

添加外源性一氧化氮、細胞激素與脂多醣體對吳郭魚頭腎來源巨噬細胞發生 apoptosis 之影響

¹鄭清福 ²洪紹文 ³林育興 ¹劉邦成 ¹陳明輝 ⁴涂青宇 ¹張鎮璿 ⁵邱繡河 *¹王渭賢

¹國立中興大學獸醫學院獸醫學系 台中市

²中央研究院農業生物科技研究中心 台北市

³元培科技大學護理學系 新竹市

⁴行政院農業委員會農藥藥物毒物試驗所殘毒管制組 台中市

⁵國立中興大學獸醫學院微生物暨公共衛生學研究所

(收件日期：100 年 01 月 11 日。接受日期：100 年 03 月 14 日)

摘要 本研究之目的在於探討一氧化氮 (nitric oxide; NO)、細胞激素與脂多醣體 (lipopolysaccharide; LPS) 對吳郭魚頭腎巨噬細胞免疫功能之影響，並嘗試以流式細胞儀 (flow cytometer) 來分析 NO 對頭腎巨噬細胞的影響。實驗結果發現頭腎巨噬細胞如分別以干擾素- γ (interferon- γ ; IFN- γ) 和 LPS、腫瘤 necrosis 因子- α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α) 及 LPS 與 IFN- γ 作用 24 小時後，均能誘發頭腎巨噬細胞發生 apoptosis，同時發現 IFN- γ 亦可誘發頭腎巨噬細胞發生 necrosis。然而，當添加低濃度的 NO donors 時，結果發現會抑制經 IFN- γ 與 LPS 作用過之頭腎巨噬細胞發生 apoptosis，同時亦發現介白素-4 (interleukin-4; IL-4) 和介白素-10 (interleukin-10; IL-10) 均會抑制頭腎巨噬細胞發生 apoptosis。另外，實驗結果顯示頭腎巨噬細胞經高濃度之 NO donors 誘導 24 小時後，頭腎巨噬細胞會發生 apoptosis，並且其發生之比例會隨著 NO donors 的濃度的提高而增加。[鄭清福、洪紹文、林育興、劉邦成、陳明輝、涂青宇、張鎮璿、邱繡河、* 王渭賢。添加外源性一氧化氮、細胞激素與脂多醣體對吳郭魚頭腎來源巨噬細胞發生 apoptosis 之影響。台灣獸醫誌 37 (3): 169-179, 2011。* 通訊作者 TEL: 886-4-2284 0894 ext 508, FAX: 886-4-22862073, E-mail: wswang@dragon.nchu.edu.tw]

關鍵詞：細胞計畫性死亡，細胞激素，頭腎巨噬細胞，脂多醣體，一氧化氮

緒 言

哺乳類動物之一氧化氮 (nitric oxide; NO) 合成主要是利用精胺酸 (L-arginine) 在一氧化氮合成酵素 (nitric oxide synthase; NOS) 的催化下，將 L-arginine 分解成 L-瓜胺酸 (L-citrulline) 和 NO [20]。有許多的研究結果指出，L-arginine、O₂ 及還原態烟鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH) 為 NO 合成過程中的輔助基質，而血基質 (heme) 和四氫生喋呤 (tet-

rahydrobiopterin; BH₄) 則是合成過程中的輔助因子 [20]。Marletta 等 [20] 指出 L-arginine 會轉化成 L-citrulline 和 NO，而後 NO 再迅速轉變成穩定的亞硝酸鹽 (NO₂⁻) 和硝酸鹽 (NO₃⁻)。另外，在 NO 的合成過程中，N^w-hydroxy-L-arginine 為其反應的中間產物 [20]，但有時反應會生成 L-arginine 的同體異構物如：N-amino-L-arginine、N-hydroxy-L-arginine、L-methyl-ester 及 N-monomethyl-L-arginine (L-NMA) [16,35]。Stuehr 等 [33] 則指出 L-arginine 的同體異構物會與 L-arginine 相互競爭以減少 NO 的

產生，此可能為細胞本身的自我回饋調控機制之一。

在血管內皮細胞方面，NO的主要作用為造成血管擴張而達到調節血壓的功能 [25]，同時亦具有控制血小板凝集與心臟收縮的功能 [24]。在中樞神經系統方面，NO之主要作用與神經傳遞和酵素釋放有關，此包含有神經訊息的傳導、下視丘內分泌的產生、維持神經功能的正常及記憶的形成 [23]。NO在周邊神經系統方面之作用，主要是調節數種血管擴張素，同時具有調節呼吸、胃腸道及泌尿生殖道的功能，並與胃腸的蠕動、膀胱尿道擴約肌的控制及陰莖的勃起有關 [37]。此外，亦有研究報告指出，NO極可能與腎上腺素、胰島素及消化道的酵素分泌有關 [31]。在吞噬細胞和數種上皮細胞方面之作用，NO主要之功能為殺死細胞內和細胞外之微生物 [19]。有文獻指出，哺乳類動物之 CD4⁺ T cell 所分泌的 IFN- γ ，可增加吞噬細胞對病原的吞噬能力，同時可誘導產生NO，進而達到殺菌的功能 [4]。此種毒殺作用之機制，主要是NO與標的細胞之DNA結合，再進一步抑制DNA或蛋白質的合成，或是與酵素上含鐵的碳水化合物結合，進而抑制標的細胞的粒腺體呼吸作用 (mitochondrial respiration)、電位的傳遞及DNA還原酵素 [18]，以達殺死病原的目的。綜合上述之研究結果，可發現NO在非特異性免疫防衛功能上扮演著一個非常重要的角色 [32]。

然而，當體內產生過多的NO時對宿主細胞亦會造成傷害。過量的NO可導致神經發生病變，可能與自發性的帕金森氏症有關 [3]。同時另有其他之研究報告指出，NO和O₂會形成過氧亞硝基陰離子 (peroxynitrite; ONOO⁻)，其可能與細胞之apoptosis和necrosis有關 [3,14,15]。因此，如能有效地抑制NO的產生，則宿主細胞發生apoptosis的比例則有顯著性地降低。

昔日的研究結果報告認為，IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、CSF-M及G/M-CSF等細胞激素和IFN- γ 與巨噬細胞共同作用後，彼此間並不具有加乘之效果使巨噬細胞之NO產量增加。然而，Hauschildt等 [13] 卻指出不僅lipopolysaccharide (LPS)可刺激巨噬細胞產生NO，同時經IFN- γ 誘導後的巨噬細胞，如再與LPS、IL-1 β 、IL-2或TNF- α 的作用，則可促使巨噬細胞產生大量的NO [7]。所以，不同細胞激素對巨噬細胞產生NO的影響是具有加乘作用。因此，細胞激素和LPS對巨噬細胞產生NO和發生apoptosis的機制上，扮演著相當重要的角色。

綜合以上研究結果，發現NO、LPS及細胞激素可影響哺乳動物巨噬細胞的免疫功能。因此，本研究目的在於探討添加外源性NO、LPS及細胞激素對吳郭魚頭腎來源之巨噬細胞免疫功能調控機制。

材料與方法

實驗動物 篩選體重約600至700克的吳郭魚 (*Oreochromis Niloticus* × *Oreochromis Mossambicus*) 馴養於水量6噸之魚池中，水溫為25 ± 2°C，pH值為8.2，24小時持續打氣。水源為經紫外燈過濾消毒之地下水並採流水式養殖，水流量為20 L/min。每日餵飼2次市售吳郭魚浮水飼料 (福壽，台中，台灣)，餵飼量為魚隻體重的1%。

頭腎巨噬細胞之分離與純化 以1:3,000之benzocaine (Sigma, Louis, MO, USA) 將吳郭魚麻醉，再以無菌操作技術將其頭腎取出置於RPMI-1640 medium (含有100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin及10 U/mL heparin) (Sigma) 中培養。將取出之頭腎磨碎後靜置1分鐘，將上清液加入不同濃度 (30%-40%-50%) 的Percoll (Sigma) 梯度溶液中，於4°C離心30分鐘 (800×g)。再將位於40%-50%介面層中之細胞取出，以RPMI-1640 medium進行清洗，而後使用添加10%胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS) 的RPMI-1640 medium (含有5 mM sodium pyruvate、2 mM L-glutamine、50 U/mL penicillin、50 μ g/mL streptomycin及50 μ M 2-mercaptoethanol (2-ME)) 於25°C培養以供後續實驗之使用。

NO donors、LPS及細胞激素 3-morpholinopyrrolidine HCl (SIN-1) 和 S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) (購自Cayman Chemical, MI, USA)；LPS (*Escherichia coli* serotype 026:B6)、recombinant mouse IFN- γ 、recombinant murine TNF- α 、recombinant murine IL-1 β 、recombinant mouse IL-2、recombinant mouse IFN- α/β 、recombinant mouse IL-4及recombinant mouse IL-10 (皆購自Sigma)。

免疫刺激物對頭腎巨噬細胞誘發apoptosis之影響 本研究方法係參考Stolen等 [34] 和Stadler等 [33] 之方法並稍加改良後施行。分別以100 U/mL IFN- γ 、10 μ g/mL LPS、25 ng/mL TNF- α 或100

U/mL IFN- γ + 10 μ g/mL LPS 與頭腎巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL) 共同培養 24 小時後，再以 50 μ L (5 μ g/mL) FITC-Annexin-V 和 5 μ L (5 μ g/mL) propidium iodide (PI) 進行雙重螢光染色，最後以流式細胞儀 (FACS Calibar flow cytometer, Becton Dickson) 和 CellQuest 軟體進行檢測和分析。另一方面，先以 25 ng/mL TNF- α 或 10 μ g/mL LPS + 100 U/mL IFN- γ 與頭腎巨噬細胞共同培養 24 小時後，再將巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL) 分別與低濃度 (50、100、150、200、250 及 300 μ M) 和高濃度 (200、400、600、800 及 1,000 μ M) 之 NO donors (SIN-1 和 SNAP) 作用 24 小時，而後再進行上述相同之染色、檢測及分析等步驟。此外，以 10 μ g/mL LPS + 100 U/mL IFN- γ 或 25 ng/mL TNF- α 先誘導過之吞噬細胞且之後不添加 SIN-1 和 SNAP 刺激為對照組 (Fig. 2)，染色、檢測及分析等方法如同上述。

細胞激素和 LPS 對頭腎巨噬細胞 NO 產生的影響 本研究之實施方法係參考和稍加修改 Stadler 等 [33] 和 Cenci 等 [5] 之方法。將頭腎巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL) 分別添加等量之不同濃度的 LPS 或細胞激素，於 25°C 共同培養 24 小時，再以 NO 測定儀 (Duo · 18, World Precision) 測定細胞之 NO 產生量。另一方面，將頭腎巨噬細胞分成 3 組：A 組為本實驗之對照組，首先將頭腎巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL) 各與 IFN- γ 或 IFN- γ + IL-4 或 IFN- γ + IL-10 於 25°C 培養 20 小時；B 組為將頭腎巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL) 先與 IFN- γ 於 25°C 培養 18 小時後再與 IL-4 或 IL-10 培養 4 小時；C 組為將頭腎巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL) 先與 IFN- γ 於 25°C 培養 4 小時後再與 IL-4 或 IL-10 培養 18 小時。頭腎巨噬細胞 NO 產生量之檢測方法如同上述。另一實驗則將頭腎巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL) 分別先以不同濃度 IFN- γ (1、10 或 100 U/mL) 刺激 24 小時後再與 IL-4 和/或 IL-10 於 25°C 共同培養 24 小時，之後檢測頭腎巨噬細胞 NO 產生量。單獨以不同濃度 IFN- γ 刺激頭腎巨噬細胞後所產生的 NO 量為本實驗之對照組。

統計分析 實驗中所之結果以 Student's *t*-test 進行分析，當 $P < 0.05$ 即代表有顯著性差異。

結 果

LPS 和細胞激素對吳郭魚頭腎巨噬細胞誘發 apoptosis 之影響 由誘發頭腎巨噬細胞發生 ap-

optosis 之影響結果發現，巨噬細胞分別與 100 U/mL IFN- γ 及 10 μ g/mL LPS、25 ng/mL TNF- α 及 100 U/mL IFN- γ 作用 24 小時後，巨噬細胞發生 apoptosis 的比例均有顯著性地增加。尤以同時與 IFN- γ 和 LPS 作用時最高 (45.6%)，TNF- α 次之 (42.8%)，IFN- γ 再次之 (19.8%)。然而，僅單獨添加 LPS 時，巨噬細胞發生 apoptosis 之比例與對照組相較下，則發現二者並沒有顯著性之差異 (Fig. 1)。故由實驗之結果顯示添加 IFN- γ 和 TNF- α 會誘導巨噬細胞發生 apoptosis，並且當 IFN- γ 與 LPS 同時共同作用之下，對誘導巨噬細胞發生 apoptosis 具有加乘作用。

外源性 NO 對頭腎巨噬細胞的影響 由低濃度的外源性 NO 對經 TNF- α 和 IFN- γ 及 LPS 分別誘導過之頭腎巨噬細胞影響結果顯示，50、100、150、200 及 250 μ M NO donors (SIN-1 和 SNAP) 均會降低經 TNF- α 和 IFN- γ 及 LPS 誘導過之吞噬細胞發生 apoptosis 之比例。尤以 250 μ M SNAP 抑制細胞發生 apoptosis 之效果最佳 (Fig. 2A-B)。有趣的是，我們發現 300 μ M NO donors 反而會增加細胞發生 apoptosis 的比例 (Fig. 2A-B)。因此，我們由實驗結果發現，低濃度的 NO donors 能降低經細胞激素和 LPS 誘發過之吞噬細胞發生 apoptosis 的比例。相反地，高濃度之 NO donors 則反而使巨噬細胞發生 apoptosis 的比例增加。

由高濃度的外源性 NO 對經 IFN- γ 及 LPS 誘導過之頭腎巨噬細胞的影響結果顯示，400、600、800 及 1000 μ M NO donors (SIN-1 和 SNAP) 均會增加經 IFN- γ + LPS 誘導過的巨噬細胞發生

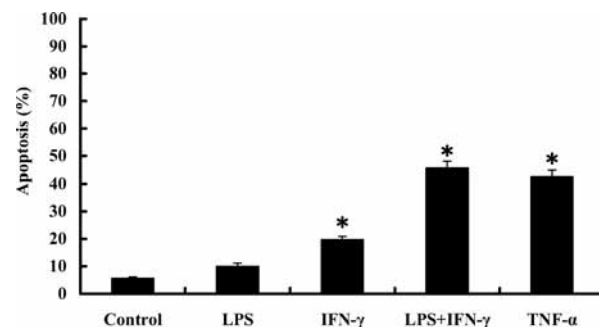


Fig. 1 The percentage of apoptosis of tilapia head kidney-derived macrophage (1×10^6 cells/mL) treated with 10 μ g/mL LPS, 100 U/mL IFN- γ , and 25 ng/mL TNF- α at 25°C for 24 h.

*Significant difference between the stimulated group and the control group ($P < 0.05$).

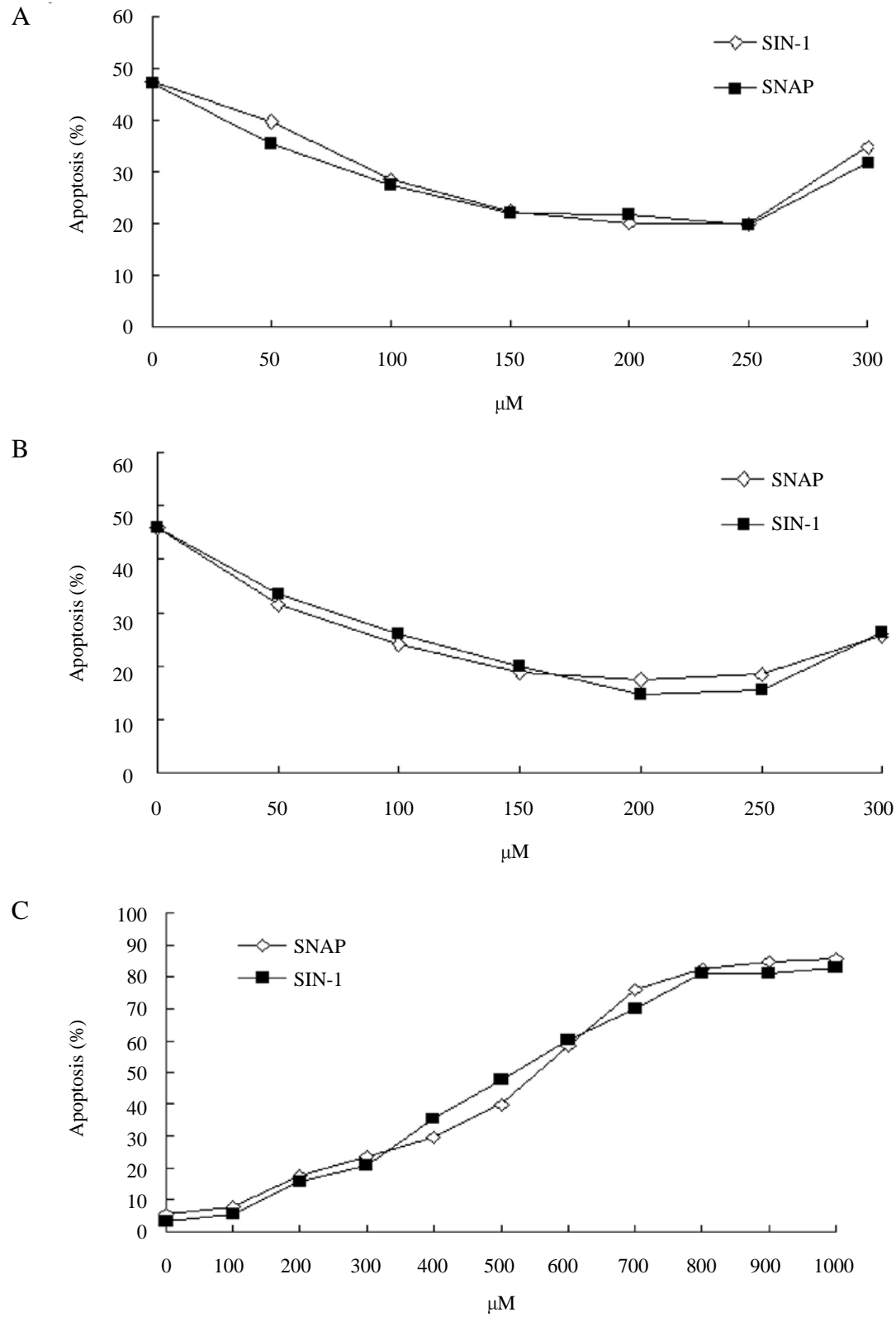


Fig. 2 The percentage of apoptosis of tilapia head kidney-derived macrophage (1×10^6 cells/mL) treated with NO donors (SNAP and SIN-1). (A) Tilapia head kidney-derived macrophages were pretreated with $10 \mu\text{g/mL}$ LPS and 100 U/mL $\text{IFN-}\gamma$ followed by treatment with $50\text{-}300 \mu\text{M}$ SNAP and SIN-1. (B) Tilapia head kidney-derived macrophages were pretreated with 25 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$ followed by treatment with $50\text{-}300 \mu\text{M}$ SNAP and SIN-1. (C) Tilapia head kidney-derived macrophages were pretreated with 25 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$ followed by treatment with $200\text{-}1,000 \mu\text{M}$ SNAP and SIN-1.

apoptosis。尤以 1,000 μM NO donors 增加細胞發生 apoptosis 的比例最高 (Fig. 2C)。故由實驗結果，我們發現高濃度的 NO donors 不但無法有效地抑制巨噬細胞發生 apoptosis，反而會使細胞發生 apoptosis 的比例增加。

細胞激素和 LPS 對頭腎巨噬細胞產生 NO 的影響 細胞激素 (IFN- γ 、IFN- α/β 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4 及 IL-10) 和 LPS 分別對巨噬細胞 (1×10^6 cells/mL) 產生 NO 的影響結果顯示，IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2 及 IFN- α/β 均顯著性地提升巨噬細胞的 NO 產量，尤以 TNF- α 最高 (Fig. 3)，並且當 IFN- γ 和 LPS 同時作用下，細胞之 NO 產生量較僅單獨 IFN- γ 作用有顯著性地增加 (Table 1)，由此可推測 IFN- γ 與 LPS 合併使用時更能增加細胞之 NO 產量。同時，我們發現只要 10 U/mL IFN- γ 即可使細胞之 NO 產生量有顯著性地增加 (Table 1)。相反地，發現 IL-4、LPS 及 IL-10 無法顯著性地增加巨噬細胞產生 NO (Fig. 3)。綜合實驗結果，我們發現 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2 及 IFN- α/β 能顯著性地增加吳郭魚之頭腎巨噬細胞之 NO 合成量。

IL-4 和 IL-10 抑制頭腎巨噬細胞 NO 的產生 IFN- γ 、IL-4 及 IL-10 對吳郭魚頭腎巨噬細胞之 NO 產生量之影響結果顯示，等量之 IFN- γ 分別 IL-4

和 IL-10 共同作用後，均可明顯地降低頭腎巨噬細胞之 NO 產生量 (Fig. 4)。同時，發現先以 IFN- γ 先行誘導巨噬細胞 18 小時後，再分別 IL-4 和 IL-10 作用 4 小時後，巨噬細胞的 NO 產生量均有顯著性地降低 (Fig. 4)。但如將巨噬細胞先以 IFN- γ 作用 4 小時後，再分別以 IL-4 和 IL-10 作用 18 小時後，結果和上述相同 (Fig. 4)。因此，我們推論 IL-4 和 IL-10 會抑制經 IFN- γ 所誘發過的巨噬細胞 NO 的合成，並且需要經較長的時間作用才抑制 NO 的產生。另外，由 IL-4 和 L-10 協同作用研究結果顯示，頭腎巨噬細胞同時與 IFN- γ 、IL-4 和 IL-10 作用後，其 NO 的產生量較單獨作用組別有顯著性地

Table 1. The amount of NO produced from tilapia head kidney-derived macrophages (1×10^6 cells/mL) stimulated with IFN- γ and/or LPS.

Stimulants		NO ($\mu\text{M}/\text{mL}$)
IFN- γ	LPS	
—	—	0.52 ± 0.02
10 U/mL	—	$3.11 \pm 0.29^*$
100 U/mL	—	$10.29 \pm 0.35^*$
1,000 U/mL	—	$17.46 \pm 0.41^*$
—	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.75 ± 0.12
100 U/mL	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$15.23 \pm 0.35^*$

*Significant difference between the stimulated group and the control group ($P < 0.05$).

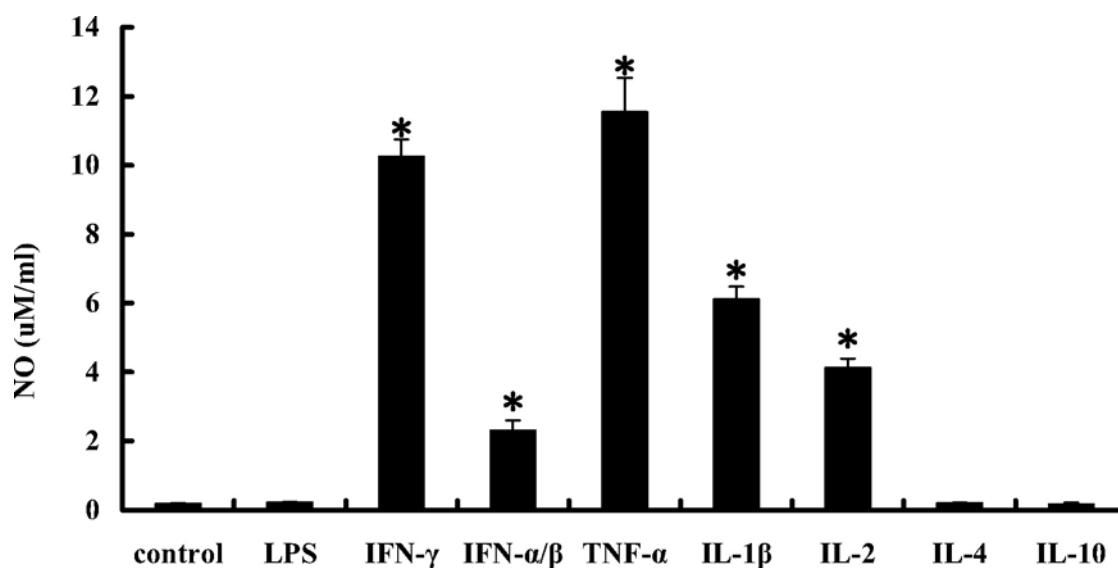


Fig. 3 The amount of NO of tilapia head kidney-derived macrophages (1×10^6 cells/mL) treated with LPS or cytokines. (*) $P < 0.05$.

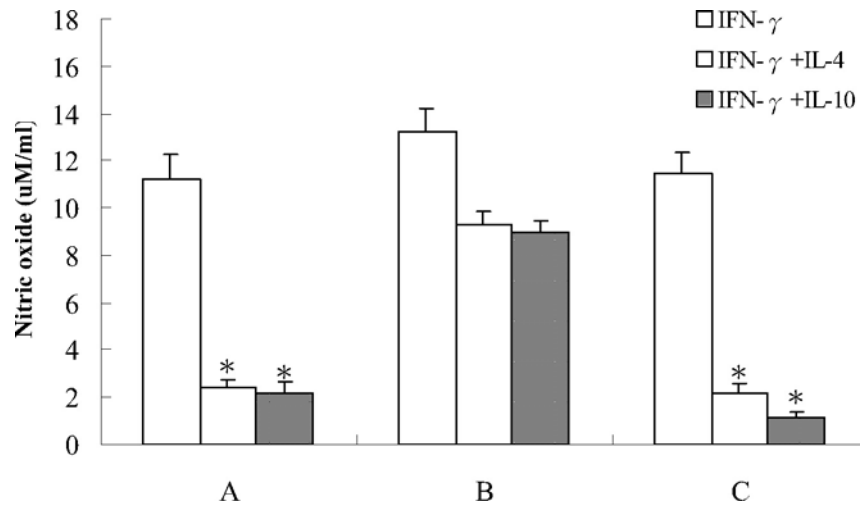


Fig. 4 The effects of IFN- γ , IL-4, and/or IL-10 on NO production in tilapia head kidney-derived macrophages (1×10^6 cells/mL). A group was treated with IFN- γ , IFN- γ +IL-4 or IFN- γ +IL-10 for 20 h. B group was pretreated with IFN- γ for 18 h and followed incubation with IL-4 or IL-10 for 4 h. C group was pretreated with IFN- γ for 4 h and followed incubation of IL-4 or IL-10 for 18 h. (*) $P < 0.05$.

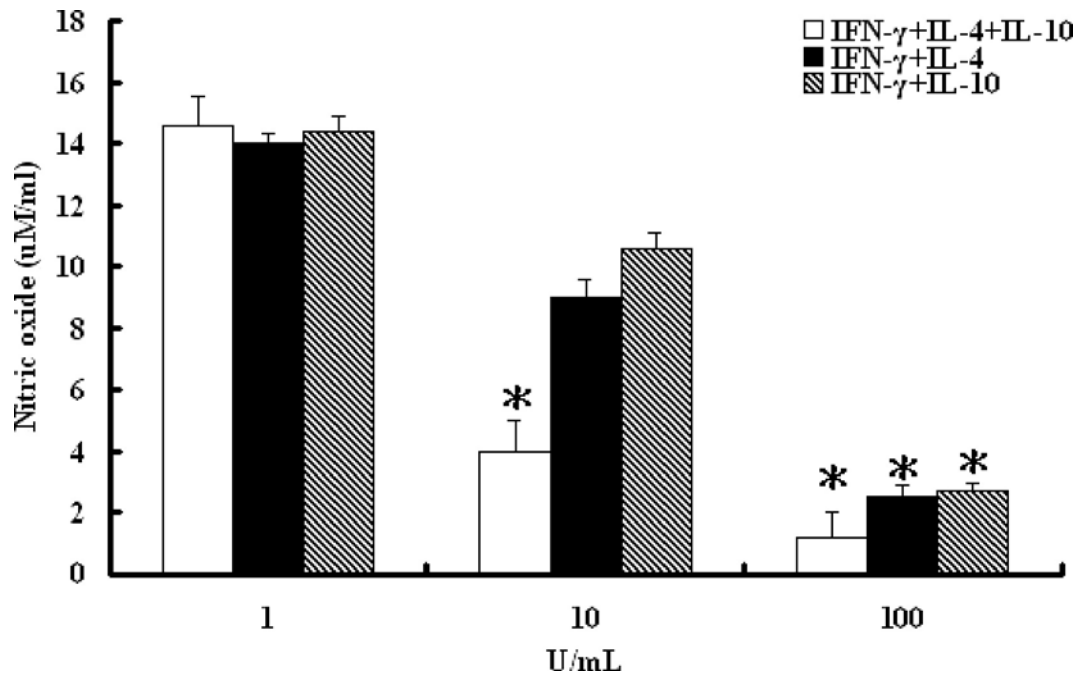


Fig. 5 The amount of NO of the IFN- γ -pretreated head kidney-derived macrophages (1×10^6 cells/mL) treated with IL-4 and/or IL-10.

*Significant difference between 10 U/mL or 100 U/mL IFN- γ -stimulated groups and the 1 U/mL IFN- γ -stimulated group ($P < 0.05$).

下降 (Fig. 5)。由此，顯示 IL-4 和 IL-10 具有協同加乘之作用，可以顯著地抑制巨噬細胞的 NO 產生量。

IFN- α/β 抑制頭腎巨噬細胞 NO 的產生 由 IFN- α/β 抑制吞噬細胞 NO 產生量之實驗結果發現，經 IFN- γ 和 LPS 誘導過之吞噬細胞與 IFN- α/β 作用 20 小時後，吞噬細胞之 NO 的產生量有顯著

Table 2. The amount of NO produced from tilapia head kidney-derived macrophages (1×10^6 cells/mL) stimulated with LPS, IFN- α/β , and/or IFN- γ .

Stimulants			NO ($\mu\text{M/mL}$)
IFN- γ	IFN- α/β	LPS	
—	—	—	0.52 \pm 0.02
—	—	10 $\mu\text{g/mL}$	1.54 \pm 0.12
100 U/mL	—	—	12.29 \pm 0.41*
100 U/mL	—	10 $\mu\text{g/mL}$	15.13 \pm 0.42*
—	100 U/mL	—	2.52 \pm 0.02
100 U/mL	100 U/mL	10 $\mu\text{g/mL}$	2.54 \pm 0.12

*Significant difference between the stimulated group and the control group ($P < 0.05$).

性地被抑制 (Table 2)。

IL-4、IL10 及 IFN- α/β 抑制頭腎巨噬細胞發生 apoptosis 由我們之研究結果顯示，巨噬細胞先以 100 U/mL IFN- γ 誘導作用 20 小時後，會使巨噬細胞發生 apoptosis (50.2%) 和 necrosis (19.2%) 之比例有顯著性地增加 (Fig. 6A)。然而，再分別與 IFN- γ + IL-4、IFN- γ + IL-10 及 IFN- γ + IL-4 + IL-10 作用 20 小時後，結果發現巨噬細胞發生 apoptosis 和 necrosis 的比例較僅單獨以 IFN- γ 作用組別有顯著性地降低，尤以 IL-4 + IL-10 降低細胞發生 apoptosis 和 necrosis 的比例最多 (Fig. 6A)。由另外相似實驗結果發現，IFN- α/β 亦能降低巨噬細胞發生 apoptosis 和 necrosis 的比例，並且其效果與 IL-4 和 IL10 相類似 (Fig. 6B)。

討 論

魚類有關細胞激素在免疫反應的調控機制仍未十分瞭解，直至目前為止，僅有少數細胞激素如 IL-2 [10]、IFN- γ -like 分子 [11]、IL-1 [36] 及 TNF-like 分子 [12] 被證實存在。所以，魚類在有關於細胞激素對免疫調控之研究上面臨許多困難。為了進一步明白細胞激素對吳郭魚頭腎巨噬細胞免疫反應調控之機制，本研究嘗試以老鼠來源的 IFN- γ 、IFN- α/β 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-1 β 及 IL-2 等細胞激素進行相關之研究，意外地發現，老鼠來源之細胞激素可被應用於吳郭魚巨噬細胞免疫調控之研究。

由於水生動物目前尚缺乏市售細胞表面標示之抗體，故 Chilmonczyk 和 Monge [6] 曾嘗試以流式

細胞儀 (flow cytometer) 來分析虹鱒的非特異性細胞毒殺作用機制、細胞吞噬活性、氧化爆起作用 (oxidative burst) 及自然殺手細胞 (natural killer cell) 的毒殺作用，結果指出流式細胞儀是一種快速、方便又可靠的分析魚類非特異性免疫研究之方法。因此，本研究則嘗試先以 percoll 進行吳郭魚頭腎巨噬細胞的純化分離後，再結流式細胞儀來分析頭腎巨噬細胞的族群與比例，結果發現此方法能有效地純化吳郭魚之頭腎巨噬細胞，並且其純度可高達 87.30%。因此，我們建議使用流式細胞儀併輔以其他細胞形態學的觀察，確實可以有效地確認魚類頭腎巨噬細胞之種類。

Sarih 等 [30] 指出老鼠腹膜來源的巨噬細胞經由 LPS 刺激活化後，會誘發產生 NO 進而導致巨噬細胞發生 apoptosis。Messmer 等 [22] 曾以 RAW 264.7 細胞 (老鼠巨噬細胞株) 與 LPS 和 IFN- γ 作用後，發現細胞會產生大量的 NO 而導致細胞發生 apoptosis。Bergmann 等 [2] 亦指出添加 NO donor 方式給予大量的 NO，會造成老鼠之巨噬細胞發生 apoptosis，並且其死亡率與 NO donor 的濃度成正比。Xie 等 [38] 發現 murine L929 transformed fibroblast 經由 IFN- γ 作用後，巨噬細胞會產生大量的 NO 進而導致細胞發生 apoptosis。同樣地，本研究結果發現吳郭魚之頭腎巨噬細胞分別以 IFN- γ 、TNF- α 及 LPS 作用 24 小時後，會顯著性地增加巨噬細胞發生 apoptosis 的比例。並且，當 IFN- γ 與 LPS 合併作用時，尚具有加乘之效果，其機制可能是藉由 NO 引發 apoptosis。

Ikebe 等 [14] 曾指出低劑量的 peroxynitrite 具有提升麩胱苷肽 (glutathione; GSH) 之作用，進而以抑制細胞發生 apoptosis，如再同時添加低劑量的 LPS 和 IFN- γ 確實可以抑制老鼠之巨噬細胞發生 apoptosis。但是，如添加高劑量的 NO donor 時，細胞則會進行不依賴性 cGMP (cGMP-independent) 反應路徑，進而促使細胞發生 apoptosis。因此，細胞產生 NO 的量與發生 apoptosis 的比例有密切之相關性 [8,17,29]。本研究結果證實，低濃度的 SNAP 和 SIN-1 會降低細胞激素誘發吳郭魚頭腎巨噬細胞發生 apoptosis 的比例；然而，高濃度的 SNAP 和 SIN-1 反而會增加細胞發生 apoptosis 而死亡，NO 的抑制和促進吳郭魚頭腎巨噬細胞發生 apoptosis 的啟動和 NO 濃度有著密切關係。Kuzushima 等 [17] 指出，細胞激素 (TNF- α 、IL-1 β 及 IFN- γ) 可誘發老鼠骨髓母細胞 (mouse osteoblastic cells) 發生 apoptosis，其主要機制乃藉 p38MAP-kinase-dependent iNOS system 來進行調

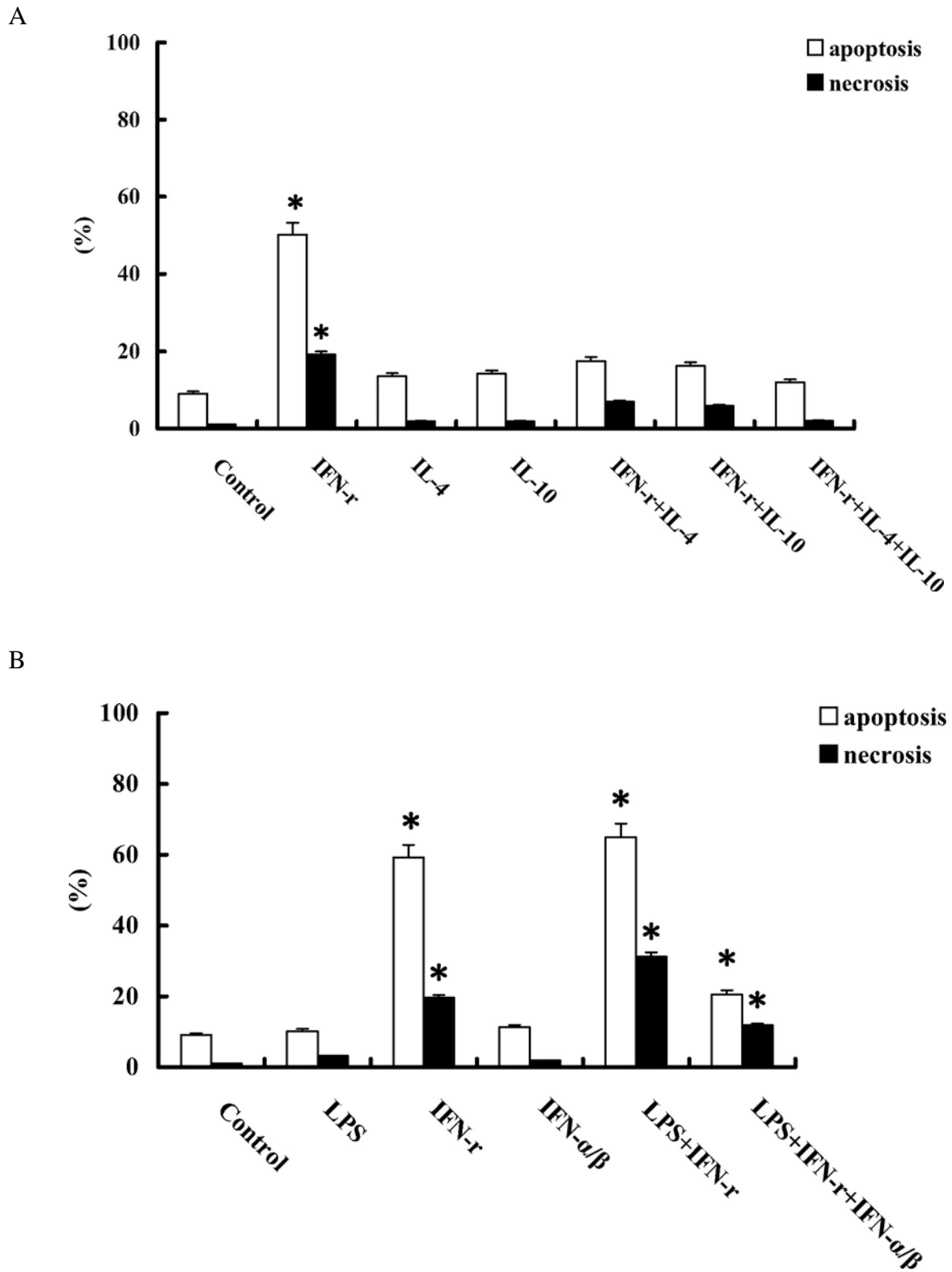


Fig. 6 The apoptosis and necrosis effects of the IL-4, IL-10 and/or IFN- α/β on the IFN- γ -stimulated tilapia head kidney macrophages. (A) The IFN- γ -stimulated tilapia head kidney macrophages were treated with IL-4 and/or IL-10. (B) The IFN- γ -stimulated tilapia head kidney macrophages were treated with IFN- α/β and/or LPS.

*Significant difference between the stimulated group and the control group ($P < 0.05$).

控。至於，本實驗之 apoptosis 調控機制則需要未來再作更進一步之研究和探討。

Stadler 等 [33] 曾以人類之關節軟骨細胞分別與 LPS 和 IL-1 作用，結果發現 LPS 和 IL-1 會誘發軟骨細胞產生 NO。Cox 等 [7] 指出老鼠的巨噬細胞與 IFN- γ 作用後，亦會產生大量的 NO。如再與其他細胞激素 (IL-1 β 、IL-2 及 TNF- α) 合併使用時，則會使細胞產生更大量的 NO。甚至，Cenci 等 [4] 指出 IL-2 和 IFN- γ 可促進巨噬細胞吞噬病原。然而，Rojas 等 [26] 發現 IL-4、IL-10、monocyte chemotactic protein-1 及 TGF 會抑制細胞 NO 之合成量。所以，Th1 來源之細胞激素 (如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 及 IL-2) 可以增進巨噬細胞之 NO 產量，進而促進細胞對病原之毒殺作用 [27]。然而，Th2 來源之細胞激素 (如 IL-4 和 IL-10) 則會抑制巨噬細胞之 NO 產生量，進而降低細胞之殺菌能力 [8,9,28]。本研究結果顯示，吳郭魚頭腎巨噬細胞分別與 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 及 IL-2 作用後，證實可以增加細胞 NO 的產生量，尤以 IFN- γ 和 TNF- α 的誘發能力最強。同時，我們亦證實 IL-4 和 IL-10 會抑制吳郭魚之頭腎巨噬細胞 NO 的產生量，如頭腎巨噬細胞與 IL-4 和 IL-10 同時作用後，會具有加乘抑制細胞產生 NO 之作用。由本研究結果，我們發現吳郭魚頭腎巨噬細胞分別與 IFN- γ 和 TNF- α 作用後，會造成巨噬細胞發生 apoptosis。但是，IL-4、IL-10 及 IFN- α/β 作用後，則會抑制細胞發生 apoptosis。Ameredes 等 [1] 指出，IL-4 和 IL-10 會抑制 NO synthase 的活性，進而抑制 NO 的產生，並證實 IL-4 和 IL-10 和 NO 的產量有著密切關係。至於，此調控機制則需要再作更進一步之研究。

由於 NO 通常與細胞發生 apoptosis 和 necrosis 有密切之相關性，但其真正機制尚不明瞭，期望本研究結果能提供未來在特異性免疫功能不全和自發或誘發性的自由基傷害方面之機制和治療研究之參考。

致 謝

本研究承蒙行政院農業委員會之經費支持 (99AS-9.2.3-BQ-B1 (1)) 和 (99AS-9.2.2-BQ-B4 (4))，特為致謝！

參考文獻

1. Ameredes BT, Zamora R, Sethi JM, Liu HL, Kohut LK,

- Glignonic AL, Choi AM, Calhoun WJ. Alterations in nitric oxide and cytokine production with airway inflammation in the absence of IL-10. *J Immunol* 175: 1206-1213, 2005.
2. Bergmann, L, Krönckc KD, Suschek D, Kolb-Bachofen V. Cytotoxic action of IL-1 β against pancreatic islets is mediated via nitric oxide formation and is inhibited by N^G-monomethyl-L-arginine. *FEBS Lett* 299: 103-106, 1992.
3. Borutaite V, Brown GC. Nitric oxide induces apoptosis via hydrogen peroxide, but necrosis via energy and thiol depletion. *Free Radic Biol Med* 35: 1457-1468, 2003.
4. Cenci E, Romani L, Vecchiarelli A, Puccetti P, Bistoni F. Role of L3T4⁺ lymphocytes in protective immunity to systemic *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun* 57: 3581-3587, 1989.
5. Cenci E, Romani L, Mencacci A, Spaccapelo R, Schiaffella E, Puccetti P, Bistoni P. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur J Immunol* 23: 1034-1038, 1993.
6. Chilmonczyk S, Monge D. Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish Shellfish Immunol* 9: 319-333, 1999.
7. Cox GW, Melillo G, Chattopadhyay U, Mullet D, Fertel RH, Varesio L. Tumor necrosis factor- α dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates IFN- γ plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity. *J Immunol* 149: 3290, 1992.
8. Daniel T, Alexander M, Hubbard WJ, Chaudry IH, Choudhry MA, Schwacha MG. Nitric oxide contributes to the development of a post-injury Th2 T-cell phenotype and immune dysfunction. *J Cell Physiol* 208: 418-427, 2006.
9. Datta S, Ghosh D, Saha DR, Bhattacharaya S, Mazumder S. Chronic exposure to low concentration of arsenic is immunotoxic to fish: role of head kidney macrophages as biomarkers of arsenic toxicity to *Clarias batrachus*. *Aquat Toxicol* 92: 86-94, 2009.
10. Elsaesser CF, Clem L. Functionally distinct high and low molecular weight species of channel catfish and mouse IL-1. *Cytokine* 5: 10-20, 1994.
11. Graham SC, Secombes J. Do fish lymphocytes secrete interferon- γ . *J Fish Biol* 36: 563-573, 1990.
12. Hardie LJ, Chappell LH, Secombes CJ. Human tumor necrosis factor alpha influences rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leucocyte responses. *Vet Immunol Immunopathol* 40: 73-84, 1991.
13. Hauschildt S, Bassenge E, Bessler W, Busse R, Mulsch A. L-arginine-dependent nitric oxide formation and nitrite release in bone marrow-derived macrophages stimulated with bacterial lipopeptide and lipopolysaccharide. *Immunology* 70: 332, 1990.
14. Ikebe N, Akaike T, Miyamoto Y, Hayashida K, Yoshitake J, Ogawa M. Protective effect of S-nitrosylated alpha (1)-protease inhibitor on hepatic ischemia reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 904-911, 2000.
15. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch*

- Biochem Biophys 298: 446, 1992.
16. Jurecka P, Irnazarow I, Stafford JL, Rusczyk A, Taverne N, Belosevic M, Savelkoul HF, Wiegertjes GF. The induction of nitric oxide response of carp macrophages by transferrin is influenced by the allelic diversity of the molecule. *Fish Shellfish Immunol* 26: 632-638, 2009.
 17. Kuzushima M, Mogi M, Togari A. Cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis in mouse osteoblastic cells: Involvement of p38MAP kinase. *Arch Oral Biol* 51: 1048-1053, 2006.
 18. Kwon NS, Stuehr DJ, Nathan CF. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 174: 761, 1991.
 19. Lander HM, Sehajpal P, Levine DM, Novogrodski A. Activation of human mononuclear cells by nitric oxide-generating compound. *J Immunol* 150: 1509, 1993.
 20. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok SJ. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27: 8706, 1988.
 21. Messmer UK, Lapetina EG, Brüne B. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds. *Mol Pharmacol* 47: 757-765, 1995.
 22. Messmer UK, Reimer DM, Reed JC, Briine B. Nitric oxide induced poly (ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 264.7 macrophage apoptosis is blocked by Bcl-2. *FEBS Lett* 384: 162-166, 1996.
 23. Nathan, C. and Q. Xie. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918, 1994
 24. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cell synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666, 1988.
 25. Radomski MW, Moncada S. Biological role of nitric oxide in platelet function. In: Moncada S, Higgs EA, Berrazueta JR, ed. *Clinical relevance of nitric oxide in the cardiovascular system*. Madrid: EDICOMPLET, 45-56, 1991.
 26. Rojas A, Delgado R, Glaria L, Palacios M. Monocyte chemotactic protein-1 inhibits the induction of nitric oxide synthase in J774 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 274, 1993.
 27. Romani L, Mocci S, Bietta C, Lanfaloni L, Puccetti P, Bistoni F. Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 responses with acquired resistance. *Infect Immun* 59: 4647-4654, 1991.
 28. Russo R, Shoemaker CA, Panangala VS, Klesius PH. *In vitro* and *in vivo* interaction of macrophages from vaccinated and non-vaccinated channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri*. *Fish Shellfish Immunol* 26: 543-552, 2009.
 29. Sakurai T, Kano Y, Ohno H, Ji LL, Best TM, Izawa T, Best TM. Role of Nitric Oxide in the Apoptosis of Structural Damage in Rat Skeletal Muscle: 1113: 9:30 AM - 9:45 AM. *Med Sci Sports Exerc* 38: 124, 2006.
 30. Sarih M, Souvannavong V, Adam A. Nitric oxide induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 503-508, 1993.
 31. Schmidt HHHW, Murad F. Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 181:1372-1377, 1992.
 32. Srisikandan S, Evans TJ, Cohen J. Bacterial superantigen-induced human lymphocyte responses are nitric oxide dependent and mediated by IL-12 and IFN- γ . *J Immunol* 156: 2430-2435, 1996.
 33. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, Mcintyre LA, Georgescu HI, Evans CH. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 147: 3915-3920, 1991.
 34. Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, van Muiswinkel WB. *Techniques in Fish Immunology*. Fair Haven, NJ, USA, 11-12, 1990.
 35. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon MS, Weise M, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD and FMN containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7773-7777, 1991.
 36. Verburg-van Kemenade BML, Weyts FAA, Debets R, Flik G. Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. *Dev Comp Immunol* 19: 59-70, 1995.
 37. Vizzard MA, Erdman SL, ForstermannU, DeGroat WC. Differential distribution of nitric oxide synthase in neural pathways to the urogenital organs (urethra, penis, urinary bladder) of the rat. *Brain Res* 646: 279-291, 1994.
 38. Xie K, Huang S, Dong Z, Fidler JJ. Cytokine-induced apoptosis in trails formed murine fibroblasts involves synthesis of endogenous nitric oxide. *Int J Oncol* 3: 1043-1048, 1993.

The Effects of Nitric Oxide Donors, Cytokines, and Lipopolysaccharide on Apoptosis of the Tilapia Head Kidney-derived Macrophages

¹ Ching-Fu CHENG, ² Shao-Wen HUNG, ³ Yu-Hsing LIN, ¹ Pan-Chen LIU, ¹ Ming-Hui CHEN,
⁴ Ching-Yu TU, ¹ Chen-Hsuan CHANG, ⁵ Show-Ho CHIOU, *¹ Way-Shyan WANG

¹ *Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan*

² *Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica, Taipei 115, Taiwan*

³ *Nursing Department of Yuanpei University, Hsinchu 300, Taiwan*

⁴ *Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taichung 413, Taiwan*

⁵ *Graduate Institute of Microbiology and Public Health, College of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan*

(Received: January, 11, 2011. Accepted: March, 14, 2011.)

ABSTRACT The aims of this investigation were to study the effects of nitric oxide donors, cytokines, and lipopolysaccharide (LPS) on the non-specific immune responses of the tilapia (*Oreochromis hybrids*) head kidney-derived macrophages by using flow cytometry. Our results showed that tilapia head kidney-derived macrophages treated with IFN- γ , TNF- α , and IFN- γ plus LPS for 24 h exhibited a very high percentage of apoptotic cells. At the same time, IFN- γ also induced apoptosis in tilapia head kidney-derived macrophages. However, low doses of nitric oxide donors were able to inhibit apoptosis in the cells. The percentage of apoptosis of the tilapia macrophages decreased with addition of IL-4 and IL-10. On the other hand, tilapia head kidney-derived macrophages treated with high doses of nitric oxide donors for 24 h expressed a very high percentage of apoptosis. Simultaneously, the effect seemed to be dose-dependent. [Cheng CF, Hung SW, Lin YH, Liu PC, Chen MH, Tu CY, Chang CH, Chiou SH, * Wang WS. The effects of nitric oxide donors, cytokines, and lipopolysaccharide on apoptosis of the tilapia head kidney-derived macrophages. *Taiwan Vet J* 37 (3): 169-179, 2011. * Corresponding author TEL: 886-4-22840894-508, FAX: 04-22862073, E-mail: wswang@dragon.nchu.edu.tw]

Key words: apoptosis, cytokine, head kidney-derived macrophages, lipopolysaccharide, nitric oxide