

鲤疱疹病毒 II 型对异育银鲫背鳍细胞的显微形态与免疫基因表达水平的影响

夏思瑶¹, 王浩¹, Patorida Podok¹, 许丹¹,
姜有声¹, 吕利群^{1*}, 佐野元彦²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 国家水生动物病原库, 上海 201306;

2. 日本国家水产研究所渔业研究中心, 东京 516-0193)

摘要: 为研究鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)体外感染复制特征以及异育银鲫抗病毒免疫应答反应。本实验采用组织块培养法建立了异育银鲫背鳍细胞的原代培养体系。结果显示, 在 10 d 左右可观察到组织块迁移分离出新的单层细胞, 3 周左右细胞可覆盖底部面积为 25 cm² 培养瓶的底部; 经 CyHV-2 悬液感染离体培养的原代细胞, 3 d 后病毒滴度增殖至 10⁶ 拷贝/mL; 在病毒感染 6 d 后出现典型的细胞病变效应; CyHV-2 感染原代细胞后, 分析前期通过鱼体水平实验鉴定出的与该病毒感染相关的免疫基因: *PNP5a*、*MPO*、*MHC I*、*LYZ-C*、*IL-11*、*ITLN*、*PNP5a* 和 *DUSP*, Real-time Rt-PCR 结果显示大部分基因在细胞水平均有显著性的上调, 与鱼体水平实验结果一致。本研究建立了原代培养的异育银鲫背鳍细胞, 用于构建体外感染 CyHV-2 病毒的细胞模型, 为深入研究 CyHV-2 的感染复制规律及其与宿主的相互作用关系, 以及细胞水平筛选抗病毒药物实验奠定了基础。

关键词: 异育银鲫; 鲤疱疹病毒 II 型; 背鳍细胞; 原代培养; Real time Rt-PCR

中图分类号: S 917.1; S 941.41

文献标志码: A

鲫(*Carassius auratus*)是我国传统的养殖品种, 其中由兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *xingguonensis*)为父本, 以天然雌核发育的方正银鲫(*C. auratus gibelio*)为母本, 经人工授精繁育出来的异育银鲫, 是目前我国养殖最为广泛的鲫品种之一。2007 年我国江苏盐城市内等地先后发现有鲤疱疹病毒 II 型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)感染的鲫^[1], 2012 年江苏兴化和射阳等地养殖塘相继有大量感染 CyHV-2 的鲫发病^[2], 该鱼病现已成为影响鲫养殖产业健康发展的瓶颈, 亟需解决。CyHV-2 最先在患病的观赏金鱼中发现, 又被称为金鱼造血器官坏死病病毒(goldfish haema-topoietic necrosis virus, GFHNV)或鲫疱疹病毒^[3]。CyHV-2 是一种感染金鱼、鲫及其普通变种的高致病性病毒, 因其是第二个分离自鲤科鱼类的疱疹病

毒, 国际病毒系统分类与命名委员会将其命名为鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)^[4]。CyHV-2 归类于鱼疱疹病毒科(Alloherpesviridae)、鲤疱疹病毒属(*Cyprinivirus*)^[5], 其属于有囊膜的含双链线性大 DNA 基因组的病毒, 核衣壳成六边形, 直径为 175~200 nm^[6], 目前有一株完整的基因组信息的中国株被报道^[7], 全长约 290 304 bp, 编码 150 个基因。CyHV-2 感染鲫可引起鳃、体表和内脏组织广泛性出血, 其死亡率高达 90% 以上。

体外细胞系的建立为病毒的分离鉴定和免疫学研究等工作提供了便利的技术手段。目前, 已经报道的鱼类细胞系有 300 余种^[8], 包括锦鲤鳍条细胞系^[9]、鲫异倍体细胞系^[10]和鳊(*Siniperca chuatsi*)苗细胞系 MFF-1^[11]等。鱼类细胞系的构建具有成本低、实验材料易得、实验重复性好等

收稿日期: 2016-01-19 修回日期: 2016-05-30

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-12)

通信作者: 吕利群, E-mail: lqlv@shou.edu.cn

特点, 可被广泛地应用。鳍条组织具有很高的自然再生能力和体外细胞增殖潜力, 因此适合作为体外培养的对象。Xu等^[12]报道了一株锦鲤鳍条细胞系(Koi-Fin cells)应用于CyHV-2的分离和扩增实验^[12]。异育银鲫鳍条细胞系的构建在深入研究CyHV-2对鲫的致病机理、宿主的免疫防御机制及病毒与宿主的相互作用关系等科研领域具有重要的意义。本研究建立了原代培养的异育银鲫背鳍细胞系, 探讨了CyHV-2的体外增殖与感染模型, 为深入研究CyHV-2的复制规律及病毒与宿主相互作用的机制提供了新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 实验鱼与病毒株

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)体长约15 cm, 体质量约200 g, 购于上海浦东新区泥城异育银鲫养殖基地, 于实验室水族箱暂养2周后进行实验, CyHV-2病毒株由本实验室分离保存^[13]。

1.2 实验试剂

胰蛋白酶, M199培养基购自Gibco公司; 青霉素、链霉素购自Sigma公司; 碱性成纤维生长因子(bFGF), 终表皮生长因子(EGF)购自Invitrogen公司; 胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司。

1.3 异育银鲫背鳍鳍条组织细胞的原代培养

取健康鲫, 于20 mg/mL高锰酸钾溶液中浸泡30 min, 75%酒精体表消毒30 s。使用丁香油麻醉后, 在超净台内剪下异育银鲫背鳍, 用含1000

U/mL青霉素, 1000 µg/mL链霉素, 2.5 µg/mL的两性霉素B的D-PBS冲洗3次除去黏液; 在无菌条件下用剪刀将背鳍剪成约1 mm³的小块后浸泡在0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA中; 将剪碎的背鳍转移至底面积为25 cm²的细胞培养瓶中, 铺平倒置于25 °C培养箱中; 15 h后, 加入2 mL含有10%的胎牛血清(FBS), 200 U/mL青霉素, 200 µg/mL链霉素, 0.5 µg/mL两性霉素B, FGF和EGF的M199培养基; 正置于细胞培养箱中, 培养24 h后, 加入3 mL含有10% FBS, 200 U/mL青霉素, 200 µg/mL链霉素, 0.5 µg/mL两性霉素B, FGF和EGF的M199培养基。每天更换50%的新鲜培养基。按时进行显微观察, 当组织块中迁出的单层细胞达到培养基面积70%, 进行继代培养, 摸索最适宜银鲫背鳍鳍条细胞培养的条件。

1.4 CyHV-2感染和扩增

取1 mL病毒悬液(10⁴~10⁵拷贝/mL)加入到底面积25 cm²银鲫背鳍细胞培养瓶中, 25 °C孵育1 h后, 去除病毒液, 加入5 mL含10% FBS的M199培养基。25 °C培养箱培养, 观察细胞的形态变化, 并记录细胞CPE病变效应。

1.5 CyHV-2扩增曲线的测定

CyHV-2感染原代培养的细胞后第0、1、2、3、4、5、6、7、8天分别收集上清液。参照本课题组Xu等^[12]和Wang等^[14]建立的定量方法分析病毒的复制情况。采用酚—氯仿抽提法提取病毒基因组DNA, NanoDrop2000测定总DNA的纯度和浓度。PCR引物的选择参考Wang等^[14](表1),

表1 Real-time Rt-PCR引物序列

Tab. 1 Real-time Rt-PCR primers used in this study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence	退火温度/°C annealing temperature
<i>IL-11</i>	Forward: AATCTCTGTGCCAAACACTGG Reward: GGGTGA CTCTCCTCATCG	56.3
<i>ITLN</i>	Forward: GAAATACCCCGTGAAGTTAGGA Reward: GCAGTTGAATCTTTGTCTCCAG	60
<i>PNP 5 a</i>	Forward: CAGAAGATTACGATGCCGATG Reward: GTCCAGCCAGAGGGTTGTT	56.3
<i>MPO</i>	Forward: CGGTC ACTCTCTATGTCAGCA Reward: GTATCTCCAGCCCAAAGGT	60
<i>KRT-8</i>	Forward: GTTGA GAGGGAAGGTCAGGAAT Reward: CAAGGATGGCAGAGTTGTGTC	60
<i>DUSP-1</i>	Forward: TCTTCACTTCTCCATCTCCA Reward: CATTTTACCCAACGAGGACAC	60
<i>MHC I</i>	Forward: CTCATCTCCAGTCGTGTGTC Reward: AAAGGTCCCCTCATCATTAGG	60
<i>LYZ-C</i>	Forward: ACTTGATGGCTTTGAGGGATT Reward: TTACACTGGTTCTTTCCACCTG	60
<i>CyHV-2</i>	Forward: TTAGCGTCAGGTCCATAG Reward: GGCGTGTAGAAATCAAAC	59

Real-time Rt-PCR数据分析使用CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)。反应条件为95 °C 30 s、95 °C 5 s和54.9 °C 30 s, 40个循环; 65 °C 1 min。

1.6 CyHV-2感染异育银鲫鳍条细胞后相关免疫基因表达量的变化

本研究在细胞水平上分析了*L-11*、*ITLN*、*PNP5a*、*MPO*、*KRT-8*、*DUSP-1*、*MHC I*和*LYZ-C* 8个免疫相关基因在CyHV-2感染8 d后的变化情况。参照“CyHV-2感染和扩增”步骤使用CyHV-2感染细胞, 当细胞出现CPE超过80%时收集细胞; TRIzol (Invitrogen, USA)法^[15]提取RNA。RNA样品经DNase I处理去除残余基因组DNA, 使用Primer Script First Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Japan)利用随机引物反向转录合成第一链cDNA用作模板。使用β-actin作为内参基因。20 μL反应体系: 1 μL cDNA样品, 7 μL nuclease-free water, 2×10 μL 12×反应缓冲液和1 μL每个基因特定的引物(10 μmol/L)。实验引物设计参考Xu等^[12]和Podok等^[16](表1), 扩增的条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C/56.3 °C 30 s, 95 °C 1 min, 40个循环; 65 °C 1 min。参照Podok等^[16]利用2^{-ΔΔC_T}算法处理Real-time PCR数据, 使用SPSS软件进行数据处理, 采用方差分析法(ANOVA)进行显著性分析, *P*<0.05为差异显著, *P*<0.01为差异极显著。

2 结果

2.1 异育银鲫背鳍细胞的原代培养

异育银鲫背鳍组织块在25 °C培养10 d左右,

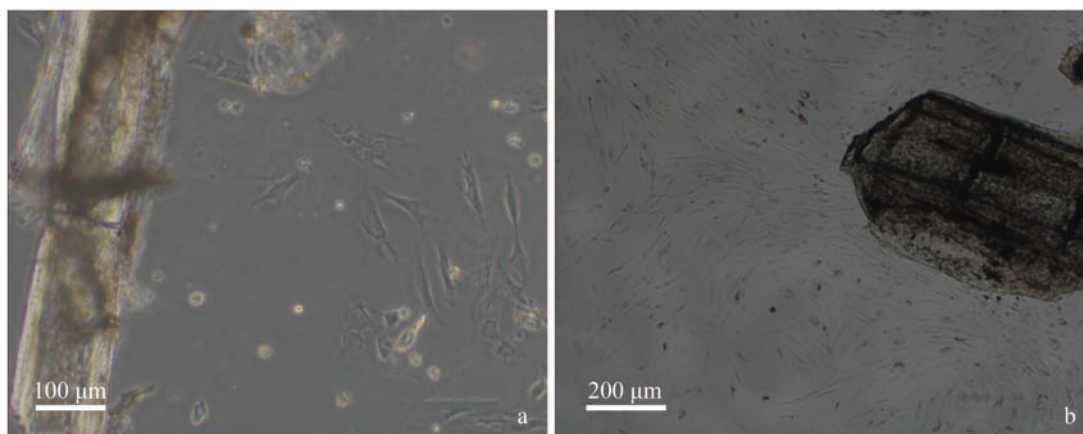


图1 异育银鲫背鳍细胞形态

a. 10 d后异育银鲫背鳍细胞从外植体迁移出来; b. 异育银鲫背鳍细胞的成纤维形态

Fig. 1 Cell morphology of *C. auratus gibelio fin* (CCF)

a. after 10 days, cells outgrowing from primary explant; b. CCF fibroblastic morphology

可观察到新的细胞从其周围分离迁出(图1-a)。细胞在3周内可完全覆盖底面积25 cm²培养瓶的底部。当细胞生长状态良好时, 在显微镜下观察呈细长轴、纤维状排列。随着细胞数量的增加, 细胞形态由细长轴型向短纤维型转变(图1-b)。经实验证实最适合异育银鲫背鳍细胞的血清浓度为15%, 最佳培养温度为25 °C。

2.2 病毒对原代培养的异育银鲫鳍条细胞的感染

经CyHV-2悬液感染CCF(*C. auratus gibelio fin*)细胞前期没有明显的细胞病变效应, 病毒感染第6天, 出现部分细胞皱缩和少量空泡化症状(图2-b), 部分细胞出现折光系数改变、细胞聚集融合现象(图2-c)。病毒感染第8天细胞出现明显的CPE(cytopathic effect)(图2-d), 部分细胞出现裂解现象, 对照组CCF细胞长势良好, 未出现任何病毒感染症状(图2-a)。综上, 经本实验分离得到的CCF原代细胞可以感染CyHV-2病毒, 并引起细胞病变效应, 与马杰等^[17]报道的CyHV-2感染异育银鲫脑组织细胞系(GiCB)出现的症状类似。

2.3 病毒增殖曲线

CyHV-2在CCF细胞中的扩增曲线表明, 病毒在感染3 d内呈对数生长, CCF细胞上清液中的病毒滴度可达到10⁶拷贝/mL(图3)。病毒在第3~10天处于平台期。结合图2分析显示, 当CyHV-2病毒在CCF细胞中滴度低于10⁶拷贝/mL时并不能引起CCF细胞明显的感染症状。当病毒量达到

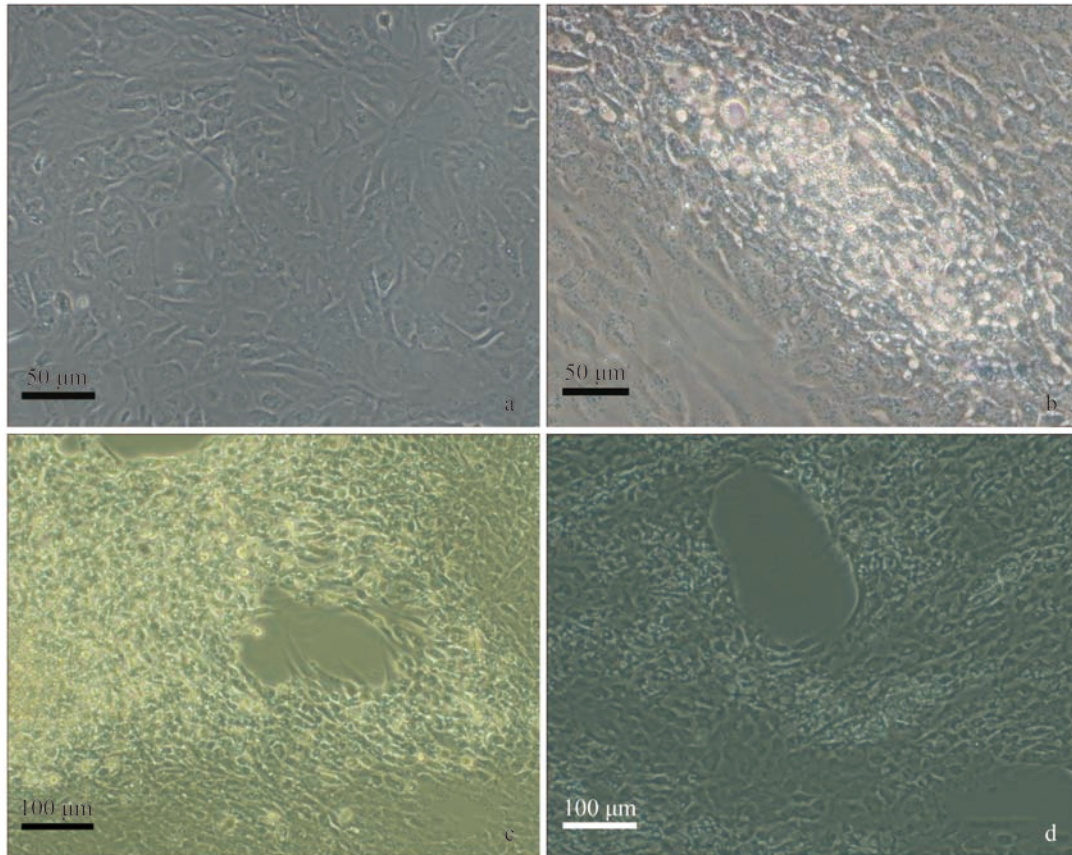


图2 CyHV-2感染1代异育银鲫背鳍细胞的细胞病变效应

a. 1代正常异育银鲫背鳍细胞；b~c. CyHV-2感染1代异育银鲫背鳍细胞6 d后的细胞病变效应；d. CyHV-2感染1代异育银鲫背鳍细胞8 d后的细胞病变效应

Fig. 2 Cytopathic effects (CPEs) of the *C. auratus gibelio* fin (CCF) cells infected with CyHV-2

a. normal CCF cells at passage 1; b-c. CCF cells infected with CyHV-2 at passage 1 at 6 dpi (days post infection); d. CCF cells infected with CyHV-2 at passage 1 at 8 dpi

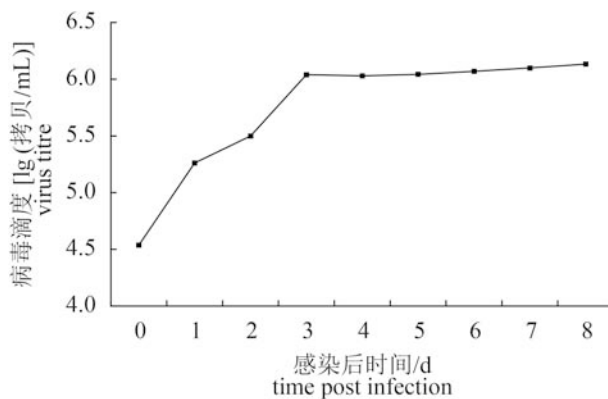


图3 CyHV-2感染CCF细胞的增殖曲线

Fig. 3 Growth curve of CyHV-2 loads in CCF cells

10^6 拷贝/mL时，病毒处于增殖平台期以后，CCF细胞可出现空泡病变和CPE等现象。综上，CyHV-2病毒可在本实验构建的CCF原代细胞中进行感染复制，完成病毒增殖。

2.4 病毒感染CCF原代细胞后相关免疫基因表达量变化

本课题组利用CyHV-2感染异育银鲫，建立抑制消减杂交文库(SSH)，分别比较分析了急性感染(感染组里已经死亡的异育银鲫)和慢性感染(感染组里存活的异育银鲫)与正常对照组之间差异的免疫相关基因^[13, 16]。分析发现急性感染组中*IL-11*、*ITLN*和*PNP5a*显著性上调，在慢性感染组中*MPO*、*KRT-8*和*DUSP-1*显著性上调。而*MHC I*和*LYZ-C*则在这两个实验组中均有显著性上调。推测上述8个基因可能参与了异育银鲫抗CyHV-2病毒的先天性免疫应答。为进一步证实上述实验结果，本研究同时分析评价本实验中构建的CCF原代细胞系能否应用于细胞水平研究CyHV-2病毒感染引起的免疫应答反应。CyHV-2感染CCF原代细胞，当细胞出现CPE病变超过

80%时收集样品, 定量研究上述8个抗病毒免疫基因, 其中7个基因均有不同程度的上调反应, *LYZ-C*基因相对上调水平最高, 约为内参基因 β -actin的10倍, *MPO*、*ITLN*和*PNP5a*均有显著性的上调, *KRT-8*、*DUSP-1*和*MHC I*有一定的上调, 而*IL-11*基因有一定的下调(图4)。除*IL-11*基因外其余7个免疫相关基因均与本课题组在鱼体水平进行的病毒感染结果一致^[13, 16]。结合鱼体水平实验结果^[16]分析*IL-11*基因, 推测其免疫调控反应可能出现在病毒感染CCF原代细胞的早期, 而本次实验取样时间是在病毒感染引起细胞出现病变效应后, 所以其与内参基因表达水平类似, 没有显著性的变化。综上, 本实验构建的CCF原代细胞系可在细胞水平上研究CyHV-2感染细胞引起的免疫调控反应。通过本实验在细胞水平上进一步证实了*ITLN*、*PNP5a*、*MPO*、*KRT-8*、*DUSP-1*、*MHC I*和*LYZ-C*基因参与了异育银鲫抗病毒先天性免疫调控反应, 其中*LYZ-C*基因上调水平最为显著, 推测其在异育银鲫先天性抗病毒免疫调控中扮演了重要的角色。

3 讨论

“鳃出血病”又称鲤疱疹病毒病, 是一种主

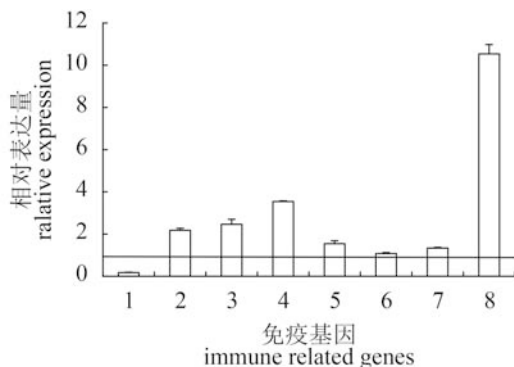


图4 免疫基因荧光定量PCR检测

免疫基因mRNA表达量用 β -actin的表达量进行标准化; 数据为3条鱼的平均值; 对各组织表达量进行显著性分析: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。1. *IL-11*, 2. *ITLN*, 3. *PNP5a*, 4. *MPO*, 5. *KRT-8*, 6. *DUSP-1*, 7. *MHC I*, 8. *LYZ-C*

Fig. 4 Real-time RT-PCR analysis of immune related genes

The innate immune gene mRNA expression levels were normalized to β -actin transcripts, and the data were expressed as means \pm standard errors ($n=3$); significant differences in the gene's expression are indicated with different letters; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

要引起鲫鳃组织大量出血、眼球突出和鳍条发白等症状的病毒性流行病。CyHV-2感染谱主要为金鱼、鲫及其普通变种, 对异育银鲫的致死率尤为突出, 达到100%。Ito等^[18]研究得出, 该病毒主要流行温度为15~28 °C, 当水温高于25 °C时发病率较低甚至不发病。目前, 国内外对CyHV-2病毒的感染机制和免疫学研究处于起步阶段, 尚无有效防控该病毒的对策。李霞等^[19]和Xu等^[12]分别报道了CyHV-2可以体外感染锦鲤的鳍条细胞系。Ito等^[20]报道了CyHV-2能够感染金鱼鳍(GFF)细胞系。马杰等^[17]报道了CyHV-2可以感染其构建的异育银鲫脑细胞系(GICB)。综合学者的研究结果, CyHV-2病毒在体外感染和复制有特异性的宿主谱, 对其他细胞系没有感染特异性, 对金鱼的鳍条细胞系(GFF)和锦鲤的鳍条细胞系有一定的敏感性, 但感染复制效率较低, 而对鲫来源的脑细胞系却有较好的感染性^[17, 20-21], 推测CyHV-2病毒对鲫来源的体外细胞系可能有较好的敏感性。研究显示鱼类的鳍条细胞在体外具有良好的增殖培养特性, 且实验技术稳定可靠, 所以本研究选用了背鳍组织作为体外培养的细胞来源。本研究成功构建了异育银鲫的背鳍组织原代细胞株(CCF), 并利用本实验室分离得到的CyHV-2对其进行感染, 发现能够引起典型的CPE病变效应和细胞空泡化(图1, 图2-b, 2-c, 2-d)。检测其病毒感染复制曲线发现该病毒能够在本研究建立的CCF原代细胞株中稳定的感染扩增(图3)。

为进一步研究本实验构建的CCF细胞株能否应用于CyHV-2病毒体外感染引起的免疫应答反应, 分析了本课题组前期在鱼体实验中鉴定出的*IL-11*、*ITLN*、*PNP5a*、*MPO*、*KRT-8*、*DUSP-1*、*MHC I*和*LYZ-C*与CyHV-2病毒感染相关的8个免疫基因。本课题组实验证实*IL-11*、*ITLN*和*PNP5a*与急性感染CyHV-2病毒的免疫调控相关; *MPO*、*KRT-8*和*DUSP-1*与感染CyHV-2病毒而不发病死亡组的鲫免疫调控相关; 而*LYZ-C*和*MHC*则在两种实验组中均有较高的上调反应^[13, 16]。利用CyHV-2病毒体外感染本研究构建的原代CCF细胞株, 发现上述免疫基因的变化基本与之前鱼体水平实验一致。其中*ITLN*上调水平显著, 它是一种新型可溶性呋喃半乳糖粘合物凝集素, 主要参与先天免疫反应^[22]。在动物宿主防御中, 其参与

细胞信号和病原体感染,通过血细胞刺激产生超氧化物阴离子^[23],目前,*ITLN*已经被证实鼠(*Mus musculus*)、人(*Homo sapiens*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)和鲢(*Silurus asotus*)^[24-25]体内都可特异性表达。*PNP5a*基因表达水平显著性上调,它是一种嘌呤代谢和功能需要的酶,这种酶在补救途径中催化核苷或脱氧核苷糖苷键的可逆磷酸化反应^[26]。*MPO*基因表达水平显著性上调,它是一种过氧化物酶特异表达的髓细胞的细胞质颗粒,尤其是中性粒细胞。它从初级中性粒细胞颗粒被释放,进而与宿主发生反应,对微生物感染起到关键作用^[27],*MPO*可以使用由呼吸道破裂产生的卤素元素(通常是氯离子)和过氧化氢产生次氯酸,有效地抵御包括细菌、真菌和病毒等微生物^[28],本研究结果与Yamamoto等^[29]报道一致,其可能推迟病毒蛋白质的迁移。如图4所示,*LYZ-C*基因显著性上调达10倍以上,与之前报道的*LYZ-C*在SGIV感染斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)后脾脏细胞过度表达的结果类似^[12]。溶菌酶在先天免疫中是一种重要的分子,可以搭建起抵御微生物入侵的屏障,参与各种防御机制,包括免疫调节、抗菌、抗炎、抗肿瘤和抗病毒等活动,其已被确定在包括斜带石斑鱼、草鱼和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)等鱼种中发挥作用^[30-31]。推测*LYZ-C*在鲫防御CyHV-2病毒感染的先天性免疫调控中具有重要的功能。本研究在原代CCF细胞水平上进一步研究了鱼体水平获得的实验结果,并证实了本实验构建的CCF原代细胞能够应用于CyHV-2感染鲫的免疫应答反应的相关研究工作。

综上,本研究开展了原代CCF细胞株的构建及其体外CyHV-2病毒感染模型建立的实验工作,为体外研究CyHV-2病毒病原学特征和药物筛选工作提供了新的技术途径。在此工作基础上,本课题组将继续对CCF原代细胞进行筛选、传代,以期建立一株稳定传代的异育银鲫背鳍细胞系,为更好地研究CyHV-2病毒提供稳定的体外感染模型。

参考文献:

[1] Jiang N, Xu J, Ma J, *et al.* Histopathology and ultrastructural pathology of cyprinid herpesvirus II

(CyHV-2) infection in gibel carp, *Carassius auratus gibelio*[J]. Wuhan University Journal of Natural Sciences, 2015, 20(5): 413-420.

- [2] Wang L, He J, Liang L, *et al.* Mass mortality caused by Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in Prussian carp (*Carassius gibelio*) in China[J]. Bulletin-European Association of Fish Pathologists, 2012, 32(5): 164-173.
- [3] Jung S J, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.)[J]. Journal of Fish Diseases, 1995, 18(3): 211-220.
- [4] Davison A J, Kurobe T, Gatherer D, *et al.* Comparative genomics of carp herpesviruses[J]. Journal of Virology, 2013, 87(5): 2908-2922.
- [5] 张奇亚, 桂建芳. 水产动物的病毒基因组及其病毒与宿主的相互作用[J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(12): 1236-1252.
- Zhang Q Y, Gui J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. Science China Life Sciences, 2014, 44(12): 1236-1252(in Chinese).
- [6] Groff J M, LaPatra S E, Munn R J, *et al.* A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1998, 10(4): 375-378.
- [7] Li L J, Luo Y Z, Gao Z X, *et al.* Molecular characterisation and prevalence of a new genotype of Cyprinid herpesvirus 2 in mainland China[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2015, 61(6): 381-387.
- [8] Swaminathan T R, Lakra W S, Gopalakrishnan A, *et al.* Development and characterization of a fibroblastic-like cell line from caudal fin of the red-line torpedo, *Puntius denisonii* (Day)(Teleostei: Cyprinidae)[J]. Aquaculture Research, 2012, 43(4): 498-508.
- [9] 肖艺, 曾令兵, 徐进, 等. 锦鲤鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(8): 767-774.
- Xiao Y, Zeng L B, Xu J, *et al.* Establishment and characterization of a cell line derived from fin of *Cyprinus carpio*[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2012, 34(8): 767-774 (in Chinese).
- [10] 陈敏容, 陈宏溪, 易兰. 鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性[J]. 水产学报, 1985, 9(2): 121-130.
- Chen M R, Chen H X, Yi Y L. The establishment of a heteroploid line from crucian carp and its biological

- characteristics[J]. Journal of Fisheries of China, 1985, 9(2): 121-130 (in Chinese).
- [11] Dong C F, Weng S P, Shi X J, *et al.* Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)[J]. Virus Research, 2008, 135(2): 273-281.
- [12] Xu J, Zeng L B, Zhang H, *et al.* Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 166(1-2): 138-144.
- [13] Xu L J, Podok P, Xie J, *et al.* Comparative analysis of differential gene expression in kidney tissues of moribund and surviving crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in response to cyprinid herpesvirus 2 infection[J]. Archives of Virology, 2014, 159(8): 1961-1974.
- [14] Wang H, Xu L, Lu L. Detection of cyprinid herpesvirus 2 in peripheral blood cells of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), suggests its potential in viral diagnosis[J]. Journal of Fish Diseases, 2016, 39(2): 155-162.
- [15] Hummon A B, Lim S R, Difilippantonio M J, *et al.* Isolation and solubilization of proteins after TRIzol[®] extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage[J]. Biotechniques, 2007, 42(4): 467-472.
- [16] Podok P, Xu L J, Xu D, *et al.* Different expression profiles of interleukin11 (IL-11), intelectin (ITLN) and purine nucleoside phosphorylase 5a (PNP5a) in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in response to Cyprinid herpesvirus 2 and *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 38(1): 65-73.
- [17] 马杰, 周勇, 范玉顶, 等. 鲤疱疹病毒 II 型的理化及生物学特性和超微形态发生[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 475-483.
- Ma J, Zhou Y, Fan Y D, *et al.* The physical-chemical and biological characteristics of Cyprinid herpesvirus 2 and its ultrastructural morphogenesis *in vitro*[J]. Journal of Fisheries China, 2016, 40(3): 475-483(in Chinese).
- [18] Ito T, Maeno Y. Effects of experimentally induced infections of goldfish *Carassius auratus* with Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) at various water temperatures [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2014, 110(3): 193-200.
- [19] 李霞, 福田颖穗. 金鱼疱疹病毒敏感细胞的体外培养[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(1): 12-18.
- Li X, Fukuda H. *In vitro* culture of goldfish cell sensitive to goldfish herpesvirus[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2003, 12(1): 12-18 (in Chinese).
- [20] Ito T, Kurita J, Ozaki A, *et al.* Growth of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in cell culture and experimental infection of goldfish *Carassius auratus*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2013, 105(3): 193-202.
- [21] Gilad O, Yun S S, Zagmutt-Vergara F J, *et al.* Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally-infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2004, 60: 179-187.
- [22] Yan J, Zhang C Q, Zhang Y, *et al.* Characterization and comparative analyses of two amphioxus intelectins involved in the innate immune response[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(5): 1139-1146.
- [23] Tsuji S, Uehori J, Matsumoto M, *et al.* Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(26): 23456-23463.
- [24] Chang M X, Nie P. Intelectin gene from the grass carp *Ctenopharyngodon idella*: cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(1): 128-40.
- [25] Takano T, Sha Z X, Peatman E, *et al.* The two channel catfish intelectin genes exhibit highly differential patterns of tissue expression and regulation after infection with *Edwardsiella ictaluri*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2008, 32(6): 693-705.
- [26] Krenitsky T A. Purine nucleoside phosphorylase: kinetics, mechanism, and specificity[J]. Molecular Pharmacology, 1967, 3(6): 526-536.
- [27] Kettle A J, Gedye C A, Winterbourn C C. Superoxide is an antagonist of anti-inflammatory drugs that inhibit hypochlorous acid production by myeloperoxidase[J]. Biochemical Pharmacology, 1993, 45(10): 2003-2010.
- [28] Foster C B, Lehrnbecher T, Mol F, *et al.* Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease[J]. Journal of Clinical Investigation, 1998, 102(12): 2146-2155.
- [29] Yamamoto K, Miyoshi-Koshio T, Utsuki Y, *et al.*

- Virucidal activity and viral protein modification by myeloperoxidase: a candidate for defense factor of human polymorphonuclear leukocytes against influenza virus infection[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 1991, 164(1): 8-14.
- [30] Wei S, Huang Y, Cai J, *et al.* Molecular cloning and characterization of c-type lysozyme gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(2): 186-196.
- [31] Jiménez-Cantizano R M, Infante C, Martín-Antonio B, *et al.* Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(1-2): 57-65.

The expression analysis of immune genes and microscopic morphology of CCF cells in response to Cyprinid herpesvirus 2 infection

XIA Siyao¹, WANG Hao¹, Patorida Podok¹, XU Dan¹,
JIANG Yousheng¹, LÜ Liqun^{1*}, Motohiko Sano²

(1. National Pathogen Collection Center of Aquatic Animals,
College of Fisheries and Life Science,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Fisheries Research Agency, National Research Institute of Aquaculture, Tokyo 516-0193, Japan)

Abstract: The aims of the current study were to investigate the primary culture of dorsal fin from Prussian carp, *Carassius auratus gibelio* and its susceptibility to Cyprinid herpesvirus 2 due to the lack of commercial cell line supporting CyHV-2 infection. The cells detached from the tissues in 10 days and fully covered the bottom of 25 cm² culture bottle in 3 weeks. Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) continuously propagated in the cultured cells, as confirmed by a quantitative real time PCR, with the highest viral concentration of 10⁶ copies/mL at 3 days post infection. In addition, cell death was observed in the dorsal fin cells upon CyHV-2 infection. Cytopathic effects (CPE) were observed as early as 6 days post-inoculation, and as the infection progressed, CPE became more apparent with cell debris and cellular exudates in inoculated cultures. The expression levels of 8 immune important genes including *IL-11*, *ITLN*, *PNP5a*, *MPO*, *KRT-8*, *DUSP-1*, *MHC I* and *LYZ-C* were significantly different after viral challenge, which were determined to be involved in host response to CyHV-2 infection previously. The results above should be helpful in further studies on CyHV-2, including elucidation of pathogenesis, host-pathogen interaction and development of anti-viral drugs that can ultimately lead to prevention of this viral disease.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; CyHV-2; dorsal fin cells; primary culture; Real time Rt-PCR

Corresponding author: LÜ Liqun. E-mail: lqlv@shou.edu.cn

Funding projects: Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-46-12)