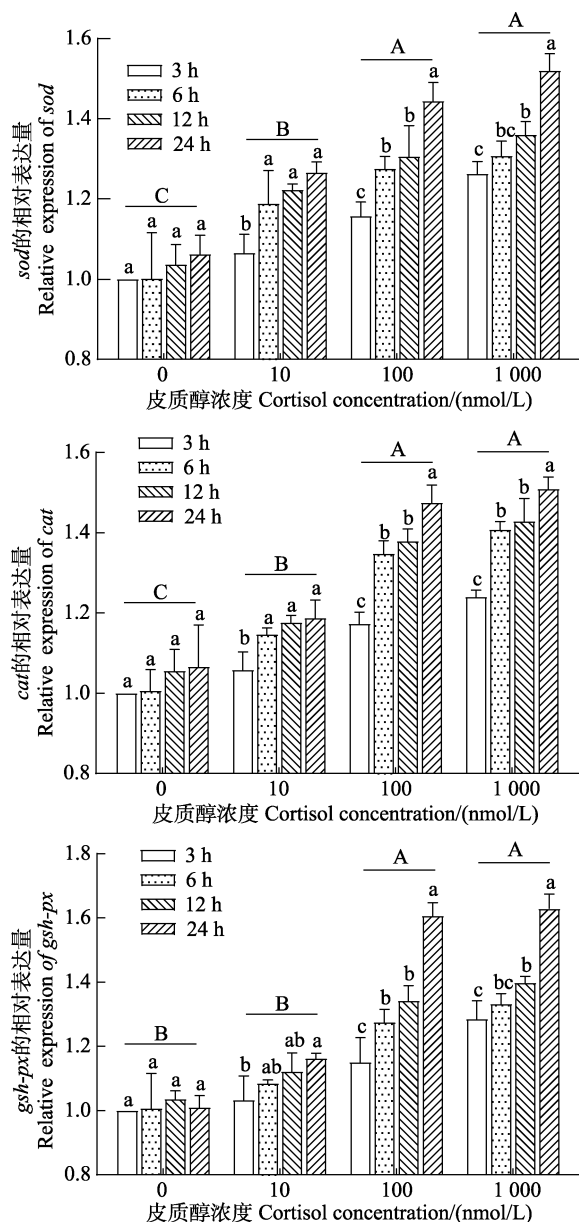


图 5 皮质醇对肠上皮细胞氧化应激相关基因表达水平的影响

Fig.5 Effects of the cortisol on the expression levels of oxidative stress-related genes in intestinal epithelial cells

不同小写字母表示同一皮质醇浓度下各个处理组间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示不同皮质醇浓度处理组间存在显著性差异 ($P < 0.05$); 下同。

Data with different lowercase letters are significantly different among treatments at the same cortisol concentration ($P < 0.05$), data with different uppercase letters are significantly different among treatments at different cortisol concentrations ($P < 0.05$); the same below.

剂量在 100 nmol/L 和 1 000 nmol/L 皮质醇组之间无显著性差异 ($P > 0.05$); *hsl*、*ppara*、*lpl* 和 *cpt-1* 基因的表达量则呈上升趋势, *lpl* 基因的表达量在 100 nmol/L 和 1 000 nmol/L 皮质醇组之间无显著性差异

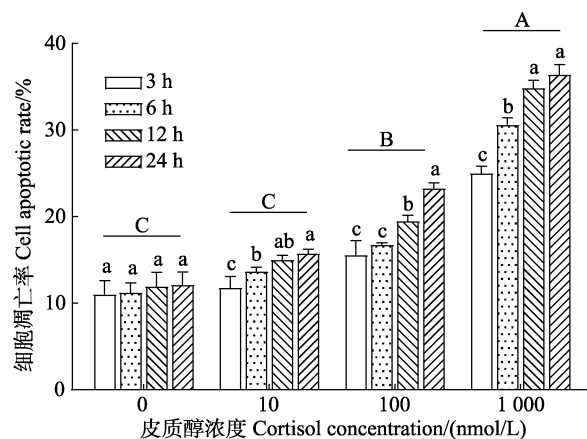


图 6 皮质醇对肠上皮细胞凋亡的影响
Fig.6 Effects of cortisol on the apoptosis in intestinal epithelial cells

($P > 0.05$)。随着皮质醇作用时间的延长, 10 nmol/L 皮质醇组的 *g6pd*、*ppary*、*fas* 和 *acc* 基因表达量在不同时间点均无显著差异 ($P > 0.05$), *6gpd* 基因的表达量呈下降趋势, *hsl*、*ppara*、*lpl* 和 *cpt-1* 基因的表达量则上升趋势。100 nmol/L 和 1 000 nmol/L 皮质醇组的 *g6pd*、*6gpd*、*fas* 和 *acc* 基因的表达量随着处理时间的上升而显著下降 ($P < 0.05$), *hsl*、*lpl* 和 *cpt-1* 基因的表达量显著上升 ($P < 0.05$); *ppary* 基因的表达量呈先下降后上升的趋势, *ppara* 基因的表达量则呈先上升后下降的趋势, 二者均在 12 h 时达峰值。双因素方差分析结果表明, 皮质醇浓度、作用时间及二者的交互作用对肠上皮细胞 *g6pd*、*ppary*、*fas*、*acc*、*hsl*、*ppara*、*lpl* 和 *cpt-1* 基因的表达量均产生了显著性影响 ($P < 0.05$)。 *6gpd* 基因的表达量受到皮质醇浓度与作用时间的影响, 而二者之间的交互作用对其影响效果并不显著 ($P > 0.05$)。

由图 9 可知, 随着皮质醇处理浓度的上升, 肠上皮细胞中的 TG 和 TC 含量呈显著下降的趋势, NEFA 含量则呈显著上升的趋势 ($P < 0.05$), 且三者均在 100 nmol/L 和 1 000 nmol/L 皮质醇组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。随着皮质醇处理时间的延长, 所有皮质醇处理组 TG 和 TC 含量均呈显著下降趋势, NEFA 呈显著上升趋势 ($P < 0.05$)。双因素方差分析结果表明, 皮质醇浓度、作用时间及二者的交互作用对肠上皮细胞的 TG、TC 和 NEFA 含量均产生了显著性影响 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 暗纹东方鲀肠上皮细胞的分离与培养

目前, 鱼类肠细胞体外培养研究主要集中于草鱼

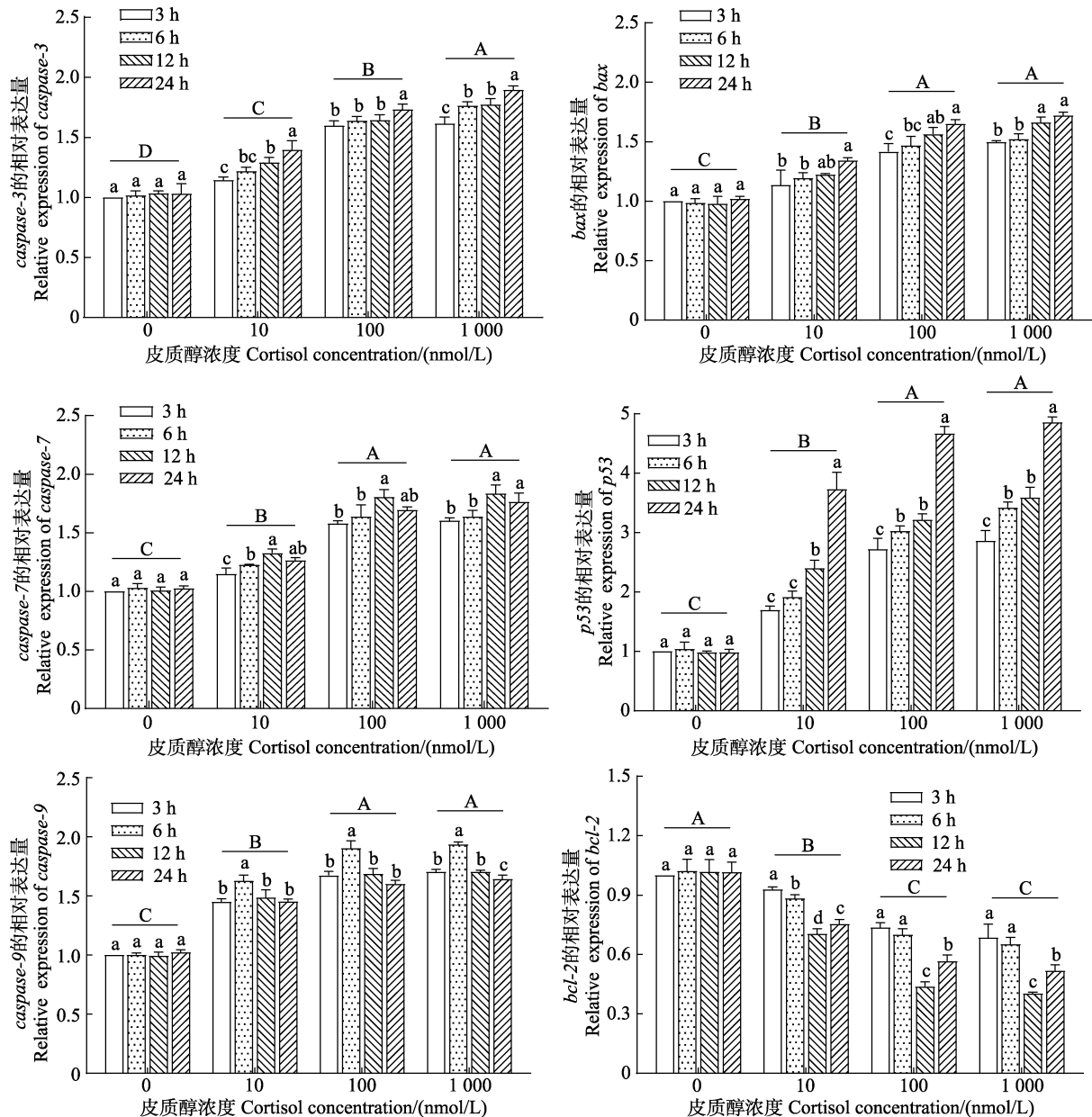


图7 皮质醇对肠上皮细胞凋亡相关基因表达的影响

Fig.7 Effects of the cortisol on the expression levels of apoptosis-related genes in intestinal epithelial cells

(*Ctenopharyngodon Idella*)(姚仕彬等, 2013)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Langan *et al*, 2018)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(Zhang *et al*, 2015), 有关暗纹东方鲀肠细胞体外培养的研究未见报道。本研究结果表明, 经过 0.25%胰蛋白酶消化, DMEM 培养基培养的肠上皮细胞增殖率更高, 培养 24 h 后贴壁生长状态良好, 而使用 I 型胶原酶(1 mg/mL)消化, 1640 培养基培养的细胞培养 24 h 后多处于悬浮状态。这种现象可能是因为胰蛋白酶可水解与赖氨酸或精氨酸相连接的肽键, 细胞间的蛋白质发生水解使细胞离散, 有利于消化上皮、胚胎等细胞间质较少的软组织

(任文洁等, 2022), 这与瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)原代肠细胞的培养研究结果一致(徐悦, 2021)。DMEM 培养基被广泛用于细胞原代培养, 如黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)肠上皮细胞(Pan *et al*, 2022)、牙鲆成纤维细胞(Nie *et al*, 2021)和大西洋鲱(*Acipenser oxyrinchus*)幼虫细胞(Grunow *et al*, 2011)等, 这与本研究结论一致。但有些鱼类组织细胞培养采用其他培养基, 如尖吻鲈(*Lates calcarifer*)肌肉细胞采用 L-15 培养基(Lai *et al*, 2008), 塔里木裂腹鱼(*Schizothorax biddulphi*)尾鳍细胞采用 DME/F12 培养基(代金彩等, 2022), 这表明鱼类细胞的最适培

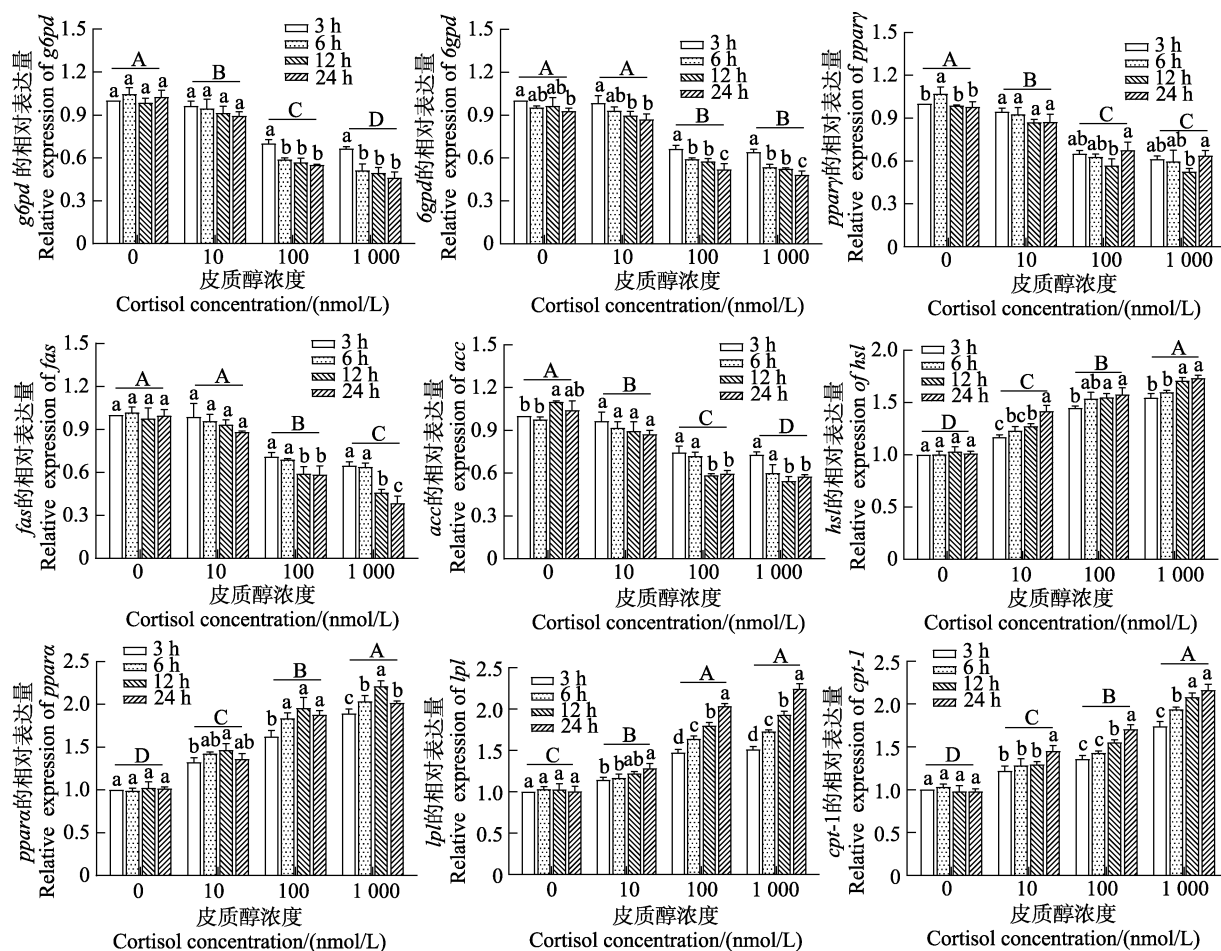


图8 皮质醇对肠上皮细胞脂代谢相关基因表达的影响

Fig.8 Effects of the cortisol on the expression levels of lipid metabolism-related genes in intestinal epithelial cells

养基与鱼类的种类和组织有关。

3.2 皮质醇诱导暗纹东方鲀肠上皮细胞氧化应激

通过 CCK-8 法检测细胞活力, 结果显示, 与对照组相比, 随着皮质醇处理浓度的上升, 暗纹东方鲀肠上皮细胞活力呈显著下降的趋势($P < 0.05$), 这可能与细胞在皮质醇处理 24 h 后氧化应激显著上升有关, 还可能是高浓度皮质醇破坏了肠细胞的完整性进而导致其细胞活力下降。在鱼类受到胁迫时, 机体内 ROS 含量会显著上升, 其中超氧阴离子、过氧化氢和羟基自由基是导致细胞内生物大分子如蛋白质、脂质等损伤的重要物质(Alfadda *et al.*, 2012), 当机体内 ROS 的生成速率高于机体的清除能力时, 细胞稳态遭到破坏, 产生氧化应激。鱼类为防止机体内 ROS 的积累, 会激活体内的酶抗氧化系统来清除过量的 ROS, SOD、CAT 和 GSH-Px 则是重要的抗氧化酶类, 也是评价氧化应激水平的重要指标(Dasgupta *et al.*, 2016)。其中, SOD 可将超氧阴离子歧化为 O_2 和 H_2O_2 , 紧接着 CAT 协同 GSH-Px 将有毒的 H_2O_2 分解为 H_2O

和 O_2 , 避免对机体造成氧化损伤(Liu *et al.*, 2011)。过往研究表明, 当鱼类产生氧化应激时, 其机体内皮质醇水平会显著上升(Gozdowska *et al.*, 2022), 且皮质醇含量与抗氧化酶活力具有一定的关联性(Ren *et al.*, 2020)。本研究发现, 暗纹东方鲀肠上皮细胞中 *sod*、*cat* 和 *gsh-px* 抗氧化酶基因在皮质醇刺激下表达上调, 且具有剂量和时间依赖性, 说明皮质醇刺激使得暗纹东方鲀肠上皮细胞酶抗氧化系统被激活, 机体通过上调抗氧化酶基因表达产生大量抗氧化酶, 以清除应激时产生的过量 ROS。值得注意的是, *gsh-px* 基因的表达量在 10 nmol/L 皮质醇组和对照组之间无显著性差异, 推测是 GSH-Px 和 CAT 之间存在互补代偿效应, 导致前者转录水平被削弱(唐功, 2010)。线粒体是产生 ROS 的主要场所, 是评判氧化应激的标志细胞器。本研究透射电镜结果显示, 暗纹东方鲀肠上皮细胞在皮质醇刺激下, 线粒体数量明显增加, 线粒体结构完整性被破坏, 这与皮质醇胁迫 HT22 细胞结果一致(Xu *et al.*, 2019)。上述研究结果表明, 皮质醇刺激会引起暗纹东方鲀肠上皮细胞氧化应激, 细胞

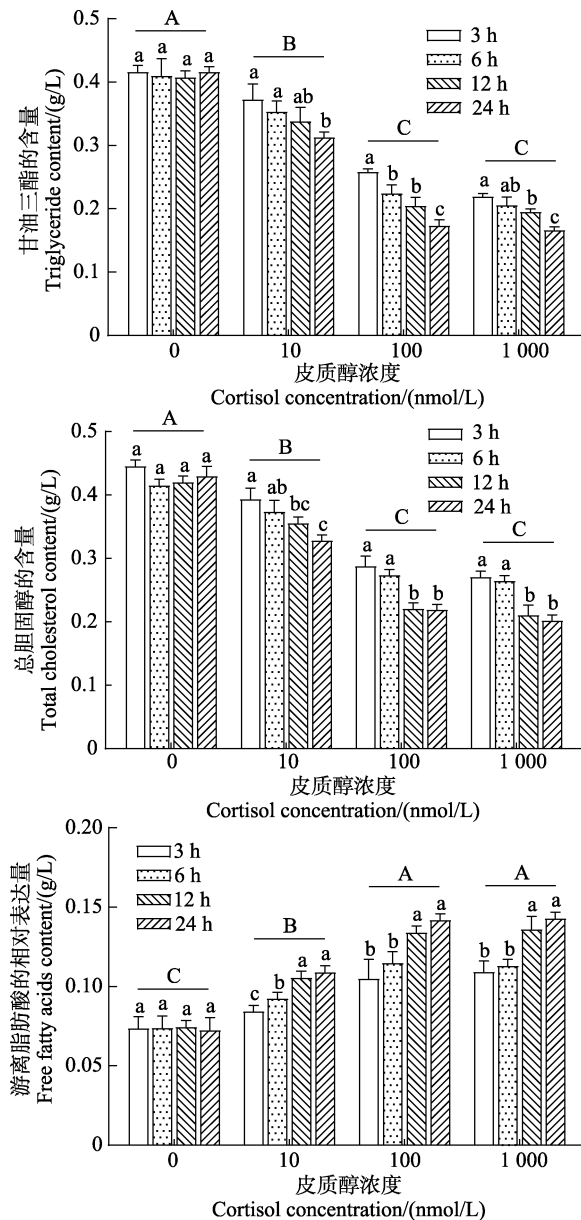


图9 皮质醇对肠上皮细胞生化指标的影响
Fig.9 Effects of cortisol on biochemical indices of intestinal epithelial cells

内 *sod*、*cat* 和 *gsh-px* 转录上调以减少氧化应激对机体带来的损伤。

3.3 皮质醇诱导暗纹东方鲀肠上皮细胞凋亡

研究表明,皮质醇刺激不仅会引发细胞氧化应激反应,还会引发细胞凋亡(Xu *et al.*, 2019)。本研究中,与对照组相比,皮质醇刺激显著提高了暗纹东方鲀肠上皮细胞凋亡率,且凋亡指数呈剂量依赖性增长,这与原代培养的银鲷(*Sparus sarba*)巨噬细胞(SSM)在皮质醇暴露后的结果相似(Deane *et al.*, 2006)。目前,线粒体凋亡信号通路是最主要的细胞凋亡途径(Karpnich *et al.*, 2002)。Bcl-2 家族是启动细胞凋亡的

重要因子,Bax 是 Bcl-2 家族关键的促凋亡蛋白,Bcl-2 是抗凋亡蛋白,在正常状态下,二者均以同源二聚体的形式存在(Yuan *et al.*, 2016)。当细胞受到外界刺激时,线粒体外膜上会聚集大量的 Bax,从而使线粒体通透性转化孔(MPTP)开放,线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)下降,胞浆中的细胞色素 C (Cyt C)因而易位到胞质中,并与凋亡蛋白酶激活因子(Apaf)结合以激活 Caspase-9,活化后的 Caspase-9 再进一步激活 Caspase-3 和 Caspase-7,进而诱发 Caspase 级联反应引发细胞凋亡。而 Bcl-2 则可以通过与 Bax 结合形成更稳定的 Bcl-2/Bax 异源二聚体或通过阻断 Cyt C 的释放来抑制细胞凋亡(Estaquier *et al.*, 2012)。p53 是重要的核转录因子,参与细胞生长和凋亡等过程,在细胞的正常生长中发挥重要作用,可通过调控 Bax 的表达介导线粒体凋亡信号通路(Zaib *et al.*, 2022)。

已有报道,*caspase-3* 和 *bax* 等凋亡相关基因在皮质醇刺激后表达出上调的模式(万学斌, 2017)。本研究中,皮质醇刺激可使暗纹东方鲀肠上皮细胞中促凋亡基因 *caspase-9*、*caspase-7* 和 *caspase-3* mRNA 表达量显著上升,且分别在皮质醇处理 6、12 和 24 h 后达到最大值,推测是由于 Caspase-9 是凋亡的启动者,而 Caspase-7 和 Caspase-3 是凋亡的执行者,所以 Caspase-9 对于凋亡的响应更早。此外,*bax* 和 *p53* 基因的转录水平也随着皮质醇处理浓度和时间的上升而显著上升,*bcl-2* 基因的转录水平则随着皮质醇处理浓度的上升而显著下降。这些现象也发生在其他物种中,如小鼠(*Mus musculus*) HT22 细胞在皮质醇刺激后 Cleaved-Caspase9、Cleaved-Caspase3 和 Bax/Bcl-2 等蛋白含量均上升(Xu *et al.*, 2019)。以上结果都说明皮质醇刺激可以诱导细胞凋亡。

3.4 皮质醇诱导暗纹东方鲀肠上皮细胞脂代谢失衡

鱼类机体的物质调控受基因表达量的影响。研究表明,G6PD 和 6GPD 是磷酸戊糖途径的关键酶(Reyes *et al.*, 2022)。PPAR γ 在参与和调控脂肪细胞分化和脂代谢方面发挥重要作用(Lim *et al.*, 2016)。FAS 和 ACC 可以催化乙酰辅酶 A 生成饱和脂肪酸棕榈酰酯,其基因表达量直接影响机体脂肪合成量(张雨等, 2019)。本研究中,暗纹东方鲀肠上皮细胞在受到皮质醇刺激后,细胞内参与脂肪合成的 *g6pd*、*6gpd*、*ppar γ* 、*fas* 和 *acc* 基因表达量均显著下调,说明皮质醇抑制了肠上皮细胞脂肪的合成,这与罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)肝细胞在皮质醇刺激下的研究结果相似(Sunny *et al.*, 2002)。PPAR α 是调控脂代谢相关基因的上游转录因子,可通过诱导 *cpt-1* 基因的表达来增强

脂肪酸 β 氧化(Ribet *et al.*, 2010)。本研究表明, 暗纹东方鲀肠上皮细胞在皮质醇刺激下, *ppara* 和 *cpt-1* 基因的 mRNA 表达水平显著上升, 说明皮质醇提高了肠细胞内脂肪酸 β 氧化水平。研究表明, 皮质醇刺激可上调斜带石斑鱼肝细胞 *hsl* 和 *lpl* 基因的表达(骆源, 2016), HSL 能促进脂肪分解为甘油和脂肪酸, 在 TG 的水解过程中起到催化作用(Haemmerle *et al.*, 2002), LPL 能催化 TG 水解成 NEFA (Nilsson-Ehle *et al.*, 1980)。本研究中, 随着皮质醇处理浓度的上升, *hsl* 和 *lpl* 基因的 mRNA 表达水平均显著上升, 验证了肠上皮细胞内 TG 和 TC 含量下降、NEFA 含量上升的结果。

4 结论

综上所述, 本研究建立了暗纹东方鲀原代肠上皮细胞的最适分离培养方法, 同时, 发现肠上皮细胞活力与皮质醇浓度呈负相关。皮质醇能够促进暗纹东方鲀肠上皮细胞的氧化应激与细胞凋亡。此外, 皮质醇可以促进暗纹东方鲀肠上皮细胞脂肪的分解并抑制脂肪的合成。

参 考 文 献

- ALFADDA A A, SALLAM R M. Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 936486
- BATTLE T, STACEY G. Cell culture models for hepatotoxicology. *Cell Biology and Toxicology*, 2001, 17(4/5): 287–299
- BELUSHKINA N N, SEVERIN S E. Molecular mechanisms of apoptosis pathology. *Arkhiv Patologii*, 2001, 63(1): 51–60
- CARBAJAL A, REYES-LOPEZ F E, TALLO-PARRA O, *et al.* Comparative assessment of cortisol in plasma, skin mucus and scales as a measure of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis activity in fish. *Aquaculture*, 2019, 506: 410–416
- COCKREM J F, BAHRY M A, CHOWDHURY V S. Cortisol responses of goldfish (*Carassius auratus*) to air exposure, chasing, and increased water temperature. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 270: 18–25
- DAI J C, NIE Z L, ZHAO N H, *et al.* Establishment and the effect of salinity of cell lines derived from tail fin of *Schizothorax biddulphi*. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(4): 70–80 [代金彩, 聂竹兰, 赵年桦, 等. 塔里木裂腹鱼尾鳍细胞系的建立及盐碱度对其增殖的影响. *渔业科学进展*, 2022, 43(4): 70–80]
- DASGUPTA S, DIGIULIO R T, DROLLETTE B D, *et al.* Hypoxia depresses CYP1A induction and enhances DNA damage, but has minimal effects on antioxidant responses in sheephead minnow (*Cyprinodon variegatus*) larvae exposed to dispersed crude oil. *Aquatic Toxicology*, 2016, 177: 250–260
- DEANE E E, ZHOU L R, WOO N Y S. Cortisol can be pro- or anti-apoptotic in sea bream cells: Potential role of HSP70 induction for cytoprotection. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006, 259(1/2): 57–64
- ESTAQUIER J, VALLETTE F, VAYSSIERE J L, *et al.* The mitochondrial pathways of apoptosis. In: SCATENA R, BOTTONI P, GIARDINA B (eds). *Advances in mitochondrial medicine. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012, 942: 157–183
- FOYER C H, SHIGEOKA S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 2011, 155(1): 93–100
- GAUVREAU N L, BRAGG L M, DHIYEBI H A, *et al.* Impacts on antioxidative enzymes and transcripts in darter (*Etheostoma* spp.) brains in the Grand River exposed to wastewater effluent. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2022, 258: 109381
- GOIKOETXEA A, TODD E V, MUNCASTER S, *et al.* Effects of cortisol on female-to-male sex change in a wrasse. *PLoS One*, 2022, 17(9): e0273779
- GONG J, ZHU M R, ZHAN M, *et al.* Cytochrome c gene in *Procambarus clarkii* inhibits WSSV infection by regulating the apoptosis pathway. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(1): 137–146 [公洁, 祝孟茹, 占铭, 等. 克氏原螯虾细胞色素 c 基因通过调节凋亡途径抑制 WSSV 感染. *渔业科学进展*, 2023, 44(1): 137–146]
- GOZDOWSKA M, SOKOLOWSKA E, POMIANOWSKI K, *et al.* Melatonin and cortisol as components of the cutaneous stress response system in fish: Response to oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2022, 268: 111207
- GRUNOW B, NOGLICK S, KRUSE C, *et al.* Isolation of cells from Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* and optimization of culture conditions. *Aquatic Biology*, 2011, 14(1): 67–75
- HAEMMERLE G, ZIMMERMANN R, HAYN M, *et al.* Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(7): 4806–4815
- HUANG C C, SUN J, JI H, *et al.* Effect of α -lipoic acid on lipid content and lipid metabolism related gene expression in *Ctenopharyngodon idellus* adipocyte. *Freshwater Fisheries*, 2020, 50(1): 87–92 [黄陈翠, 孙健, 吉红, 等. 硫辛酸对草鱼脂肪细胞脂质含量及脂代谢相关基因表达的影响. *淡水渔业*, 2020, 50(1): 87–92]
- HUMMASTI S, TONTONNOZ P. The peroxisome proliferator-activated receptor N-terminal domain controls isotype-

- selective gene expression and adipogenesis. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(6): 1261–1275
- JEREZ-CEPA I, FERNÁNDEZ-CASTRO M, DEL SANTO O'NEILL T J, *et al.* Transport and recovery of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) sedated with clove oil and MS-222: Effects on stress axis regulation and intermediary metabolism. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 612
- KANG X, AMEVOR F K, ZHANG L, *et al.* Study on the major genes related with fat deposition in liver and abdominal fat of different breeds of chicken. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 2022, 24(1): eRBCA-2020-1373
- KARPINICH N O, TAFANI M, ROTHMAN R J, *et al.* The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(19): 16547–16552
- KERNER J, HOPPEL C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2000, 1486(1): 1–17
- KOSTYNIUK D J, CULBERT B M, MENNIGEN J A, *et al.* Social status affects lipid metabolism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2018, 315(2): R241–R255
- LAI Y S, CHIOU P P, CHEN W J, *et al.* Characterization of apoptosis induced by grouper iridovirus in two newly established cell lines from barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(11): 825–834
- LANGAN L M, OWEN S F, JHA A N. Establishment and long-term maintenance of primary intestinal epithelial cells cultured from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biology Open*, 2018, 7(3): bio032870
- LÉGER J A D, ATHANASIO C G, ZHERA A, *et al.* Hypoxic responses in *Oncorhynchus mykiss* involve angiogenesis, lipid, and lactate metabolism, which may be triggered by the cortisol stress response and epigenetic methylation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2021, 39: 100860
- LEUNG L Y, WOO N Y S. Effects of growth hormone, insulin-like growth factor I, triiodothyronine, thyroxine, and cortisol on gene expression of carbohydrate metabolic enzymes in sea bream hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2010, 157(3): 272–282
- LIANG C, QIAO L Y, HAN Y L, *et al.* Regulatory roles of SREBF1 and SREBF2 in lipid metabolism and deposition in two Chinese representative fat-tailed sheep breeds. *Animals*, 2020, 10(8): 1317
- LIM S, CHOI H, PARK S S, *et al.* Fenoxycarb promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Entomological Research*, 2016, 46(1): 80–84
- LIU X Q, LI K F, DU J, *et al.* Growth rate, catalase and superoxide dismutase activities in rock carp (*Procypris rabaudi* Tchang) exposed to supersaturated total dissolved gas. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2011, 12(11): 909–914
- LUO Y. Primary culture of hepatocytes from grouper (*Epinephelus Coioides*) and effect of cortisol on the metabolism of hepatocytes. Master's Thesis of Jimei University, 2016 [骆源. 斜带石斑鱼肝细胞原代培养及皮质醇对其代谢的影响. 集美大学硕士研究生学位论文, 2016]
- LUO Y, ZHANG C X, WANG L, *et al.* Study on the isolation and primary culture of hepatocytes from liver of grouper (*Epinephelus coioides*). *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(4): 558–565 [骆源, 张春晓, 王玲, 等. 斜带石斑鱼肝细胞分离及原代培养方法的建立. 水产学报, 2016, 40(4): 558–565]
- NIE M M, WU Z H, YOU F. Derivation and characterization of a new embryonic cell line from the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2021, 21(4): 159–167
- NILSSON-EHLE P, GARFINKEL A S, SCHOTZ M C. Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 1980, 49: 667–693
- PAN H B, CHEN H Q, CHEN L S, *et al.* Establishment and characterization of a liver cell line from black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture Reports*, 2022, 25: 101213
- QI Z T, YAN D, XIONG F, *et al.* Progresses of Bcl-2 proteins in teleost fish and mammals. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, 45(4): 935–944 [齐志涛, 闫冬, 熊凡, 等. 鱼类和哺乳类 Bcl-2 家族蛋白的研究进展. 水生生物学报, 2021, 45(4): 935–944]
- RAMSAY J M, FEIST G W, VARGA Z M, *et al.* Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, 2006, 258(1/2/3/4): 565–574
- REICHARD M, DOUDA K, BLAZEK R, *et al.* Increased plasma cortisol level as acute response to glochidia parasitism. *Environmental Biology of Fishes*, 2023, 106(1): 101–106
- REN W J, LIN Z X. Comparison of isolation and extraction of primary mouse hepatocytes by trypsin and collagenase perfusion. *Journal of Shantou University Medical College*, 2022, 35(4): 204–209 [任文洁, 林哲绚. 胰蛋白酶和胶原酶灌注法分离提取小鼠原代肝细胞的比较. 汕头大学医学院学报, 2022, 35(4): 204–209]
- REN X, ZHANG J Y, WANG L, *et al.* Diel variation in cortisol, glucose, lactic acid and antioxidant system of black sea bass *Centropristis striata* under natural photoperiod. *Chronobiology International*, 2020, 37(2): 176–188
- RIBET C, MONTASTIER E, VALLE C, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- α control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes. *Endocrinology*, 2010, 151(1): 123–133

- SAMARAS A, DIMITROGLOU A, GLENI K E, *et al.* Physiological responses of red seabream (*Pagrus major*) to stress and rearing temperature. *Aquaculture Research*, 2022, 53(6): 2518–2528
- REYES J S, FUENTES-LEMUS E, FIGUEROA J D, *et al.* Implications of differential peroxy radical-induced inactivation of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase for the pentose phosphate pathway. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 21191
- SUNNY F, LAKSHMY P S, OOMMEN O V. Rapid action of cortisol and testosterone on lipogenic enzymes in a fresh water fish *Oreochromis mossambicus*: Short-term *in vivo* and *in vitro* study. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 131(3): 297–304
- TAKAGI C, TAKAHASHI H, KUDOSE H, *et al.* Dual *in vitro* effects of cortisol on cell turnover in the medaka esophagus via the glucocorticoid receptor. *Life Sciences*, 2011, 88(5/6): 239–245
- TANG G. The discuss on the relationship among reactive oxygen species, antioxidant enzyme and antioxidant. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(33): 18619–18621 [唐功. 活性氧·抗氧化酶及抗氧化剂之间关系的探讨. *安徽农业科学*, 2010, 38(33): 18619–18621]
- VALLEJOS-VIDAL E, KHANSARI A R, SOLIVA-DUESO L, *et al.* The direct exposure of cortisol does not modulate the expression of immune-related genes on tissue explants of mucosal surfaces in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) nor in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 828050
- VARGAS-CHACOFF L, REGISH A M, WEINSTOCK A, *et al.* Effects of long-term cortisol treatment on growth and osmoregulation of Atlantic salmon and brook trout. *General and Comparative Endocrinology*, 2021, 308: 113769
- WAN X B. Analysis of the deterioration of porcine meat quality responds to increased cortisol based on transcriptome sequencing. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 [万学斌. 基于转录组测序技术分析皮质醇对猪肉质的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2017]
- XIE T, GAO Y T, QIN H Y, *et al.* Physiological response of spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) during transportation in offshore aquaculture net pen. *Aquaculture*, 2023, 563: 739029
- XU B, LANG L M, LI S Z, *et al.* Cortisol excess-mediated mitochondrial damage induced hippocampal neuronal apoptosis in mice following cold exposure. *Cells*, 2019, 8(6): 612
- XU Y. Calmodulin expression mechanism of gill and intestinal tissues and primary cultured its cells of *Leuciscus waleckii* in the environment of alkali stress tolerance. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2021 [徐悦. 瓦氏雅罗鱼鳃、肠组织及原代细胞在碱胁迫下的钙调蛋白表达机制研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2021]
- YAMASHITA M. Apoptosis in zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(4): 731–742
- YAO C R, MA P, LI D P, *et al.* Protective effect of selenium on the oxidative damage of liver cells induced by sodium nitrite in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, 45(5): 986–994 [姚朝瑞, 马聘, 李大鹏, 等. 硒对亚硝酸钠导致的草鱼肝细胞氧化损伤的保护作用. *水生生物学报*, 2021, 45(5): 986–994]
- YAO S B, YE Y T, CAI C F, *et al.* Dissociation and primary culture of *Ctenopharyngodon idellus* intestinal epithelial cells. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(1): 33–41 [姚仕彬, 叶元土, 蔡春芳, 等. 草鱼肠道粘膜上皮细胞的分离与原代培养. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(1): 33–41]
- YUAN X C, LIU Y S, SHI Y H, *et al.* Growth performance of *Takifugu obscurus* and water quality variation in three aquaculture modes. *Fisheries Science and Technology Information*, 2021, 48(1): 14–20 [袁新程, 刘永士, 施永海, 等. 3种养殖模式下暗纹东方鲀的生长及水质变化. *水产科技情报*, 2021, 48(1): 14–20]
- YUAN Z, LIU S H, YAO J K, *et al.* Expression of *Bcl-2* genes in channel catfish after bacterial infection and hypoxia stress. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 65: 79–90
- ZAIB S, HAYYAT A, ALI N, *et al.* Role of mitochondrial membrane potential and lactate dehydrogenase A in apoptosis. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2022, 22(11): 2048–2062
- ZHANG Y J, CHEN W, MAI K S, *et al.* *In vitro* assay for evaluating the effects of three anti-nutritional factors on the primary-cultured intestinal epithelial cells isolated from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Research*, 2015, 46(1): 242–251
- ZHANG Y, SHI L G, XUN W J, *et al.* Research progress of regulation of fat metabolism enzyme gene by energy level and hormone. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(8): 3505–3510 [张雨, 施力光, 荀文娟, 等. 能量水平和激素对脂肪代谢酶基因的调控研究进展. *动物营养学报*, 2019, 31(8): 3505–3510]

***In vitro* Culture Method for Intestinal Epithelial Cells of *Takifugu fasciatus* and the Cortisol Effect on its Physiological Characteristic**

LIU Yuxi^{1,2}, SUN Yiru^{1,2}, WANG Sijin^{1,2}, MA Sisi^{1,2}, YU Weifeng^{1,2}, YIN Shaowu^{1,2①}, WANG Tao^{1,2①}

(1. College of Marine Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Province Engineering Research Center for Aquatic Animals Breeding and Green Efficient Aquacultural Technology, Nanjing 210023, China)

Abstract Stress is a nonspecific response that occurs when the body is stimulated by internal and external stimuli. When the stress levels exceed the body's tolerance threshold, physiological and biochemical changes occur that affect homeostasis within the internal environment. *Takifugu fasciatus* is an important cultured fish species in China, and its demand in the aquatic market has increased in recent years. Stress is extremely harmful to *T. fasciatus* farming, and cortisol is considered an essential marker for determining the stress response of fish, as it changes significantly within the organism under stress. The intestine is a contact medium between fish and the external environment and can respond to physiological stress levels. Although the study of fish intestinal responses to stress is a global research focus, the role of the *T. fasciatus* intestinal tract in response to stress remains unclear. In this study, intestinal epithelial cells of *T. fasciatus* were cultured using four different methods: Trypsin (0.25%) with DMEM, trypsin (0.25%) with RPMI 1640, type I collagenase (1 mg/mL) in DMEM, and type I collagenase (1 mg/mL) in RPMI 1640 to establish an *in vitro* culture method for primary intestinal epithelial cells of *T. fasciatus*. The effects of different concentrations of cortisol on oxidative stress, apoptosis, and lipid metabolism were investigated. The study methodology involved disinfecting of *T. fasciatus* with 75% alcohol and subsequently anesthetizing with MS-222. Furthermore, the intestines were removed and cleansed using PBS containing 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The intestines were then sectioned into 1.5 mL centrifuge tubes with digestive solutions and digested at 28 °C for 30 min. Cells were subsequently centrifuged at 1 000 r/min for 5 min at 4 °C, and resuspended in a new complete medium (DMEM containing 20% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin). The proliferation rate of intestinal epithelial cells under the four culture methods was determined within 5 d using the CCK-8 method, and cell growth was observed under a microscope after 24 h of culture. Cortisol solutions at varying concentrations were diluted with complete medium, and the cell viability of *T. fasciatus* was measured using the CCK-8 method after cortisol treatment (0, 100, 1 000, 2 000, 3 000, and 5 000 nmol/L) for 24 h. The morphological structure of intracellular mitochondria was observed through transmission electron microscopy after cortisol treatment (0, 10, 100, and 1 000 nmol/L) for 24 h. After cortisol treatment (0, 10, 100, and 1 000 nmol/L) for 3, 6, 12, and 24 h, the expression patterns of oxidative stress-related genes, apoptosis-related genes, and lipid metabolism-related genes in intestinal epithelial cells were measured by real-time fluorescence-based quantitative PCR (qRT-PCR). Cell apoptosis was measured using the Annexin V-FITC/PI method, and the contents of triglycerides, total cholesterol, and free fatty acids were measured using kits from Nanjing Jiancheng Co. The results showed that the intestinal epithelial cells cultured with trypsin (0.25%) digestion and DMEM had the highest cell proliferation rate among the four culture methods, with predominantly fibroblast-like cell morphology and the best apposition. At a cortisol concentration of 1 000 nmol/L, the intestinal epithelial cell viability was 0.8 times that of the control group, with no significant difference between the 1 000 nmol/L

① Corresponding author: YIN Shaowu, Email: yinshaowu@163.com; WANG Tao, Email: seawater88@126.com

cortisol-treated group and the 2 000 nmol/L cortisol-treated group. However, the cell viability significantly decreased when the cortisol concentration exceeded 2 000 nmol/L ($P<0.05$). Thus, 1 000 nmol/L or lower was selected for cortisol treatment. Transmission electron microscopy revealed that the mitochondrial structure of intestinal epithelial cells was altered in all the cortisol-treated groups, with an increase in the number of mitochondria. The expression of oxidative stress-related genes (*sod*, *cat*, and *gsh-px*) and apoptotic index significantly increased with increasing cortisol treatment concentration and time. Pro-apoptotic genes (*caspase-3*, *caspase-7*, *caspase-9*, *bax* and *p53*) increased significantly, while anti-apoptotic gene *bcl-2* expression decreased significantly with the increase of cortisol treatment concentration ($P<0.05$). The expression of lipid synthesis-related genes (*g6pd*, *6gpd*, *ppary*, *fas* and *acc*) decreased significantly and lipolysis-related genes (*hsl*, *ppara*, *lpl* and *cpt-1*) increased significantly with increasing cortisol treatment concentration ($P<0.05$). Triglyceride and total cholesterol contents decreased significantly, whereas the free fatty acids content increased significantly with increasing cortisol treatment concentration and time ($P<0.05$). These results indicate that trypsin (0.25%) digestion with DMEM is optimal for culture of primary intestinal epithelial cells of *T. fasciatus*. Cortisol promotes oxidative stress, apoptosis, and lipid decomposition but suppresses lipid synthesis in intestinal epithelial cells of *T. fasciatus*. This study established the optimal isolation and culture method for primary intestinal epithelial cells of *T. fasciatus* and investigated the mechanism of the intestinal response to cortisol stress in *T. fasciatus*, thus providing a theoretical basis for the subsequent anti-stress culture of fish.

Key words *Takifugu fasciatus*; Intestinal epithelial cell; Cortisol; Oxidative stress; Cell apoptosis; Lipid metabolism

《渔业生态系统动力学》书评

金显仕

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071)

当今世界,海洋渔业资源的可持续利用面临巨大挑战,人们广泛呼吁应将生态学原理纳入渔业管理中,践行“基于生态系统的渔业管理(EBFM)”理念。渔业生态系统作为生态—社会耦合系统具有内在的复杂性,阻碍了 EBFM 的实践,亟需科学的技术和方法作为支撑。在此背景下,渔业生态系统动力学衍生而出,并在近 20 年得到迅速发展,有力推动着 EBFM 在全球实践推广。

《渔业生态系统动力学》是美国国家海洋和大气管理局(NOAA)东北渔业科学中心资深科学家 Michael Fogarty 和罗德岛大学教授 Jeremy Collie 所著《Fishery Ecosystem Dynamics》(2020)的中文译本,由中国农业出版社 2024 年 7 月出版。该书系统介绍了渔业生态系统动力学的基础理论与评估方法,在概述经典生态模型及其特性的基础上,进一步阐释了这些模型背后的生态过程和机制。

该书不仅系统而完善地梳理了近年来渔业生态系统动力学的研究进展,更着重从个体、种群、群落等多角度解读渔业生态系统,以期拓宽研究视野,并通过融入丰富的案例,将前沿理论与实践结合,有助于读者获得全面而深入的理解。数学模型是对现实的抽象,而现实世界往往比模型的描述要复杂得多,构建模型的目的是将问题简化、直指其核心,这一点在本书中反复体现。在写作手法上,作者非常注重可读性,采取逐步递进的方式,由简至繁,详细地展示了模型的发展过程。此外,该书还配套了 R 语言代码,方便读者重现各章节介绍的研究示例,非常适合作为渔业资源、海洋生态学等专业的本科生、研究生教材,也为渔业科技工作者、管理者以及其他想要了解海洋生态系统的人员提供了不可多得的宝贵资料。

(书评推荐人:中国农业出版社 王金环)