

β-伴大豆球蛋白诱导杂交黄颡鱼肠道上皮细胞内质网应激模型的建立

张子豪 郭朝辉 张美娜 洪佳乐 于光晴 董鹏生 黄小城 杨振江 王延晖 李明 刘变枝

ESTABLISHMENT ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS MODEL INDUCED BY β-CONGLYCININ IN INTESTINAL EPITHELIAL CELLS OF HYBRID YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* ♀ ×*PELTEOBAGRUS VACHELLI* ♂)

ZHANG Zi-Hao, GUO Chao-Hui, ZHANG Mei-Na, HONG Jia-Le, YU Guang-Qing, DONG Peng-Sheng, HUANG Xiao-Cheng, YANG Zhen-Jiang, WANG Yan-Hui, LI Ming, LIU Bian-Zhi

在线阅读 View online: https://doi.org/10.7541/2024.2024.0120

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

亚硝酸钠诱导的草鱼肝细胞凋亡中内质网应激IRE1通路的作用研究

ROLE OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IRE1 PATHWAY IN HEPATOCYTE APOPTOSIS OF GRASS CARP *CTENOPHARYNGODON IDELLA* INDUCED BY SODIUM NITRITE

水生生物学报. 2020, 44(1): 10-19 https://doi.org/10.7541/2020.002

抗菌肽HBβ-C在全雄和杂交黄颡鱼对多子小瓜虫抗性差异中的作用

THE ROLE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE HB β –C in ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS RESISTANCE IN ALL–MALE AND HYBRID YELLOW CATFISH

水生生物学报. 2021, 45(5): 975-985 https://doi.org/10.7541/2021.2020.193

镉暴露诱导黄颡鱼鳃的组织学损伤、氧化应激和免疫反应

CADMIUM EXPOSURE INDUCES HISTOLOGICAL DAMAGE, OXIDATIVE STRESS AND IMMUNE RESPONSE IN YELLOW CATFISH

水生生物学报. 2019, 43(2): 340-347 https://doi.org/10.7541/2019.042

黄颡鱼和杂交黄颡鱼"黄优1号"形态及性腺发育的比较

THE MORPHOLOGY AND GONAD DEVELOPMENT OF *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* AND ITS INTERSPECIFIC HYBRID "HUANGYOU NO. 1" WITH *PELTEOBAGGRUS VACHELLI*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1231-1238 https://doi.org/10.7541/2019.146



关注微信公众号,获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2024.2024.0120

CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0120

β-伴大豆球蛋白诱导杂交黄颡鱼肠道上皮细胞内质网应激模型的建立

张子豪¹ 郭朝辉¹ 张美娜¹ 洪佳乐¹ 于光晴¹ 董鹏生¹ 黄小城¹ 杨振江¹ 王延晖² 李 明¹ 刘变枝¹

(1. 河南农业大学动物科技学院, 郑州 450046; 2. 河南省水产科学研究院, 郑州 450044)

摘要:实验旨在利用β-伴大豆球蛋白构建黄颡鱼上皮细胞内质网应激(Endoplasmic reticulum stress, ERS)模型。利用酶消化法分离得到黄颡鱼肠道上皮细胞,通过细胞形态、角蛋白18 (Cytokeratin-18, CK-18)免疫荧光染色和碱性磷酸酶染色法鉴定。利用不同浓度β-伴大豆球蛋白刺激24h后, RT-qPCR检测相关基因转录表达水平, 筛选最合适刺激浓度。在此浓度下分别刺激黄颡鱼肠道上皮细胞0、12h、24h和36h, 使用RT-qPCR、CCK8、透射电镜和免疫荧光染色等方法检测相关指标, 筛选最适刺激时间。结果表明: (1)成功分离培养黄颡鱼肠道上皮细胞, 细胞呈铺路石状, CK-18和碱性磷酸酶染色呈阳性; (2)成功筛选到4 mg/mL β-伴大豆球蛋白为最佳刺激浓度。在该浓度下, 除grp78、jnk、il-10、atf6外, 内质网应激、自噬、调亡、炎症等相关基因表达水平均显著最高(P<0.05); 成功筛选24h为最适刺激时间。4 mg/mL β-伴大豆球蛋白刺激细胞 24h显著降低细胞活力, 同时引起内质网显著肿胀, GRP78、LC3、Caspase3蛋白表达和Tunel信号显著升高 (P<0.01), perk、atf6、beclin1、lc3a、bcl2、caspase3、caspase9和il-12 mRNA表达水平显著最高(P<0.05)。综上, 实验成功分离得到黄颡鱼肠道上皮细胞, 构建了黄颡鱼肠道上皮细胞内质网应激模型。实验为进一步研究未折叠反应信号通路在黄颡鱼豆粕诱导肠炎发生发展中的作用奠定基础。

关键词: β-伴大豆球蛋白; 肠道上皮细胞; 内质网应激; 黄颡鱼
中图分类号: Q172 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2024)11-1894-11

型。豆粕替代鱼粉对鱼类生长和生理状态的影响 及其摄食机制具有物种特异性^[3],在肉食性鱼类最 为高发,降低鱼类生长性能,引起肠道炎症,损害肠 道健康。以鱼类SBMIE为代表的食源性肠道炎症 已经成为限制我国水产养殖业绿色可持续发展的 重要问题。

β-伴大豆球蛋白是豆粕中主要的抗原蛋白,分子质量为140—180 kD,约占豆粕总蛋白质含量的40%^[4]。β-伴大豆球蛋白主要在肠道部位被消化吸收,是引起肠道消化吸收功能障碍、诱发肠炎的常见抗原蛋白,被认为是影响鱼类肠道健康的主要抗营养因子之一^[5],可引起多种鱼类肠道炎症^[6,7]。因

肠道上皮细胞是肠道的主要功能细胞,负责营 养物质的消化、吸收、免疫和应激反应等^[1]。因

此,肠道上皮细胞经常作为体外细胞模型用于营养

学和病理学研究,是探究外源性物质对肠道上皮细

胞作用机制的重要技术手段。近年来,快速发展的

水产养殖业使得鱼粉需求量和鱼粉供给量出现极

度不平衡,鱼粉出现严重短缺,价格不断攀升,寻找

能够部分或完全替代鱼粉的蛋白源成为水产饲料 行业的研究热点^[2]。植物蛋白源因来源广、价格

低,被认为是理想的鱼粉替代品。然而植物蛋白易

引起鱼类不耐受,导致食源性肠炎,以豆粕诱导肠

炎(Soybean meal-induced enteritis, SBMIE)最为典

作者简介: 张子豪(1999—), 男, 硕士研究生; 主要从事鱼类营养与免疫研究。E-mail: zhangzh180616@163.com

通信作者: 刘变枝(1981—), 女, 博士; 主要从事水产动物营养与免疫研究。E-mail: liubianzhi@126.com

©The Author(s) 2024. This is an open access article under the CC-BY 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

收稿日期: 2024-03-21;修订日期: 2024-04-19

基金项目: 国家自然科学基金(31702359); 河南省科技研发计划联合基金(222103810017); 河南省高等学校重点科研项目(23A240001); 河南省现代农业产业技术体系(HARS-22-16-T)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (3170 2359); Scientifical and Technological United Fund of Henan Province (222103810017); Science Research Key Project of Colleges and Universities of Henan Province (23A240001); Modern Agricultural Industrial Technology System of Henan Province (HARS-22-16-T)]

此,使用β-伴大豆球蛋白构建SBMIE模型,深入探 索并解析β-伴大豆球蛋白对水生生物肠道的致敏 机理及鱼类肠道对β-伴大豆球蛋白的响应规律,可 为寻求防治SBMIE的策略提供研究基础。

内质网是真核生物重要的细胞器,是细胞内蛋 白质合成和修饰的主要场所,维护着细胞内环境稳 态与平衡。当受到外界不良刺激或干扰时,内质网 易发生功能紊乱,导致未折叠的蛋白及错误折叠的 蛋白在内质网累积,从而引起内质网应激(Endoplasmic reticulum stress, ERS), 诱发未折叠反应(Unfolded protein response, UPR)。UPR通过肌醇需求酶 1α (Inositol-requiring enzyme 1, IRE1α)、蛋白激酶R 样内质网激酶(Protein kinase r-like er kinase, PERK) 和活化转录因子6 (Activating transcription factor 6, ATF6 α)三种内质网膜相关蛋白表达引起下游信号 反应,进而减缓蛋白合成、促使未折叠蛋白或错误 折叠蛋白正确折叠、或者降解未折叠蛋白等,恢复 内质网稳态^[8]。当内质网应激持续或重度发生时, 则诱发自噬或者调亡,引起疾病发生发展^[9,10]。在 这一过程中,主要分布于内质网中的热休克蛋白葡萄 糖调节蛋白78 (Glucose-regulated protein 78, GRP78) 被认为是发生内质网应激的标志物^[11]。在正常生 理状态, GRP78与UPR的三种跨膜感受蛋白紧密结 合,使其处于非活性状态。在内质网应激时,GRP78 与上述3种感受器发生解离,进而启动UPR和下游 级联反应[12]。

肠道是生物消化和营养吸收的主要场所,也是 机体与外部环境接触的重要部位之一,面临来自外 界的各种刺激和压力,极易发生内质网应激^[13]。哺 乳动物中己报道,炎性肠病与肠上皮的内质网应激 直接有关,内质网应激通过影响免疫细胞的增殖、 分化和炎性因子的释放等,加重炎症性肠病^[14,15]。 鱼类中己有研究发现,饲料中鱼粉含量过低,植物 蛋白、碳水化合物或者脂肪含量过高等^[16—18]营养 因素均可导致鱼类肠道上皮细胞发生内质网应激, 引发肠道炎症发生。本实验室前期研究数据也表 明,饲料中豆粕替代鱼粉可引起黄颡鱼肠道发生内 质网应激,且UPR三条信号通路及其下游因子受饲 料中豆粕添加量和投喂时间的调控(数据暂未发 表),推测UPR反应信号通路的作用在黄颡鱼SBMIE 发生发展的不同阶段存在差异。

因此,为进一步研究UPR信号通路在黄颡鱼 SBMIE发生发展中的作用,挖掘调控鱼类SBMIE肠 道黏膜屏障功能的靶点,本研究以黄颡鱼为研究对 象,通过鱼类细胞培养技术分离得到黄颡鱼肠道上 皮细胞,使用β-伴大豆球蛋白刺激构建内质网应激 模型,为体外研究UPR反应信号通路在鱼类SBMIE 中的作用和机制提供模型。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验用黄颡鱼[规格: (3.00±0.50) g]取自河南省 郑州市黄河特种鱼苗繁育中心,运回后置于河南农 业大学第一实验楼方形养殖缸内(长1.2 m,宽0.4 m, 高0.6 m;有效水体积0.24 m³),使用本实验配置的以 鱼粉为主要蛋白原的暂养料(蛋白水平: 43.22%;脂 肪水平: 8.88%)暂养7d,选取表观健康的黄颡鱼用 于实验。暂养条件:自然光照,循环水,连续适量充 气,水体溶氧量>5 mg/L,水温22—25℃,氨氮含量< 0.01 mg/L。每天表观饱食投喂两次(09:00和15:00)。

1.2 主要试剂

β-伴大豆球蛋白购自淮北富德莱博食品科技 有限公司;胎牛血清购自Biological Industries;L-15培养基、三抗(青霉素-链霉素-两性霉素B混合溶 液)、胰岛素、表皮生长因子、胶原酶 I、胶原酶 IV、中性蛋白酶 II、胰蛋白酶、D-Hanks缓冲溶均 购自北京索莱宝科技有限公司;HiScript II Q RT SuperMix、ChamQ-SYBR-qPCR Master Mix购自南 京诺唯赞生物科技股份有限公司;破膜液、DAPI 染液、抗荧光淬灭封片剂、一抗Anti-*CK-18* Rabbit pAb、Anti-*GRP78* BiP Rabbit pAb、Anti-*LC3* Rabbit pAb、Anti-*Caspase-3* Rabbit pAb、二抗山羊抗兔 IgG、牛血清白蛋白磷酸酶试剂盒购自武汉赛维尔 生物科技有限公司。

1.3 黄颡鱼肠道上皮细胞的分离

黄颡鱼肠道上皮细胞分离方法参照王立改等^[19] 的方法。

具体操作步骤如下: 在无菌操作台中, 取禁食 48h后的黄颡鱼于托盘中, 用剪刀断头致死后断尾 放血, 置于75%酒精溶液中浸泡1min; 用无菌吸水 纸擦净鱼体表粘液, 取出肠道, 放入盛有含有4%三 抗的D-hanks清洗液的培养皿中, 去除肠系膜及脂 肪组织, 纵向剖开肠道, 放入新的清洗液中清洗3次; 将清洗过的肠道组织置于干燥的无菌培养皿中, 用 剪刀剪碎至1 mm³左右并转移至L-15培养基中清洗 3次, 加入约三倍体积的混合消化液(胶原酶 I :胶原 酶Ⅳ:中性酶 II=1:1:2)于50 mL离心管中, 在28℃ 恒温摇床中消化10min后静置1min, 弃掉上层悬浊 液, 加入新的消化液, 消化至出现浑浊, 用细胞筛过 滤至新的50 mL离心管中, 1500 r/min离心5min后弃 上清, 加入适量L-15培养基清洗3次, 最后加入完全 培养基重悬细胞。

1.4 黄颡鱼肠道上皮细胞的原代培养

显微镜计数重悬细胞的密度,将其接种到六孔 板中,使细胞数量为1×10⁵个/孔左右,每孔加入2 mL 完全培养基,然后将六孔板置于CO₂恒温培养箱中 进行培养。90min后,将未贴壁的细胞连同培养基 一起转移到新的六孔板中,24h后弃掉上层未贴壁 的细胞加入新的培养基继续培养。培养期间,每 24h更换一次培养基。

1.5 黄颡鱼肠道上皮细胞的鉴定

细胞爬片的制作 将细胞接种在六孔板中的爬片上,待细胞状态稳定后,吸出培养基,用PBS 清洗爬片3次,每次5min,4%多聚甲醛固定30min, 用PBS清洗3次,每次5min。

CK-18免疫荧光鉴定 将制作好的爬片加入100 μL破膜液,室温孵育20min,PBS洗3次,3% BSA室温封闭30min,滴加1:50稀释的一抗,并置于 湿盒内4℃孵育过夜,PBS清洗3次后滴加二抗(稀释 比例为1:500),室温孵育50min后PBS清洗3次。爬 片滴加DAPI染液,避光室温孵育10min,PBS清洗 3次后用抗荧光淬灭封片剂封片后置于荧光显微镜 下观察并采集图像。

碱性磷酸酶染色 将制作好的细胞爬片置 根据碱性磷酸酶试剂盒说明书进行染色,中性树胶 封片后,使用显微镜镜检,并进行图像采集。

1.6 模型构建

筛选β-伴大豆球蛋白浓度 使用L-15培养 基将β-伴大豆球蛋白分别稀释为终浓度为0、2、 4、8和12 mg/mL的处理液,选取六孔板中生长良好 的细胞,用D-hanks清洗细胞后,分别加入含不同浓 度的β-伴大豆球蛋白的处理液,每个浓度梯度3个 重复孔,每孔的最终体积为2 mL,处理细胞24h后, 收细胞,提取细胞总RNA,-80℃保存待测。

细胞活力的检测 使用4 mg/mL β-伴大豆 球蛋白分别处理细胞12h、24h和36h,以无处理组 为对照组,每个处理3个重复孔,使用CCK8法测定 细胞活力。

细胞免疫荧光染色使用4 mg/mL β-伴大 豆球蛋白处理细胞24h,制作细胞爬片,用于GRP78/ LC3及Caspase3/Tunel蛋白的免疫荧光检测,方法同 上,使用ImageJ软件进行荧光强度量化。

1.7 透射电镜观察细胞内质网形态

用2.5%戊二醛固定5min,用细胞刮将细胞收集于离心管中,1500 r/min离心2min,弃掉上清后加入2.5%戊二醛室温避光固定50min,然后用0.1 mmol/L的磷酸缓冲液(pH=7.4)漂洗3次,每次10min,将细胞团块置于1%锇酸溶液中固定2h后,用同样的方

法再次漂洗,之后用梯度乙醇、丙酮脱水,然后用 丙酮、环氧树脂包埋剂包埋后60℃烤箱聚合48h, 70 nm切片、染色后用透射电镜仪(日立有限公司, HITACHI HT7800)观察内质网形态并采集图像。

1.8 引物设计、RNA提取和RT-qPCR

根据NCBI GenBank发布的黄颡鱼基因预测序列,利用NCBI primer-BLAST软件设计引物,并交由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表1。

TRIzol法提取组织总RNA, 微量紫外分光光仪 测定RNA的浓度和纯度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 所提RNA的质量。使用HiScript II Q RT SuperMix 合成cDNA, 使用ChamQ-SYBR-qPCR Master Mix进 行RT-qPCR。每个反应体系为10 μ L: cDNA (200 ng/ μ L)2 μ L、2×ChamQ SYBR qPCR 5 μ L、上下游引 物各0.2 μ L、ddH₂O 2.6 μ L。使用CFX96tm实时系 统进行RT-qPCR, 扩增程序: 95℃, 30s; 95℃, 10s, 60℃, 30s, 40次循环; 95℃, 15s。熔融曲线65—95℃, 0.5℃/s。

1.9 数据分析

实验数据采用SPSS 26.0 软件进行统计分析, 数据用平均值±标准差(mean±SD)表示。用Shapiro-Wilk检验分析数据的正态性,利用One-way ANOVA 进行单因素方差分析, Duncan's多重比较检验, P< 0.05表示差异显著, P<0.01表示差异极显著。使用 GraphPad Prism 5进行图形绘制。

2 结果

2.1 黄颡鱼肠道上皮细胞分离纯化

如图 1所示, 刚分离出来的细胞在显微镜下观察, 可见大量单细胞及细胞团(图 1A)。纯化后培养 12h和48h, 去除未贴壁的细胞后在显微镜下观察, 可见贴壁的单细胞和细胞团, 且呈铺路石状(图 1B 和图 1C)。未发现成纤维细胞。

2.2 黄颡鱼肠道上皮细胞的鉴定

碱性磷酸酶染色和CK-18免疫荧光染色及结果如图 2所示,结果表明碱性磷酸酶染色(图 2A)和 CK-18 (图 2B)均呈阳性,且CK-18染色中阴性对照 无绿色荧光出现,说明分离得到的细胞为黄颡鱼肠 道上皮细胞。

2.3 不同浓度β-伴大豆球蛋白对黄颡鱼肠道上皮 细胞内质网、自噬、炎症和凋亡的影响

由图 3A 可知,随着β-伴大豆球蛋白作用浓度 的增加,内质网应激标志蛋白GRP78的mRNA 表达 水平显著上升(P<0.05),UPR信号通路起始因子 *ire1、perk*的mRNA表达水平在4 mg/mL处理组显 著上调(P<0.05), *atf6* 的mRNA表达水平则在2 mg/mL

基因	登录号	引物序列 Drivers (5/ 2)	产物长度
β -actin	XM 027148463	CCTTGACTTCGAGCAGGAGA	Product length (bp)
	1111_02/11/01/00	GGGACACCTGAACCTCTCATT	
eflα	XM 027175544	CTACAACCCTGCTGCCGTT	144
	_	TCCAGGAGAGTAGTGCCGC	
grp78	KM114873	CATCGAGCGCATGGTAAACG	113
		GGTTCTTGAGCGAGTAGGCA	
irel	KP687345	TACCTCGGACGCACAGAGTA	108
		GTCATCGTCTGGAAGGGTGG	
perk	KP687344	TGAGCCCAGAACAGTTGTCAG	109
		CTCTCCATCTGTGTGCGGAA	
atf6	KP687343	CAGATCGTGACTGTGCCGTA	198
		CGGTCTGCTTCCTCTGTTGT	
xbp1	XM_027162925	TGCAGGTTCAGACGTTGGAG	196
		TCCAGAATGCCGAGCAAGAG	
traf2	XM_027143648	CAACAAGGTGCGTCAGTTGG	138
		CGACGGGTGAAATCGGAGAT	
jnk	MH663998.1	CTACTACGCCTTCTGCCTGG	144
		GCCTGCAGCACAGTGAGTAT	
eif2a	XM_027143563	TCACCAGGGATGGCACTTTG	198
		GAAGGTTCGCATCACCCTGA	
chop	MG685920	CAGAGTTGGAGGCGTGGTAT	129
		AGCAGCTCTCCAAGACATCC	
beclin1	KY062770	ATTACCCAGCGTTCCTGTGG	107
		ATCTCTGAAAGCGCAGACCC	
atgla	KY404999	ACAGCCAATCCGTTCCTGTT	192
		GAGATGGCTGGTGAGGTCTG	
atg3	KY062769	TTGGGCAGTGGAATTAGCGA	146
		CTTGCCTCAGCCTTCCACTT	
lc3a	KY062773	TCGACTGCAACTGAACCCTAC	142
		CTGGGAGGCATAGACCATGT	
nf-ĸb	KF572025	CGTGGGAAAGTAAAGGCTCG	120
		GCTGCATCTTCACTCTCACG	
tnf-α	NM_001200172	TATGAGCCACACCGTCTCTC	107
		TCGACTGGTAGCCTTTGTGT	
il-12	XM_007231707	TCCACCTCACGAGATGCTTT	143
		ATCGCCTGCTGATCTTCTGA	
il-10	XM_027144360	GCACTTCGTTCTTCATACGCC	161
		GGCAACACGGTCTCCAAGTA	
bcl2	KY053838	GCGCTTTATTACCGCTGCAC	199
		CCGAACTCGAGGAAGACCAC	
baxα	KY072819	CACCTGGACTCTGGACTACC	144
		ACGACAGTGGTGAGAACTCC	
caspase3a	KY072821	GAATCAGCGCAATGGTACGG	143
		TGTGGTCATCCTTGGCAACT	
caspase9	KY053837	CCAGAAGGAGGTGATGCTCC	155
		ACTCCACATGGACTGGCTTC	

表1 引物信息

Tab. 1 Primers information

处理组达到最高后又显著下降至对照水平(P<0.05)。 由图 3B可知, UPR通路关键因子 traf2、elF2A和 chop基因mRNA表达均在4 mg/mL处理组显著最高 (P<0.05)。xbp1基因mRNA表达水平在不同浓度β-伴大豆球蛋白处理组间无显著差异(P>0.05),显著 高于0组(P<0.05)。各处理组jnk基因mRNA表达水 平在2 mg/mL处理组显著最高,显著低于0组(P<0.05)。

由图 3C可知,自噬相关基因 beclin1、atg1a、 atg3和lc3a的mRNA表达量均随β-伴大豆球蛋白浓度 的增加呈现显著上升后又显著下降的趋势(P<0.05)。 其中beclin1、atg1a和atg3的mRNA表达量在2和4 mg/ mL处理组显著最高,显著高于其他处理组(P<0.05)。 lc3a基因mRNA表达量则在4 mg/mL组显著最高(P< 0.05)。β-伴大豆球蛋白浓度过高显著抑制lc3a和 atg1a mRNA的表达(P<0.05)。 由图 3D和图 3E可知, 促炎因子nf-κb、tnf-α和 il-12 mRNA表达量均随β-伴大豆球蛋白浓度升高 呈先上升后下降趋势, 以4 mg/mL处理组最高, 显著 高于0处理组(P<0.05), 凋亡相关基因baxa、bcl2和 caspase9 mRNA表达量在4 mg/mL处理组最高(P< 0.05)。il-10 mRNA的表达不受β-伴大豆球蛋白浓 度的影响。

综合上述实验数据,选取4 mg/mL β-伴大豆球 蛋白浓度进行后续实验。

2.4 4 mg/mL β-伴大豆球蛋白对黄颡鱼肠道上皮 细胞活性的影响

如图 4所示, 4 mg/mL β-伴大豆球蛋白浓度处 理下, 细胞活性随着处理时间延长呈显著下降趋势 (P<0.01)。与0处理组相比, 4 mg/mL β-伴大豆球蛋 白浓度处理24h和36h的黄颡鱼肠道上皮细胞活力



图 1 分离得到的黄颡鱼肠道上皮细胞

Fig. 1 Isolated intestinal epithelial cells of hybrid yellow catfish

A. 培养0h, 放大倍数20×; B. 培养12h, 放大倍数20×; C. 培养48h, 放大倍数40×; 白色箭头: 分离得到的上皮细胞

A. Cells cultured for 0h, magnification $20\times$; B. Cells cultured for 12h, magnification $20\times$; C. Cells cultured for 48h, magnification $40\times$; White arrow: Isolated epithelial cells



图 2 黄颡鱼肠道上皮细胞鉴定

Fig. 2 Identification of intestinal epithelial cells of yellow catfish

A. 碱性磷酸酶染色; B. CK-18免疫荧光; a. 上皮细胞CK-18染色; b. 上皮细胞核染; c. 染色融合图; d. 阴性对照; e. 阴性对照核染; f. 阴性对照染色融合图

A. alkaline phosphatase staining; B. immunofluorescence of CK-18; a. epithelial cells with CK-18 staining; b. nuclear staining with DAPI; c. merged image; d. negative control; e. nuclear staining of negative control; f. merged image of negative control





Fig. 3 The expression of genes after 24h of treatment with different concentrations of β -conglycinin in cells

A和B.内质网应激相关基因, C. 自噬相关基因, D. 炎症相关基因, E. 凋亡相关基因; 柱上标注不同小写字母表示在不同处理间差异显著(P<0.05); 下同

A and B. Genes related with endoplasmic reticulum stress, C. Genes related with autophagy, D. Genes related with inflammation, E. Genes related with apoptosis. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments (P<0.05); The same applies below

均极显著低于0处理组(P<0.01)。

2.5 β-伴大豆球蛋白对黄颡鱼肠道上皮细胞内质 网应激相关基因的影响

如图 5所示, grp78 mRNA表达量随β-伴大豆球 蛋白刺激时间延长显著上升(P<0.05),在36h时显著 最高, ire1 mRNA表达量则呈下降趋势,并于36h时 显著最低(P<0.05)。与刺激12h相比, perk mRNA表 达量于刺激24h后显著升高并维持在此水平(P<0.05)。 chop的mRNA水平在各时间点无显著差异(P>0.05)。

2.6 4 mg/mL β-伴大豆球蛋白对黄颡鱼肠道上皮 细胞自噬和凋亡相关基因的影响

由图 6可知,自噬相关基因beclin1和lc3a mRNA 表达量均在24h显著最高(P<0.05)。其中beclin1的 mRNA表达量于36h时下降至12h水平, lc3a mRNA 表达量于36h时显著低于12h水平(P<0.05)。调亡相 关基因bcl2, caspase3a和 caspase9的 mRNA表达量 均在24h时显著最高(P<0.05), baxa基因的mRNA表 达量则36h时显著最高(P<0.05)。



图 4 4 mg/mL的β-伴大豆球蛋白处理细胞12h、24h、36h后细 胞活性变化

Fig. 4 Changes in cell activity on 4 mg/mL β-conglycinin after treatment with soy globulin for 12h, 24h, and 36h

**表示差异极显著(P<0.01)

** indicates extremely significant difference (P<0.01)



图 5 4 mg/mL β-伴大豆球蛋白处理细胞12h、24h、36h后内质 网应激基因的mRNA表达量

Fig. 5 mRNA expression of ERS-related genes in cells suffered 12h, 24h and 36h stimulation by 4 mg/mL β -conglycinin

2.7 4 mg/mL β-伴大豆球蛋白对黄颡鱼肠道上皮 细胞炎症相关因子mRNA表达的影响

由图 7可知,除*il-10*外,所有炎症因子相关基因 mRNA表达量都在24h显著最高,于36h显著最低,显著低于12h时表达水平(P<0.05)。

2.8 4 mg/mL β-伴大豆球蛋白对黄颡鱼肠道上皮 细胞内质网结构的影响

如图 8所示,与control组相比,4 mg/mL β-伴大 豆球蛋白处理黄颡鱼肠道上皮细胞24h后,显著引 起细胞内质网肿胀,内质网应激发生。

2.9 4 mg/mL β-伴大豆球蛋白对黄颡鱼肠道上皮 细胞GRP78和LC3蛋白表达的影响

如图 9所示,免疫荧光双染显示,与对照组相比,4 mg/mL β-伴大豆球蛋白刺激24h导致黄颡鱼肠道上皮细胞GRP78和LC3蛋白表达极显著升高(P<0.01)。

2.10 4 mg/mL β-伴大豆球蛋白对黄颡鱼肠道上皮 细胞凋亡相关蛋白的影响

由图 10所示,免疫荧光双染结果显示4 mg/mL 的β-伴大豆球蛋白处理黄颡鱼上皮细胞24h能极显 著增加凋亡相关蛋白Caspase3的表达和细胞凋亡 水平(P<0.01)。

3 讨论

在以鱼类肠道上皮细胞为模型的研究中,大都 采用分离原代肠道上皮细胞的方法,如黄姑鱼(Nibea albiflora)^[19]、鲫(Carassius auratus)^[20]和草鱼^[21] 等。在本研究中,我们参照其他鱼类原代肠道上皮 细胞的分离培养方法,并进行进一步改良,将3种消 化酶使用比例进行调整,通过混合酶消化法成功分 离得到了黄颡鱼肠道上皮细胞。分离得到的肠上 皮细胞呈铺路石状,这与在黄姑鱼、鲫、草鱼等中 观察到的形态相一致^[19-21]。CK-18是肠道上皮细胞的主要骨架蛋白,具有高度的保守性,常用于肠道上皮细胞的鉴定^[22];碱性磷酸酶是肠道上皮细胞微绒毛的标志性酶,是鉴定肠上皮细胞的一个标志物^[23]。本实验中CK-18免疫荧光染色和碱性磷酸酶染色结果皆为阳性,进一步证明分离得到的细胞为黄颡鱼肠道上皮细胞。

相关研究数据显示, β-伴大豆球蛋白引起肠道 损伤的程度受剂量和刺激时间的影响。如Li等^[24] 研究发现随着日粮β-伴大豆球蛋白添加量(20-80 g/ kg)的增加、鲫前肠中炎症因子tnf- α 和il-1 β 的mRNA 表达量先上升后下降,以60 g/kg添加组中表达量最 高; Kang等^[25]通过口服给药β-伴大豆球蛋白,发现 与0h相比、肉鸡雏鸡十二指肠il-8的mRNA表达量 于1h显著降低,于12h最高,同时在12h的样品中观 察到肠绒毛显著受损。因此为了探索黄颡鱼肠道 上皮细胞内质网对不同浓度β-伴大豆球蛋白的响 应,本实验设置了0、2、4、8和12 mg/mL不同浓度 β-伴大豆球蛋白处理组,刺激黄颡鱼肠道上皮细胞 24h, 从内质网角度探讨不同浓度β-伴大豆球蛋白 对黄颡鱼肠道上皮细胞的影响。结果显示,内质网 应激标志基因grp78的mRNA表达量随B-伴大豆球 蛋白浓度的升高而上升。除atf6外, UPR信号通路 起始因子(irel和perk)、UPR信号通路下游转录因 子(traf2、xbp1、jnk、eif2a和chop)、自噬(beclin1、 atg1a、atg3和lc3a)、炎症(nf-κb, tnf-a和il-12)及调 亡(baxa, bcl2和caspase9)相关基因的表达水平均在 4 mg/mL处理组显著达到最高, β-伴大豆球蛋白浓 度超过4 mg/mL时,相关基因表现出下降的趋势。 推测可能因过高的β-伴大豆球蛋白刺激浓度所 致。过高浓度的B-伴大豆球蛋白损害黄颡鱼肠道 黏膜细胞功能,导致功能的低反应性,反应为



Fig. 6 mRNA expression of autophagy- and apoptosis-related genes in cells suffered 12h, 24h and 36h stimulation by 4 mg/mL β -conglycinin

A. 自噬相关基因; B. 凋亡相关基因

A. Genes relate with autophagy; B. Genes relate with apoptosis

UPR轴、自噬、凋亡、炎症等相关因子mRNA转 录水平的低表达。因刺激物浓度过高导致机体细 胞生理功能低反应在Luo等^[26]研究也有报道,即饲 料中使用β-伴大豆球蛋白替代鱼粉(40—160 g/kg),



图 7 4 mg/mL β-伴大豆球蛋白处理细胞12h、24h和36h后炎症 相关因子的mRNA表达量

Fig. 7 mRNA expression of inflammation-related genes in cells suffered 12h, 24h and 36h stimulation by 4 mg/mL β -conglycinin

60 g/kg添加组鲤肠道炎症因子mRNA表达量著达 最高,后随β-伴大豆球蛋白浓度的升高而显著下 降。综上所述,本研究认为4 mg/mL β-伴大豆球蛋 白可有效引起黄颡鱼肠道上皮细胞内质网应激及 相应反应。

为进一步验证上述结论,本研究使用4 mg/mL 的β-伴大豆球蛋白分别刺激黄颡鱼肠道上皮细胞, 在12h、24h和36h取样进行检测。CCK-8细胞活性 实验表明,4 mg/mL β-伴大豆球蛋白浓度刺激下黄 颡鱼肠道上皮细胞的活性显著受处理时间的影响, 并随处理时间的延长显著下降,在24h时和36h时显 著低于对照组。这与Liu等^[27]的研究结果相一致, 随着1 mg/mL β-伴大豆球蛋白处理时间的延长,鱼 类肠道上皮细胞的活性显著下降。

结合上述不同浓度β-伴大豆球蛋白刺激实验数据,选取24h样品进行透射电镜观察,结果显示4 mg/mL β-伴大豆球蛋白刺激24h显著引起黄颡鱼肠道上皮细胞内质网应激,内质网明显发生肿胀。



图 8 4 mg/mL β-伴大豆球蛋白处理细胞24h后细胞内质网形态变化

Fig. 8 Morphological change of endoplasmic reticulum suffered 24h stimulation by 4 mg/mL β-conglycinin

白色箭头White arrow: 内质网endoplasmic reticulum



图 9 4 mg/mL β-伴大豆球蛋白处理细胞24h后GRP78和LC3免疫荧光染色

Fig. 9 Immunofluorescence intensity of GRP78 and LC3 in cells suffered 24h of 4 mg/mL β-conglycinin stimulation

A. GRP78和LC3双染免疫荧光; B. 免疫荧光强度量化; **表示差异极显著(P<0.01)

A. Immunofluorescence of GRP78 and LC3; B. Immunofluorescence intensity quantification; **indicates extremely significant difference (*P*<0.01)





A. Immunofluorescence of Caspase3 and Tunel, B. Immunofluorescence intensity quantification; **indicates extremely significant difference (P < 0.01)

对不同取样时间点样品进行内质网应激相关基因 表达水平检测,发现内质网应激标志基因grp78和 UPR信号通路起始因子perk的mRNA表达量随β-伴 大豆球蛋白处理时间的增长而增加,分别在36h和 24h达到最高。UPR信号通路起始因子atf6、自噬 (beclin1和lc3a)、凋亡(bcl2, caspase3和caspase9)和 炎症因子(nf-κb, tnf-a和il-12)相关基因mRNA表达 量表则均在24h表达量显著最高,这与上述不同浓 度β-伴大豆球蛋白对黄颡鱼肠道上皮细胞的影响 实验中相关基因的表达均在4 mg/mL β-伴大豆球 蛋白处理组表现最高的结果相一致。进一步证明 了使用4 mg/mL β-伴大豆球蛋白刺激黄颡鱼肠道 原代细胞24h构建内质网应激模型的可行性。

利用免疫荧光双染法进一步对4 mg/mL β-伴 大豆球蛋白刺激24h的黄颡鱼肠道上皮细胞中内质 网应激标志基因GRP78、自噬标志蛋白LC3的蛋白 表达水平进行检测,同时对细胞进行Caspase3蛋白 和Tunel染色。结果显示,与对照组相比,4 mg/mL β-伴大豆球蛋白处理组的黄颡鱼肠道上皮细胞 GRP78和LC3蛋白表达显著升高, 调亡相关蛋白 Caspase3的表达和细胞凋亡信号显著增多。自噬 是内质网应激期间必不可少的保护机制,内质网应 激初期时可引发细胞自噬,缓解内质网应激^[28]。 Liu等^[29]研究发现, 鲤在含有As₂O₃的水体中养殖能 够造成鳃组织的内质网应激,同时自噬标志物 Beclin1和LC3-II表达上调,自噬水平增强。细胞调 亡是内质网应激过强时的一种保护机制. 当过度或 者长期处于内质网应激时,细胞将启动凋亡,清除 多余的受损细胞,减少组织受损。有研究表明,内 质网应激可以直接促凋亡分子Bax的表达,诱导 Caspase9活化, 激活Caspase3导致细胞最终调亡^[30]。 在本研究中,细胞在经过4 mg/mL β-伴大豆球蛋白 处理24h后内质网应激、自噬和凋亡相关基因mRNA 表达量显著最多,后续免疫荧光结果与荧光定量结 果一致,证明了4 mg/mL 的β-伴大豆球蛋白能够成 功构建黄颡鱼肠道上皮细胞内质网应激模型。综 上所述,本研究使用4 mg/mL β-伴大豆球蛋白处理 24h细胞,成功构建了黄颡鱼肠道上皮细胞内质网 应激和自噬模型。

4 结论

本研究通过酶消化法成功分离得到黄颡鱼肠 道上皮细胞,并使用β-伴大豆球蛋白成功构建了内 质网应激模型。通过RT-qPCR、透射电镜和免疫 荧光染色等手段,发现4 mg/mL β-伴大豆球蛋白处 理黄颡鱼肠道上皮细胞24h能显著引起内质网应激, 表现为细胞内质网的肿胀,UPR信号通路关键基 因、炎症、自噬、凋亡等相关基因的高表达,黄颡 鱼肠道上皮细胞自噬与凋亡水平升高。本实验为 研究内质网应激及UPR信号通路在鱼类SBMIE发 生发展中的作用机制提供可用的离体模型,为进一 步挖掘基于内质网应激的鱼类炎性肠病调控靶点 的研究提供前期基础。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- Solis A G, Klapholz M, Zhao J, et al. The bidirectional nature of microbiome-epithelial cell interactions [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2020(56): 45-51.
- [2] Rahimnejad S, Lu K, Wang L, et al. Replacement of fish meal with Bacillus pumillus SE5 and Pseudozyma aphidis ZR1 fermented soybean meal in diets for Japanese seabass (Lateolabrax japonicus) [J]. Fish & Shellfish

Immunology, 2019(84): 987-997.

- [3] Zhou Z, Ringø E, Olsen R E, et al. Dietary effects of soybean products on gut microbiota and immunity of aquatic animals: a review [J]. Aquaculture Nutrition, 2018, 24(1): 644-665.
- [4] Liu Z Y, Yang H L, Li S, et al. Probiotic components of Bacillus siamensis LF4 mitigated β-conglycinin caused cell injury via modulating TLR2/MAPKs/NF-κB signaling in Lateolabrax maculatus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023(141): 109010.
- [5] Zhang J-X, Guo L-Y, Feng L, *et al.* Soybean β-conglycinin induces inflammation and oxidation and causes dysfunction of intestinal digestion and absorption in fish [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58115.
- [6] Li Y, Hu H, Liu J, *et al.* Dietary soya allergen β-conglycinin induces intestinal inflammatory reactions, serumspecific antibody response and growth reduction in a carnivorous fish species, turbot *Scophthalmus maximus* L [J]. *Aquaculture Research*, 2017, **48**(8): 4022-4037.
- [7] Zhang Y L, Jiang W D, Duan X D, et al. Soybean glycinin caused NADPH-oxidase-regulated ROS overproduction and decreased ROS elimination capacity in the mid and distal intestine of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Aquaculture, 2020(516): 734651.
- [8] Stengel S T, Fazio A, Lipinski S, et al. Activating transcription factor 6 mediates inflammatory signals in intestinal epithelial cells upon endoplasmic reticulum stress [J]. Gastroenterology, 2020, 159(4): 1357-1374.
- [9] Adolph T E, Niederreiter L, Blumberg R S, et al. Endoplasmic reticulum stress and inflammation [J]. *Digestive Diseases*, 2012, 30(4): 341-346.
- [10] Hosomi S, Grootjans J, Tschurtschenthaler M, et al. Intestinal epithelial cell endoplasmic reticulum stress promotes MULT1 up-regulation and NKG2D-mediated inflammation [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2017, **214**(10): 2985-2997.
- [11] Ibrahim I M, Abdelmalek D H, Elfiky A A. GRP78: a cell 's response to stress [J]. *Life Sciences*, 2019(226): 156-163.
- [12] Kokame K, Kato H, Miyata T. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(12): 9199-9205.
- [13] Coleman O I, Haller D. ER stress and the UPR in shaping intestinal tissue homeostasis and immunity [J]. Frontiers in Immunology, 2019(10): 2825.
- [14] Tan Y R, Shen S Y, Shen H Q, et al. The role of endoplasmic reticulum stress in regulation of intestinal barrier and inflammatory bowel disease [J]. Experimental Cell Research, 2023, 424(1): 113472.
- [15] Solà Tapias N, Denadai-Souza A, Rolland-Fourcade C, et al. Colitis linked to endoplasmic reticulum stress induces

trypsin activity affecting epithelial functions [J]. *Journal* of Crohn's & Colitis, 2021, **15**(9): 1528-1541.

- [16] Xia T, Mao X J, Zhang J, et al. Effects of quercetin and hydroxytyrosol supplementation in a high-fat diet on growth, lipid metabolism, and mitochondrial function in spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) [J]. Aquaculture, 2024(582): 740538.
- [17] Zhao L, Liang J, Chen F, et al. High carbohydrate diet induced endoplasmic reticulum stress and oxidative stress, promoted inflammation and apoptosis, impaired intestinal barrier of juvenile largemouth bass (*Microp*terus salmoides) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021(119): 308-317.
- [18] Li W J, Wu H X, Zhang L, *et al.* Effects of replacing soybean meal protein with cottonseed protein concentrate on the growth condition and intestinal health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2021, 27(6): 2436-2447.
- [19] Wang L G, Zeng Y Q, Wang B, et al. Isolation, culture and identification of intestinal epithelial cells of Nibea albiflora in vitro [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(2): 1296-1304. [王立改, 曾延清, 汪波, 等. 黄姑鱼肠道上皮细胞体外分离培养及鉴定 [J]. 动物营 养学报, 2022, 34(2): 1296-1304.]
- [20] Song Z F, Wu T X, Pan X D. Study primary culture methods of intestinal epithelial cells of crucian carp (*Carassius auratus*)
 [J]. *Freshwater Fisheries*, 2008, **38**(1): 67-69. [宋增福, 吴天星, 潘晓东. 鲫肠道上皮细胞原代培养 方法的研究 [J]. 淡水渔业, 2008, **38**(1): 67-69.]
- [21] Yao S B, Ye Y T, Cai C F, et al. Dissociation and primary culture of *Ctenopharyngodon idellus* intestinal epithelial cells [J]. 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 [J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(1): 33-41.]
- [22] Zhan K, Lin M, Zhao Q M, et al. Biological characterization of bovine mammary epithelial cell lines immortalized by HPV16 E6/E7 and SV40T [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal, 2016, 52(9): 906-910.
- [23] Li S, Liu Z Y, Yang H L, et al. Study on primary culture and identification of intestinal epithelial cells in Lateolabrax maculatus [J]. Fishery Sciences, 2023, 1-12 [李莎, 刘紫严,杨红玲,等.花鲈肠上皮细胞原代培养及鉴定 方法的探讨研究 [J]. 水产科学, 2023, 1-12.]
- [24] Li L, Li M, Zhu R, *et al.* Effects of β-conglycinin on growth performance, antioxidant capacity and intestinal health in juvenile golden crucian carp, *Carassius auratus* [J]. *Aquaculture Research*, 2019, **50**(11): 3231-3241.
- [25] Kang D R, Belal S A, Song K D, et al. Soybean β-conglycinin induces intestinal immune responses in chicks [J]. Brazilian Journal of Poultry Science, 2020, 22(2).
- [26] Luo Q, Zhou Z, Zhao J, et al. Dietary β-conglycinin induces intestinal enteritis and affects glycerophospho-

lipid and arginine metabolism in mirror carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Aquaculture*, 2023(567): 739257.

- [27] Liu Z Y, Yang H L, Ding X Y, et al. Commensal Bacillus siamensis LF4 ameliorates β-conglycinin induced inflammation in intestinal epithelial cells of Lateolabrax maculatus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023(137): 108797.
- [28] Yang X, Srivastava R, Howell S H, et al. Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reti-

culum stress [J]. The Plant Journal, 2016, 85(1): 83-95.

- [29] Liu Y, Zhao H, Yin K, *et al.* The protective effect of Zn²⁺ on As³⁺ toxicity in common carp: resistance to oxidative stress, inhibition of endoplasmic reticulum stress, apoptosis and autophagy [J]. *Aquaculture*, 2022(546): 737375.
- [30] Xiong Z, Jiang R, Li X, *et al.* Different roles of GRP78 on cell proliferation and apoptosis in cartilage development [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, **16**(9): 21153-21176.

ESTABLISHMENT ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS MODEL INDUCED BY β-CONGLYCININ IN INTESTINAL EPITHELIAL CELLS OF HYBRID YELLOW CATFISH (PELTEOBAGRUS FULVIDRACO ♀ ×PELTEOBAGRUS VACHELLI ♂)

ZHANG Zi-Hao¹, GUO Chao-Hui¹, ZHANG Mei-Na¹, HONG Jia-Le¹, YU Guang-Qing¹, DONG Peng-Sheng¹, HUANG Xiao-Cheng¹, YANG Zhen-Jiang¹, WANG Yan-Hui², LI Ming¹ and LIU Bian-Zhi¹

College of Animal Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China;
 Henan Academy of Fishery Science, Zhengzhou 450044, China)

Abstract: The purpose of this study was to establish an endoplasmic reticulum stress model induced by β -conglycinin using intestinal epithelial cells from hybrid vellow catfish. The method involved isolating intestinal epithelial cells using an enzyme digestion method. Cells were identified through morphological assessment, cytokeratin-18 (CK-18) immunofluorescence, and alkaline phosphatase staining. Following isolation, well-grown cells were stimulated with different levels of β-conglycinin for 24h. RT-qPCR was employed to measure mRNA expression of relative indexes to determine the optimal stimulation concentration. Subsequently, cells were stimulated at the optimal concentration for 0, 12h, 24h and 36h, RT-qPCR, CCK8, transmission electron microscopy, and immunofluorescence were used for measuring the relative indexes to determine the suitable stimulation time. The results indicated that: (1) Successful isolation of intestinal epithelial cells from hybrid yellow catfish, characterized by paving stone-like cell morphology and positive CK-18 and alkaline phosphatase staining. (2) Identification of 4 mg/mL as the optimal stimulation concentration. Treatment with 4 mg/mL β -conglycinin significantly elevated mRNA levels of ERS, autophagy, apoptosis and inflammation related genes (P < 0.05), except for grp 78, jnk, il-10 and atf6 genes. (3) Determination of 24h as the optimal stimulation duration. Cell viability significantly decreased with prolonged stimulation time. Notably, after 24h of treatment, swellen endoplasmic reticulum, elevated levels of GRP78, LC3, Caspase3 protein, Tunle signal, and the mRNA expression of perk, atf6, beclin1, lc3a, bcl2, caspase3, caspase9 and il-12 were observed (P<0.01). In conclusion, this study successfully isolated intestinal epithelial cells from hybrid yellow catfish and established the endoplasmic reticulum stress model. These findings provides a foundation for understanding the effects of unfolded protein response on soybean meal-induced enteritis of hybrid yellow catfish.

Key words: β-conglycinin; Intestinal epithelial cells; Endoplasmic reticulum stress; Yellow catfish