

DOI: 10.12264/JFSC2021-0068

草鱼肾中性粒细胞的分离鉴定与活性检测

常藕琴¹, 霍礼霞^{1,2}, 罗满林², 石存斌¹, 张德峰¹, 潘厚军¹, 任燕¹

1. 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技术重点实验室, 广东 广州 510380;
2. 华南农业大学, 广东 广州 510225

摘要: 分离纯化草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肾中性粒细胞、鉴定和检测其活性, 目的在于为研究中性粒细胞的功能和免疫防御机制提供细胞材料。本研究使用鱼类脏器组织中性粒细胞分离试剂盒和差异贴壁法分离获得草鱼肾中性粒细胞; 应用迪夫氏染色、碘化钾-吡罗红 G (KI-Py G)染色、电镜技术鉴定细胞形态, 使用多功能酶标仪检测经 MPA 刺激的细胞活性, 台盼蓝染色法和 CCK-8 检测细胞存活率。结果显示, 获得的细胞大小均一, 细胞核圆形或肾形, 胞质有 A、B 型颗粒, 表面有皱褶, 具有中性粒细胞的形态特征; 细胞纯度达(99.3±0.53)%, 细胞活力达(97.70±0.76)%, 在体外培养 24 h 内细胞存活率可保持在(89.91±3.56)%; 在 PMA 刺激下检测到细胞表达 MPO、ROS、NO 和 NETs 的量显著提高($P<0.05$), 与刺激时间呈正相关。结果证实, 分离的细胞具有很好的活力, 具有中性粒细胞的功能特征。本研究成功建立草鱼中性粒细胞的分离方法, 细胞具有很好的活力, 可为深入研究鱼类中性粒细胞的功能和免疫机制提供基础。

关键词: 草鱼; 中性粒细胞; 分离; 鉴定; 活性检测

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)12-1515-08

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)在中国淡水养殖鱼类中产量最高, 具有重要的经济价值^[1]。随着集约化程度的提高, 病毒、细菌以及多病原混合感染草鱼的疾病频发, 因此致病机理和免疫防控一直都是草鱼病害研究的热点。中性粒细胞(neutrophil, NEU)是非特异性免疫细胞中含量最多的细胞, 也是机体防御病原体入侵机制中反应最快的细胞^[2], 在机体抵抗病原微生物入侵中起到关键作用^[3]。病原微生物入侵时, NEU 迅速聚集在损伤组织, 通过吞噬、释放胞内颗粒、产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)等方式杀灭入侵的病原^[4-5]。近年来研究发现 NEU 可释放胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)^[6]。NETs 是捕获和杀灭病原体入侵并限制病原扩散

的另一种方式, 是 NEU 防御机制研究的新热点^[7-8]。非特异性免疫是水产动物病害免疫防御机制的重点之一, 有关鱼类 NEU 非特异性免疫功能的研究也逐步受到关注。已有资料报道了大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)^[9]和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[10-11]NETs 捕获和抑制细菌的相关研究; 也有关于鲤(*Cyprinus carpio*)^[12-13]NEU 的免疫防御功能和 NETs 形成机制的相关报道。要研究鱼类 NEU 的吞噬、杀灭和捕获病原等功能, 分离纯化有活性的 NEU 成为关键步骤。

人类和哺乳动物的 NEU 分离主要采用 Percoll 密度梯度离心法、免疫磁珠法和流式细胞仪法等方法^[14-15]。鱼类中性粒细胞分离的报道鲜少, 以白细胞分离为主。由于鱼类各种免疫细胞的标志

收稿日期: 2021-02-22; 修订日期: 2021-04-08.

基金项目: 广州市科技计划项目(201904020004); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-45).

作者简介: 常藕琴(1972-), 女, 副研究员, 主要从事水产病害研究. E-mail: changouqin@163.com

通信作者: 石存斌, 研究员. E-mail: shicunbin2006@163.com

性抗体研究尚不成熟,因此免疫磁珠和流式细胞仪等方法还很难开展。目前鱼类白细胞的分离方法主要采用密度梯度离心法从外周血中分离获得。陈全震等^[16]报道了鱼类淋巴细胞分离技术,丰培金等^[17]探讨了鲤外周血白细胞的分离方法,李超等^[18]采用密度离心法探讨了罗非鱼(*Oreochromis sp.*)外周血白细胞的分离最佳条件。外周血分离获得的白细胞数量较少,很难满足细胞功能学研究需求;而中性粒细胞是白细胞的一种,要想获得充足的中性粒细胞,可尝试从免疫组织分离获得。Katzenback 等^[19]分离获得了金鱼肾中性粒细胞,温丽联^[11]使用密度梯度离心法从半滑舌鳎头肾中分离获得中性粒细胞。关于草鱼免疫器官中性粒细胞分离的相关研究迄今未见报道。草鱼的头肾和中肾是主要免疫器官,又是免疫细胞形成和发育的重要器官^[20]。因此本研究从草鱼的免疫器官入手,分离纯化中性粒细胞,对分离获得的中性粒细胞进行形态、标志性酶和活性功能等方面鉴定和检测,旨在为鱼类中性粒细胞的分离方法的建立提供基础和借鉴资料,同时为后期开展 NEU 功能研究提供细胞材料。这对于进一步研究草鱼 NEU 对病原体的天然免疫反应机制和抗菌作用具有重要科学意义。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

平均体重 25~30 g 的草鱼(购自广东省中山市某草鱼养殖基地),水温 28 °C 左右静养 1 周,眼观无异常,随机抽取 3 尾,取鳃、肠做寄生虫观察,取肝、脾、肾等主要器官做细菌培养和 GCRV 检测,确认无病原感染,作为实验健康鱼。

1.2 主要试剂及仪器

鱼类脏器中性粒细胞分离试剂盒(天津灏洋生物制品科技有限公司,中国),RPMI1640、胎牛血清(Gibco 公司,美国),迪夫快速染色试剂盒(Diff-Quick Cell Stain,珠海贝索生物技术有限公司,中国),CCK-8 试剂盒(Beyotime)、佛波醇酯(phorbol12-myristate 13-acetate, PMA)(Sigma 公司,美国),DCFH-DA (Meilunbio)和 DAF-FM (Beyotime 碧云天,中国),DACYTATION 型多功能酶

标仪(BioTek 公司,美国),恒温培养箱(Thermo 公司,美国)。

1.3 中性粒细胞的分离

参考 Katzenback 等^[19]的分离方法,使用鱼类脏器中性粒细胞分离试剂盒进行分离。用 0.1 g/L 三卡因甲基磺酸麻醉 10 尾健康草鱼,在无菌环境下,取出肾组织,称取 0.8 g 于 Hanks 液中,将组织剪成小块,加入组织匀浆液研磨,70 μm 细胞筛网过滤细胞到离心管中,经 450 g 离心 10 min,弃上清,用样本稀释液重悬组织细胞调整浓度为 $2 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ /mL 细胞悬液。取 1 支 15 mL 离心管加入细胞分离液再加入等量细胞悬液,制成梯度界面;1000 g 水平离心 30 min,取白色细胞层,清洗 3 次,将细胞置于含有 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养液的细胞培养瓶中,在 28 °C、5% CO₂ 条件下培养,2~4 h 后换液去除贴壁细胞,收获悬浮中性粒样细胞。将一部分细胞用于台盼蓝染色进行分离细胞活力测定,细胞形态鉴定,剩余细胞在含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中继续培养进行细胞酶活性检测。

1.4 中性粒细胞鉴定

1.4.1 形态鉴定

光学显微镜样品制备 将 10 μL 浓度为 3×10^6 /mL 的细胞悬液置于载玻片,45°角推匀细胞,甲醇固定数秒,晾干玻片;迪夫氏快速染色,ZEISS Axio Scope A1 光学显微镜观察并拍照。

透射电镜样品制备 2.5%戊二醛固定细胞,分级乙醇系列脱水,锇酸后固定,制作超薄切片,经醋酸铀-柠檬酸铅染色,HT-7800 透射电镜下观察细胞的超微形态结构。

扫描电镜样品制备 将浓度为 3×10^6 /mL 的细胞悬液置于细胞爬片,2.5%戊二醛固定,分级乙醇系列脱水、冷冻干燥、镀金,扫描电子显微镜观察并拍照。

1.4.2 标志性酶髓过氧化物酶(MPO)的鉴定 碘化钾-吡咯红 G(KI-Py G)是 MPO 特有的染色方法^[21]。取 200 μL 浓度为 3×10^6 /mL 的细胞置于载玻片上,45°角轻轻推匀细胞,甲醇固定数秒,晾干玻片;加 KI-Py G 工作液染色 1~2 min,缓冲液冲洗染色液,边缘残留染色液用滤纸吸干。ZEISS Axio

Scope A1 光学显微镜观察并拍照。

1.5 纯度和活力检测

取 100 μL 分离获得的细胞混悬液推片, 进行迪夫氏染色, 显微镜下随机选取 10 个视野, 每个视野计数 100 个细胞, 计算分离获得的中性粒细胞的纯度。细胞纯度(%)=(细胞计数/100) \times 100%。

取 200 μL 浓度为 $3\times 10^6/\text{mL}$ 分离获得的细胞混悬液推片, 用 0.4% 台盼蓝进行染色, 镜检。对所有细胞、活细胞和死细胞数目进行计数, 计算细胞活力。计算公式为: 细胞活力(%)=(活细胞数/观察的细胞总数) \times 100%。

1.6 细胞活性检测

1.6.1 NUE 释放 MPO 的检测 将分离的细胞制成浓度为 $3\times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液, 置于 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL , 实验组加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PMA, 对照组不作处理, 每组重复 3 孔。分别置于 5% CO_2 培养箱中 28 $^\circ\text{C}$ 静置 0.5 h、1 h 和 1.5 h 时, 每孔加入 50 μL TMB 显色液, 再加入 50 μL 过氧化氢, 持续显色反应 3 min, 最后加入 2 mol/L 的硫酸 50 μL 终止反应, 多功能酶标仪在 450 nm 下检测其 OD 值。每组设 3 个平行($n=3$), 结果取平均值进行比较。

1.6.2 NUE 释放 ROS 和 NO 的检测 将 10 $\mu\text{m}/\text{L}$ DCFH-DA 和 DAF-FM DA 分别加入无血清培养液制成的中性粒细胞悬液, 5% CO_2 细胞培养箱内 28 $^\circ\text{C}$ 孵育 20 min, 无血清培养液清洗 3 次, HBSS 重悬细胞至浓度为 $3\times 10^6/\text{mL}$, 接种到 96 孔板中, 每孔 100 μL 。实验组加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PMA, 对照组不作处理, 每组重复 3 孔。分别孵育 0.5 h、1 h 和 1.5 h 时使用 DACYTATION 型多功能酶标仪检测其荧光值, 在激发光 485 nm, 吸收光 525 nm 下检测 ROS; 在激发光 495 nm, 吸收光 515 nm 下检测 NO。每组设 3 个平行($n=3$), 结果取平均值进行比较。

1.6.3 NUE 形成 NETs 的检测 将分离的细胞制成浓度为 $3\times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液, 置于 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL , 实验组加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PMA, 对照组不作处理, 每组重复 3 孔。分别置于 5% CO_2 培养箱中 28 $^\circ\text{C}$ 静置 0.5 h、

1 h 和 1.5 h 时, 分别加入终浓度为 3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Sytox Green 胞外 DNA 染色液, 染色 15 min, 使用 DACYTATION 型多功能酶标仪检测其荧光值, 激发光 485 nm; 吸收光 530 nm 下检测 NET。每组设 3 个平行($n=3$), 结果取平均值进行比较。

1.7 细胞存活率的 CCK-8 检测

将 $3\times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液(实验组)和空白细胞培养液(对照组), 分别置于 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μL , 5% CO_2 培养箱中 28 $^\circ\text{C}$ 静置培养, 分别在 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 时加入 CCK-8。在波长 450 nm, 使用 DACYTATION 型多功能酶标仪测 OD 值, 计算细胞存活率, 0 h 的细胞活性基于台盼蓝染色结果。

细胞存活率(%)=(实验组 OD 值-对照组 OD 值)/(0 h 的 OD 值-对照组 OD 值) \times 100%

1.8 统计分析

实验结果用 SPSS18 统计软件处理数据, 使用单因素方差(ANOVA)统计分析, 概率水平 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 细胞形态

2.1.1 光学显微镜形态检测 倒置显微镜观察到分离获得的细胞呈圆形, 大小均一, 细胞核透光度较高, 清亮, 圆形; 胞质透光度较低, 呈灰暗色(图 1a)。经迪夫氏染色的细胞核呈紫红色, 圆形或肾形, 位于细胞的一侧, 胞质呈蓝色(图 1b)。

2.1.2 电子显微镜形态检测 透射电镜观察到细胞大小和形态较为均一, 细胞核呈圆形或肾形, 核分布在细胞的一侧。胞质内含有大量圆形或棒形颗粒, 其中圆形颗粒, 电子密度中等, 数量较少, 为 A 型颗粒; 棒状或杆状颗粒, 电子密度较高, 数量较多, 为 B 型颗粒(图 1c, d)。扫描电镜观察到细胞呈圆形或椭圆形, 大小和形态较为均一, 表面粗糙, 有小皱褶(图 1e, f)。

2.2 标志性酶 MPO

MPO 是中性粒细胞的标志性酶, 细胞经 KI-Py G 染色, 可观察到颗粒状棕褐色, 呈 MPO 阳性(图 2)。

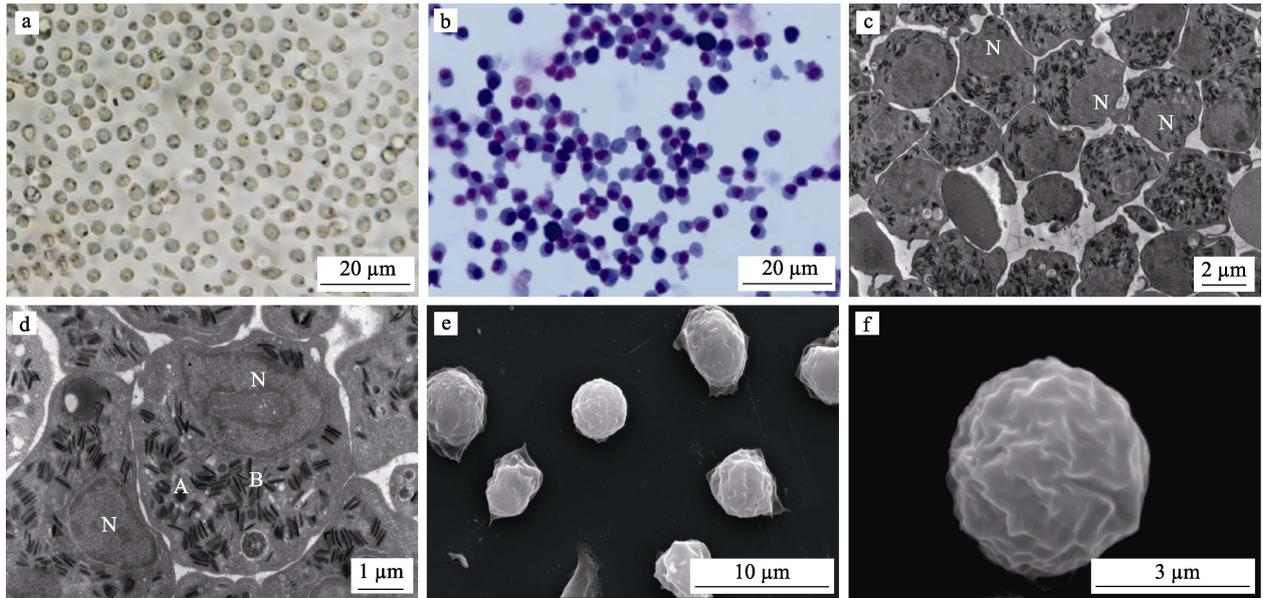


图 1 草鱼中性粒细胞形态观察

a: 分离获得的中性粒细胞; b: 迪夫氏染色的中性粒细胞; c: 透射电镜观察的中性粒细胞;
d: 透射电镜观察放大的中性粒细胞; e: 扫描电镜观察的中性粒细胞; f: 扫描电镜观察放大的中性粒细胞.

A: A 型颗粒; B: B 型颗粒; N: 细胞核.

Fig. 1 Morphological observation of neutrophils of *Ctenopharyngodon idellus*

a: neutrophils isolated from the middle kidney; b: neutrophils stained with Diff; c and d: neutrophils observed by transmission electron microscopy; e and f: neutrophils observed by scanning electron microscope.

A: type A particles; B: type B particles; N: nucleus.

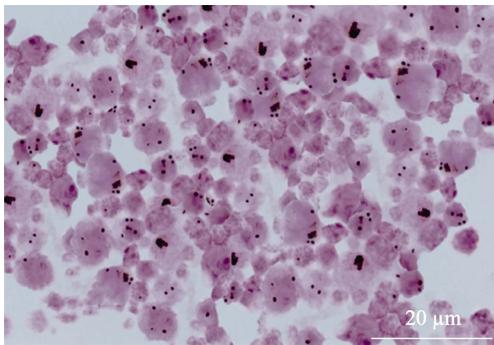


图 2 KI-PYG 染色草鱼中性粒细胞标志性酶 MPO 呈棕褐色颗粒

Fig. 2 MPO of *Ctenopharyngodon idellus* neutrophil showing brown granules stained by the KI-PYG

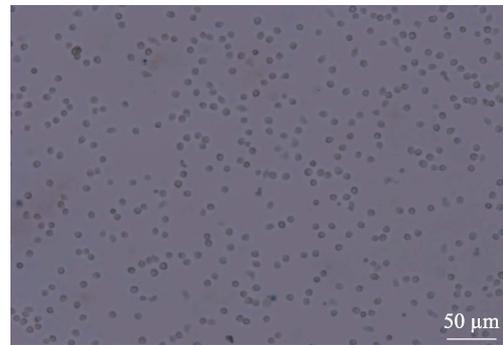


图 3 台盼蓝染色检测草鱼中性粒细胞活性
Fig. 3 *Ctenopharyngodon idellus* neutrophil activity detected by Trypan blue staining

2.3 纯度和活力检测

显微镜下观察迪夫氏染色细胞, 随机选取 10 个视野, 每个视野计数 100 个细胞, 计算出分离获得细胞的纯度可达(99.3±0.53)%。

细胞经台盼蓝染色后, 死亡的细胞可着色浅蓝色, 无光泽; 活细胞保持正常形态, 不着色, 有光泽(图 3)。取 10 个视野统计, 细胞活性无明显差异, 均可达(97.70±0.76)%。

2.4 释放 MPO 和细胞活性

使用多功能酶标仪分别在 0.5 h、1 h 和 1.5 h 时间点检测到对照组和 PMA 刺激的实验组细胞均能表达 MPO, 并且释放量呈增长趋势; 1 h 和 1.5 h 实验组细胞产生 MPO 的能力显著高于对照组($P<0.05$)(图 4A)。采用 DCFH-DA 探针法检测 PMA 刺激细胞释放 ROS 的能力, 对照组和 PMA 刺激的实验组细胞在 0.5 h、1 h 和 1.5 h 时间点均可释放 ROS, 实验组细胞释放 ROS 的量呈增长趋

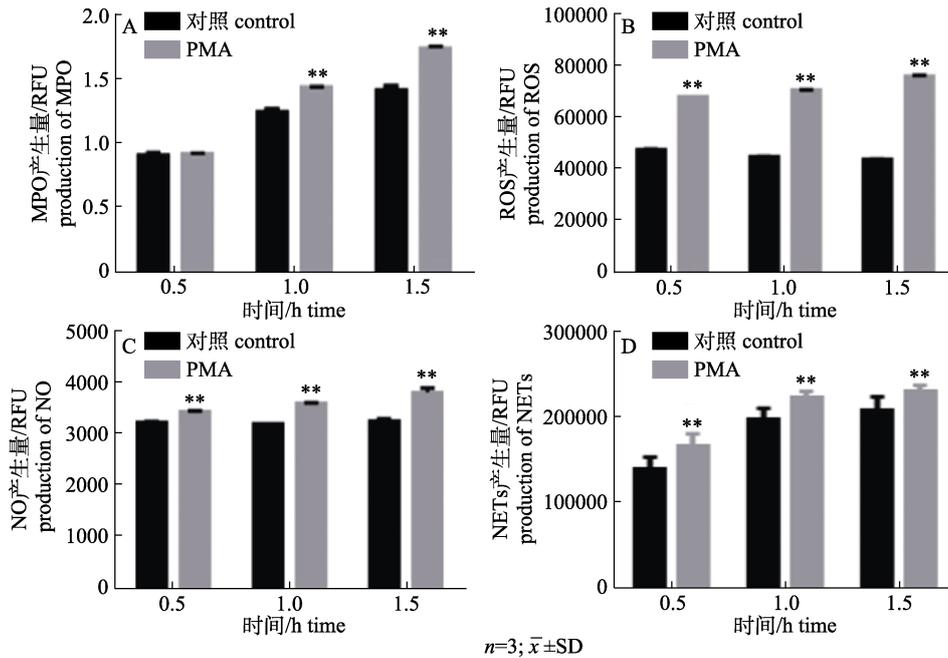


图 4 草鱼中性粒细胞的功能活性检测

A: 髓过氧化物酶; B: 氧自由基; C: 一氧化氮; D: 胞外诱捕网. “***”表示与对照组相比差异显著($P<0.05$).

Fig. 4 Functional activity detection of neutrophils of *Ctenopharyngodon idellus*

A: MPO; B ROS; C: NO; D: NETs. “***” means significant differences comparing with the control group ($P<0.05$)

势, 且各时间点的释放量均显著高于对照组($P<0.05$)(图 4B)。AF-FM DA 探针法检测 PMA 刺激细胞释放 NO 的能力, 对照组和实验组在 0.5 h、1 h 和 1.5 h 时间点均可释放 NO, 实验组均显著高于对照组($P<0.05$), 并且实验组释放量呈增长趋势(图 4C)。检测到 0.5 h、1 h 和 1.5 h 各时间点对对照组和实验组细胞均能形成 NETs, 并且释放量随刺激时间呈增长趋势; 实验组细胞 NETs 形成显著高于对照组($P<0.05$)(图 4D)。

2.5 CCK-8 检测细胞存活率检测

基于台盼蓝染色 0 h 的细胞存活率为(97.70±0.76)%, 通过 CCK-8 试剂盒检测结果显示, 体外培养 24 h 的细胞存活率为(89.91±3.56)%, 48 h 为(65.12±5.50)%, 72 h 为(29.69±1.64)%, 细胞活力随培养时间的延长呈下降趋势, 且在 24 h 内下降较缓慢, 体外培养 24 h 后细胞活性下降较快(图 5)。

3 讨论

纯化获得的细胞经迪夫氏快速染色, 细胞核呈圆形或肾形, 具有中性粒细胞核的特征形态, 与斑马鱼的中性粒细胞特性一致^[22]。透射电镜观察到细胞呈圆形, 圆形或肾形核分布在细胞的一

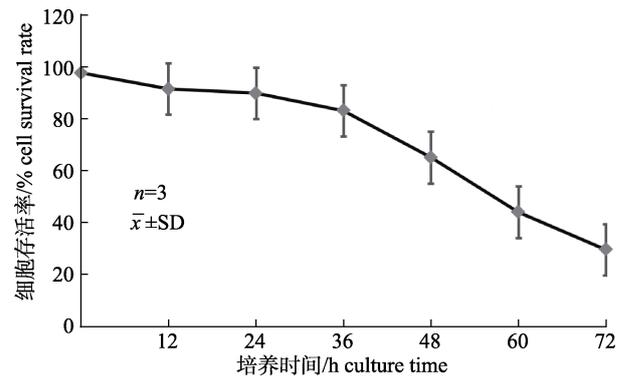


图 5 体外培养草鱼中性粒细胞的存活率变化

Fig. 5 Tendency of *Ctenopharyngodon idellus* neutrophil survival rate *in vitro*

侧, 胞质内含有大量不同形状的分泌颗粒, 与 Kemenade 等^[23]分离的鲤头肾中性粒细胞形态一致; 这些细胞中可观察到大量杆状的 B 型颗粒和少量圆形的 A 型颗粒, 与斑马鱼(*Danio rerio*)血液和脾脏中观察到的中性粒细胞胞质颗粒相似。扫描电镜观察到表面粗糙, 有小皱褶的圆形细胞, 与 Chi 等^[9]分离的大菱鲂头肾中性粒细胞扫描形态一致。因此, 本研究从草鱼肾分离的细胞具有中性粒细胞的形态学特征。

MPO 是 NEU 初级颗粒中高丰度存在的一种

特有酶^[24-25], 已经成为中性粒细胞的功能标志和激活标志^[26]。碘化钾-吡咯红 G (KI-Py G) 染色 MPO 呈棕红色, 是中性粒细胞经典的染色鉴定法^[21]。分离的细胞经 KI-Py G 染色观察到棕褐色 MPO 阳性; 多功能酶标仪也检测到分离细胞可以产生 MPO, 且在 1.5 h 内随时间延长呈增长趋势。PMA 刺激细胞, 检测到实验组和对照组细胞释放 MPO 量可持续增强, 但实验组显著高于对照组, 说明分离获得的细胞具有中性粒细胞特有酶特征, 进一步证实分离细胞为中性粒细胞。

受刺激后的中性粒细胞释放 MPO、ROS、NO 和 NETs, 可评价细胞活性^[27]。检测到受 PMA 刺激的细胞释放 MPO、ROS、NO 和 NETs 的量比对照组显著增多, 并且在检测时间范围内与时间呈正相关, 提示分离获得的中性粒细胞具有很好的活性^[28]。对照组的细胞 MPO 也会随时间延长呈增长趋势, 可能是由于鱼类的肾脏功能类似于哺乳动物的骨髓, 是主要造血器官^[20], 肾组织中的 NEU 是由初级到成熟不同分化阶段的中性粒细胞群^[29], 在细胞发育成熟过程中 MPO 释放量在逐渐增多, 在受到 PMA 刺激时 MPO 的释放量会显著高于对照组, 这与其他硬骨鱼类中性粒细胞的报道一致^[19]。

鱼类中性粒细胞的分离方法尚不成熟。主要是由于鱼类种类繁多, 免疫学研究基础薄弱, 各种鱼类血细胞组成、细胞密度以及形态大小种间差异较大, 各种细胞的标志性抗体都不成熟, 因此分离条件存在差异, 各种鱼类白细胞分离方法都具有不同程度的差异, 至今尚未有一种鱼类成熟通用的白细胞分离方法和统一标准。因此目前主要是采用梯度离心法, 参考哺乳动物的细胞密度, 再依据研究的目的进行改进和优化分离获得需要的白细胞。

本研究参考 Katzenback 等^[19]分离金鱼肾中性粒细胞和小鼠骨髓中性粒细胞分离的方法^[26], 应用鱼类脏器中性粒细胞分离试剂盒, 使用适合草鱼肾粒细胞的离心速度获得细胞, 再经差异性贴壁, 分离纯化获得的细胞纯度达(99.3±0.53)%, 细胞活力达(97.70±0.76)%, 可以释放 MPO、ROS、NO 和 NETs, 具有很好的氧和氮呼吸爆发活性。

分离方法虽使用了规范化的试剂盒, 但是不同鱼类的粒细胞密度不同, 制成梯度界面时要反复尝试, 调整好合适的比例和离心速率, 找到适合草鱼中性粒细胞分离的最佳条件。该方法操作方便简单, 省时省力, 重复性高, 可以满足相关的后续细胞功能研究。但离心速度是细胞分离效果的关键步骤, 离心速度过高、过低都直接影响中性粒细胞分离纯度及回收率, 否则分离效果不理想; 每次实验应使用相同规格的离心管, 标本量应基本一致。

NEU 是髓系细胞分化的终末细胞, 生命周期短, 一般在外周血的寿命为 24~48 h。分离获得的细胞在体外培养 24 h, 细胞的存活率可保持在(89.91±3.56)%以上, 与 Katzenback 等^[19]报道的金鱼肾中性粒细胞样细胞培养 24 h 的结果相似; 随着体外培养时间由 48 h 延长至 72 h, 细胞存活率由(65.12±5.50)%下降至(29.69±1.64)%, 存活率下降较快, 提示体外培养 24 h 之内的细胞可以开展体外实验。关于中性粒细胞体外培养后细胞功能稳定的时间尚无共识, 目前也尚未有分离获得体外稳定培养的中性粒细胞系, 这也是中性粒细胞体外研究的瓶颈。关于建立稳定的中性粒细胞分离方法和体外培养后细胞功能稳定时间是研究中性粒细胞体外实验的关键。因此后续研究将进一步探究便捷稳定的分离条件和延长中性粒细胞在体外培养活性的方法与技术, 为 NEU 的体外功能研究提供有利条件。

综上所述, 本研究分离获得草鱼肾中性粒细胞纯度高、活力好, 可作为体外免疫实验的材料, 为后续开展中性粒细胞功能和免疫机制研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Fisheries Administration Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs. China Fisheries Statistical Yearbook in 2020[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 47. [农业农村部渔业渔政管理局. 2020 年中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 47.]
- [2] Phillipson Mia, Kubes Paul. The neutrophil in vascular inflammation[J]. Nature Medicine, 2011(11): 1381-1390.
- [3] Malhotra S, Limoli D H, English A E, et al. Mixed communities of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*

- exhibit enhanced resistance to host antimicrobials[J]. *mBio*, 2018, 9(2): e00275-18.
- [4] Parker Heather, Dragunow Mike, Hampton Mark B, et al. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2012, 92(4): 841-849.
- [5] Kong W, Zhao J, Kang H, et al. ChIP-seq reveals the global regulator AlgR mediating cyclic di-GMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(17): 8268-8282.
- [6] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303 (5663): 1532-1535.
- [7] Wei Z, Zhang X, Wang J, et al. The formation of canine neutrophil extracellular traps induced by sodium arsenic in polymorphonuclear neutrophils[J]. *Chemosphere*, 2017, 196: 297-302.
- [8] Liu T, Wang F P, Wang G, et al. Role of neutrophil extracellular traps in asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chinese Medical Journal*, 2017, 4(6): 730.
- [9] Chi H, Sun L. Neutrophils of *Scophthalmus maximus* produce extracellular traps that capture bacteria and inhibit bacterial infection[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 56: 7-12.
- [10] Zhao M L, Chi H, Sun L. Neutrophil extracellular traps of *Cynoglossus semilaevis*: production characteristics and anti-bacterial effect[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 290.
- [11] Wen L L. Antimicrobial components of neutrophil extracellular traps in *Cynoglossus semilaevis*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2018. [温丽联. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)中性粒细胞胞外陷阱抗菌组分研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2018.]
- [12] Sun J X, Wang S C, Cao Y R, et al. Cadmium exposure induces apoptosis, inflammation and immunosuppression through CYPs activation and antioxidant dysfunction in common carp neutrophils[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 99(4): 284-290.
- [13] Pijanowski L, Kemenade B, Chadzinska M. Chemokine CXCL1 stimulates formation of NETs in trunk kidney neutrophils of common carp[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 103(2): 103521.
- [14] Zheng X L, LUO B, Mei Z Q, et al. Isolation and purification of human peripheral blood neutrophils using Percoll and immunomagnetic microbeads[J]. *Modern Medicine and Health*, 2011, 27(18): 2723-2724. [郑小莉, 罗波, 梅志强, 等. Percoll 分离法结合免疫磁珠法分离提纯人外周血中性粒细胞方法的建立[J]. *现代医药卫生*, 2011, 27(18): 2723-2724.]
- [15] Johnnidis J B, Harris M H, Wheeler R T, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by micrRNA-223[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1125-1129.
- [16] Chen Q Z, Li Y N, Shao J Z, et al. The separation of lymphocyte from peripheral blood of fish[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, 6(4): 10-12. [陈全震, 李亚南, 邵健忠, 等. 鱼类外周血淋巴细胞的分离技术[J]. *中国水产科学*, 1999, 6(4): 10-12.]
- [17] Feng P J, Lu Q, Li L R, et al. Isolation and in vitro culture of peripheral blood leukocytes from common carp[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2004(4): 369-371. [丰培金, 卢强, 李莲瑞, 等. 鲤鱼外周血白细胞的分离和体外培养[J]. *中国兽医学报*, 2004(4): 369-371.]
- [18] Li C, Cheng M, Wang R L, et al. The optimal separation condition of leucocytes in peripheral blood and the blood cell index in tilapia[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(5): 10-14. [李超, 陈明, 王瑞罗, 等. 罗非鱼外周血白细胞分离与血细胞指数研究[J]. *大连水产学院学报*, 2009, 24(5): 10-14.]
- [19] Katzenback B A, Belosevic M. Isolation and functional characterization of neutrophil-like cells, from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(4): 601-611.
- [20] Lei X B, Chang O Q, Shi C B, et al. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6): 840-850. [雷雪彬, 常藕琴, 石存斌, 等. 草鱼头肾发生组织学与免疫组织化学观察[J]. *水产学报*, 2013, 37(6): 840-850.]
- [21] Chen W X, Zhu H L, Xue M, et al. Comparison of myeloperoxidase staining results of four kinds of potassium iodide and hydrogen peroxide methods[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2008(5): 497-501. [陈万新, 朱红琳, 薛梅, 等. 4 种碘化钾-过氧化氢法髓过氧化物酶染色结果比较[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2008(5): 497-501.]
- [22] Lieschke G J, Oates A C, Crowhurst M O, et al. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish[J]. *Blood*, 2001, 98(10): 3087-3096.
- [23] Kemenade B, Groeneveld A, Rens B, et al. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1994, 187(1): 143-158.
- [24] Wang X D, Sun X J, Liu E X, et al. Microstructure and ultrastructure of zebrafish spleen[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2019, 54(2): 222-235. [王新栋, 孙雪婧, 刘恩雪, 等. 斑马

- 鱼脾显微与超微结构[J]. 动物学杂志, 2019, 54(2): 222-235.]
- [25] Hansson M, Olsson I, Nauseef W M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2006, 445(2): 214-224.
- [26] Yang L, Tian L, Zhou X, et al. Isolation, purification and activity detection of mouse bone marrow neutrophils[J]. Journal of Capital Medical University, 2018, 39(5): 699-703. [杨琳, 田蕾, 周璇, 等. 小鼠骨髓中性粒细胞分离纯化及活性检测研究[J]. 首都医科大学学报, 2018, 39(5): 699-703.]
- [27] Hurtado N M, Makni M K, Gougerot P M A, et al. Assessment of priming of the human neutrophil respiratory burst[J]. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2014, 1124: 405-416.
- [28] Wang Y, Li C X, Sun X W, et al. Optimization and improvement of the method of separation of peripheral blood neutrophils in rats[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(12): 108-112. [王芸, 李春晓, 孙向婉, 等. 大鼠外周血嗜中性粒细胞分离方法的优化改良[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(12): 108-112.]
- [29] Crowhurst M O, Layton J E, Lieschke G J. Developmental biology of zebrafish myeloid cells[J]. The International Journal of Developmental Biology, 2002, 46(4): 483-492.

Isolation, identification, and activity detection of neutrophils from the grass carp kidney

CHANG Ouqin¹, HUO Lixia^{1,2}, LUO Manlin², SHI Cunbin¹, ZHANG Defeng¹, PAN Houjun¹, REN Yan¹

1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province, Guangzhou 510380, China;
2. South China Agricultural University, Guangzhou 510225, China

Abstract: Neutrophils are the most abundant non-specific immune cells and are critical in researching pathogen invasion resistance. Providing abundant cellular materials is fundamental for understanding the function and immune defense mechanisms of neutrophils. In the study, neutrophils were isolated from grass carp kidneys using a fish-tissue neutrophils isolation kit. The neutrophils were purified by the differential adherent method, and their morphology was identified by Diff's staining and electron microscopy. The characteristic enzyme myeloperoxidase (MPO) was identified by potassium iodide and pyrro-red G staining. Using a multifunctional microplate reader, its activity was detected by the ability to express MPO and the ability to release reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), stimulated with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Neutrophils could also form neutrophil extracellular traps (NETs). The expression of MPO and the ability to release ROS, NO, and NETs were detected by a multifunctional enzyme plate analyzer. Survival was detected by the trypan blue staining and CCK-8. Results showed that the isolated cells had the morphological characteristics of neutrophils: they were uniform in size, with round or kidney-shaped nuclei, had type A and B particles in the cytoplasm, and indicated the characteristic enzyme of MPO by staining. Purity reached (99.3±0.53)%, the number of viable cells reached (97.70±0.76)%, and the viability remained at (89.91±3.56)% after they were cultured in vitro for 24 h. By stimulation with PMA, the expression of MPO, ROS, NO, and NETs was significantly increased and positively correlated with time. The method of isolating neutrophils from grass carp was successfully established in this study, as the neutrophils showed increased vitality. Furthermore, this study provides a foundation for further research on the function and immune mechanism of fish neutrophils.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; neutrophils; isolation; identification; activity detection

Corresponding author: SHI Cunbin. E-mail: shicunbin2006@163.com