

鳊亲环蛋白A在传染性脾肾坏死病毒增殖中的作用

胡先勤^{1,2}, 付小哲³, 董星星¹, 涂加钢¹,
赵丽娟¹, 林强^{1,3}, 李宁求^{3*}, 林鑫^{1*}

(1. 华中农业大学水产学院, 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430070;

2. 武汉轻工大学动物科学与营养工程学院, 湖北 武汉 430023;

3. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业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)

摘要: 为研究鳊亲环蛋白(CypA)在传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)感染中的作用, 通过RT-PCR克隆了CypA全长开放读码框(SC-CypA)。结果表明SC-CypA基因全长495 bp, 编码164个氨基酸, 分子量为17.59 ku。通过Blast比对和同源性进化分析, 发现其与人、鼠、原鸡和斑点鲷等物种的CypA具有高度相似性, 表明SC-CypA属于CypA家族的成员。环孢素A(CsA)具有免疫抑制作用, 是CypA的抑制剂。结果发现, CsA浓度与ISKNV增殖具有一定的剂量依赖关系; CsA作用不同时间对ISKNV均有抑制效果; CsA对ISKNV感染诱导的细胞因子的表达具有调节作用, 能抑制IL-1 β 、IL-8、IL-18和ISG15的表达。研究表明, 宿主的CypA对ISKNV的增殖起着重要的作用, 通过添加其抑制剂CsA能有效抑制病毒的增殖。

关键词: 鳊; 亲环蛋白A; 传染性脾肾坏死病毒; 环孢素A; 基因克隆; 病毒增殖

中图分类号: S 941

文献标志码: A

鳊(*Siniperca chuatsi*)是我国重要的名特优养殖鱼类, 深受消费者青睐。随着鳊养殖密度和规模的增大, 鳊的病害愈发严重^[1], 其中由传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)引起的鳊虹彩病毒病是鳊养殖中主要的病害^[2-3]。ISKNV是虹彩病毒科(Iridoviridae)肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)的代表种, 其传染性强, 发病率高, 致死率达90%以上, 给鳊的养殖业造成了巨大的损失^[4-5]。至今为止, 还缺乏防控此病毒病的高效方法。了解病毒感染和宿主免疫应答作用, 对于建立高效防控方法有重要意义。

亲环蛋白(cyclophilins, CyPs)在生物界普遍存在, 从原核到真核生物几乎所有组织中都有分布^[6-13]。CyPs家族具有肽基脯氨酸基顺反异构

酶(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase)活性, 在细胞中的分布和含量不同, 具有多种生物学功能^[14]。

1984年, 研究人员在牛胸腺细胞中报道了一种能与免疫抑制剂环孢素A(cyclosporin A, CsA)特异性结合的蛋白, 命名为亲环蛋白A(cyclophilin A, CypA)^[15]。CypA具有以下几个主要功能: 辅助蛋白质折叠; 介导CsA参与的免疫抑制反应; 参与细胞凋亡; 调控细胞间的信号转导; 参与炎症应答; 参与氧化应激反应^[14,16-18]。

CsA是由11个氨基酸组成的多肽。CsA进入细胞后先与CypA形成复合物(CypA-CsA), 再与钙调磷酸酶(calcineurin, CN)结合, 抑制CN酶活性, 并使其底物(即激活的T细胞核因子, nuclear factor of activated T cells, NF-AT)不能去磷酸化,

收稿日期: 2015-08-12 修回日期: 2015-11-02

资助项目: 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(A201501B12, A201512C03); 广东省级鱼病防治专项(2015-115); 湖北省科技支撑计划(2015BBA228)

通信作者: 李宁求, E-mail: liningq@126.com; 林鑫, E-mail: linli@mail.hzau.edu.cn

抑制了NF-AT从胞浆进入细胞核内形成转录复合体,进一步抑制IL-2、IL-4、 γ -干扰素等细胞因子的转录^[19-20]。这样CsA在转录水平上通过阻断T细胞的活化,从而实现免疫抑制效果。Colgan等^[21]对CypA基因缺陷的小鼠进行研究发现,CsA并不能使其产生免疫抑制作用,说明CsA是通过CypA而发挥其免疫抑制作用。

对CypA生物学功能研究已经成为近年来的研究热点,特别是有关CypA在病毒感染和增殖过程中的作用研究。已有研究发现CypA对多种病毒的感染和增殖过程具有调节作用,如乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)^[22-24]、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)^[25-27]、甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)^[28]、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)^[29-30]、冠状病毒(coronavirus, CoV)^[31]及水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)^[32]等。

Hu等^[33]分析了ISKNV感染鳊脑细胞系(CPB)的转录组。在转录组数据库中获得部分CypA基因序列。本研究以此为基础设计引物,用RT-PCR方法扩增得到鳊CypA的ORF序列(SC-CypA),对得到的序列进行了Blast比对和同源性分析。用CsA抑制SC-CypA活性后,研究了ISKNV的感染和复制情况,以及部分细胞炎症因子的表达情况。本研究结果有助于进一步理解ISKNV的感染与宿主蛋白之间的关系,为防治鳊虹彩病毒病提供重要的参考资料。

1 材料与方法

1.1 细胞与培养

鳊脑组织细胞系(CPB)由珠江水产研究所建立并保藏。CPB细胞用含10% FBS的L-15培养基,在28℃含5% CO₂的培养箱中进行培养。通常每3天左右传代1次,先用PBS洗细胞2次,每个T25培养瓶的细胞中加1 mL的胰酶,消化3 min,随后吸走胰酶,再加入15 mL含10% FBS的L-15培养基,将细胞吹散,摇匀分到3个T25培养瓶中培养。

1.2 病毒与感染

鳊传染性脾肾坏死病毒QY株(ISKNV-QY)由珠江水产研究所分离和保存。T25培养瓶中单层CPB细胞长到80%左右时,弃去培养基,用

PBS洗细胞1次,接种1 MOI (multiplicity of infection)的ISKNV病毒液,放入28℃含5% CO₂的培养箱中吸附2 h后,移走没有吸附的病毒,加入含5% FBS的M199培养基。28℃培养72 h可见明显病变,96 h可以收毒。感染的细胞反复冻融3次,离心收集其上清液,存放在-80℃冰箱中。

1.3 CypA ORF序列扩增

根据转录组获得的鳊CypA部分核苷酸序列和Genbank中鱼类CypA核苷酸序列设计引物。所选用序列分别来源于:斑点鲌(*Ictalurus punctatus*, EF424274.1)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*, KP119459.1)、大西洋鳕(*Gadus morhua*, HQ259745.1)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*, DQ848936.1)、大西洋鲑(*Salmo salar*, NM-001146606.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, BC100002.1)。上游引物(SC-CypA -F): ATG GCC AAG CCC CGA GTC; 下游引物(SC-CypA -R): TCA GAG CTG CCC ACA GTC GG。

以鳊肾脏的cDNA作为模板,进行PCR扩增:94℃预变性4 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;最后72℃保温7 min,4℃保存。同时设置阴性对照,相同条件下进行PCR。扩增产物经过1.5%琼脂糖凝胶电泳,经过Gel-red染色,在Gel Doc TM XR凝胶成像系统照相分析。

1.4 鳊CypA的序列特征和进化分析

从NCBI数据库中查找CypA氨基酸序列,序列名称和序列号:人(*Homo sapiens*, P62937.2);鼠(*Mus musculus*, P17742.2);原鸡(*Gallus gallus*, ACX31829.1);非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, NP_001-082659.1);斑点鲌(*I. punctatus*, NP_0011-87167.1);黄颡鱼(*P. fulvidraco*, AKD95367.1);大西洋鲑(*S. salar*, ACN12633.1);半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*, XP_008323387.1);拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*, XP_008323387.1);斑节对虾(*Penaeus monodon*, ABV90639.1);栉孔扇贝(*Chlamys farreri*, AAR11779)。鳊CypA的氨基酸分析和蛋白分析使用BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)和在线蛋白分析系统 (<http://prosite.expasy.org/>)。其3-D结构预测使用在线蛋白分析系统 (<http://swissmodel.expasy.org/>)。CypA的多序列比对使用软件ClustalX 2.0,进化树分析使用MEGA 5.2的NJ法。

1.5 抑制剂(CsA)的配制及其细胞毒性检测

将CsA粉末溶于DMSO中,配置成8 mmol/L的储存浓度,分装后于-20℃避光保存备用。将CPB细胞接种于96孔板,当细胞长到单层时,更换含有不同浓度CsA的培养液(0、2、4、8、16和32 μmol/L)(含5%的胎牛血清),在培养12、24、36、48、72和96 h后用MTS法分别检测其细胞活性。

1.6 CsA对ISKNV增殖的影响

将CPB细胞接种于24孔细胞培养板,当细胞长至50%~60%融合时换入含不同浓度CsA的培养基,同时设立DMSO为对照组,CsA作用12 h后接种1 MOI的ISKNV,吸附完成后换入含不同浓度CsA的培养基,ISKNV感染后24、48和72 h收取样品。用q-PCR法检测病毒滴度。

1.7 CsA对ISKNV诱导的细胞因子表达的影响

将CPB细胞接种于6孔细胞培养板中,等细胞长到50%~60%融合时,换入含有CsA的细胞培养液,同时设立DMSO为对照组。CsA作用12 h后接种1 MOI的ISKNV。另设一组接种无血清的M199培养基,作为正常细胞对照组。感染后6、12、24、36、48和72 h收取样品,加入TRIzol试剂裂解,置于-80℃冰箱中保存备用。

1.8 病毒滴度的测定

根据本实验室已经建立的方法^[34],采用TaqMan探针法的实时荧光定量PCR,用

ORF007基因作为特异性引物,根据公式 $y=1.076x+0.545$ 换算病毒的TCID₅₀,其中y为病毒拷贝数对数,x为病毒滴度的对数。

1.9 实时荧光定量反转录PCR(qRT-PCR)

使用TRIzol试剂盒提取总RNA,参照说明书进行。反转录使用PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser试剂盒,每个样品使用1 μg总RNA进行反转录。使用SYBR染料法(TaKaRa的SYBR Premix Ex Taq试剂盒)进行相对定量PCR,以鳊的18s rRNA作为内参,用 $\Delta\Delta C_T$ 法计算,设定全培养基组为100%。使用ABI 7500荧光定量PCR仪,反应条件:95℃预变性30 s;40个循环,95℃5 s,60℃34 s。扩增反应完成后,进行溶解曲线分析,以确定引物的特异性。实验中所用引物见表1。

2 结果与分析

2.1 鳊CypA序列分析

通过RT-PCR扩增得到鳊CypA(SC-CypA)的ORF序列(GenBank登录号KT208377),其长度为495 bp,编码164个氨基酸,推测分子量为17.59 ku,预测其等电点为8.69(图1)。对其和另外12个物种的蛋白保守区域进行比对,这12个物种包括2种哺乳类(人和鼠)、1种鸟类(原鸡)、1种爬行类(非洲爪蟾)、5种鱼类(鳊、黄颡鱼、斑点鲶、大西洋鲑和半滑舌鲷)、2种节肢动物(拟穴青蟹和

表1 qRT-PCR引物

Tab. 1 Primers used for qRT-PCR

引物 primers		序列(5'-3') sequence(5'-3')
白介素1β IL-1β	q-SC-IL1β-F	GGACAGCGACATGGTGCGATT
	q-SC-IL1β-R	TTGAAGGTTCCGGTGGCGTTGG
白介素8 IL-8	q-SC-IL8-F	CCTCTATTGTGGTGCTCCTGGC
	q-SC-IL8-R	GATCTCAGTCTCCTCGCAGTGG
白介素18 IL-18	q-SC-IL18-F	ACTACACAGCAGCAATGTCAGG
	q-SC-IL18-R	GCAGCACGCCACTATCTTCTTG
干扰素刺激基因15 ISG15	q-SC-ISG15-F	CGACGAGACTGTGAGCGACTTC
	q-SC-ISG15-R	CATTCATCATCTCCCTGCCTTGGT
18s rRNA	q-SC-18s-F	CATTCGTATTGTGCCGCTAGA
	q-SC-18s-R	CAAATGCTTTCGCTTTGGTC

```

1      ATGCCAAGCCCCGAGTCTTCTTCGATATCGCCTCTGACGGTGCCTCCATGGGACGGATT
1        M A K P R V F F D I A S D G A S M G R I
61     GTGATGGAGCTCGACGCCGACGTGGTGCCCAAGACTGCTGAGAACTCCGTGCCCTCTGCT
21       V M E L D A D V V P K T A E N F R A L C
121    ACCGGCGAGAAGGGCTTCGGCTACAAGGGCTCCACCTTCCACCGCATCATCCCTGACTTC
41       T G E K G F G Y K G S T F H R I I P D F
181    ATGTGCCAGGGCGGCGACTTCACCAACCACAACGGAAGTGGTGGAAAGTCCATCTACGGC
61       M C Q G G D F T N H N G T G G K S I Y G
241    AACAAGTTCGCCGACGAGAACTTCACTCTGAAGCACACCGGTGCCGCATCCTGTCCATG
81       N K F A D E N F T L K H T G A G I L S M
301    GCCAACCCGGACCAACACCAACGGGTCCCAGTTCTTCATCTGCACGGCCCAACATCGG
101      A N A G P N T N G S Q F F I C T A Q T S
361    TGGCTTGATGGGAAGCACGTGGTTCGGGAGGGTATCGAGGGGCTAGACATTGTAAGG
121      W L D G K H V V F G R V I E G L D I V R
421    AAGATGGAGTCGAAGGGCACCCAGGGCGGCAAAACCAATCCAAGTCGTCATCGCCGAC
141      K M E S K G T Q G G K T K S K V V I A D
481    TGTGGCAGCTCTGA
161      C G Q L *

```

图1 鳃CypA基因的ORF碱基序列和氨基酸序列

ORF的起始密码子为ATG，终止密码子TGA；斜体为氨基酸的序列；核苷酸和氨基酸的序号列于左边；*表示终止位

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of CypA open reading frame(ORF) from *S. chuatsi*

The start codon (ATG) and stop codon (TGA) of ORF; the deduced amino acids are italic; nucleotide and deduced amino acid residues are numbered on the left; the stop bit is an asterisk

斑节对虾)和1种软体动物(栉孔扇贝)。结果表明, SC-CypA也包含1个PPIase核心结构域, 位于48~65位氨基酸(YKGSTFHRIIPDF MCQGG), 该结构从无脊椎动物到脊椎动物都高度保守(图2)。对于PPIase活性起重要功能的保守氨基酸残基是Y48、R55和F60。此外在所有CypA中高度保守的13个氨基酸残基(R55、F60、M61、Q63、G72、A101、N102、A103、Q111、F113、W121、L122和H126)也出现在SC-CypA中。用蛋白分析软件对SC-CypA进行三维结构预测, 结果表明其与人类CypA结构类似, 也包括8个β折叠和3个α螺旋结构, 通过其中的4个β折叠(K49-I56、F60-G64、G96-A101、Q111-T116)和1个环(Q118-H126)所形成的袋状结构与CsA结合(图3)。通过与前述12个物种构建进化树, CypA基因形成了软体动物、节肢动物、硬骨鱼类、两栖动物、鸟类和哺乳类6个分支。其中硬骨鱼类共形成了2个分支, 黄颡鱼和斑点鲶聚在一起, 鳃虽和大西洋鲑、半滑舌鳎聚在一起成另一支, 但又独立成一个小分支, 基本上和这些鱼类的亲缘关系远近相一致(图4)。

2.2 CsA对CPB细胞毒性检测

当CsA浓度小于等于8 μmol/L时, 在各个时间点都对细胞活力无显著影响, 所以确定后续研究使用CsA的最大浓度为8 μmol/L(图5)。

2.3 CsA对ISKNV增殖的影响

将CPB细胞接种于24孔细胞培养板, 测定不同浓度的CsA(0.5、1、2、4和8 μmol/L)对ISKNV增殖的影响, 同时用DMSO作为对照, 感染后72 h收毒。当浓度大于2 μmol/L时, CsA对ISKNV增殖的抑制作用随浓度增大也相应增加(图6)。确定了CsA对ISKNV增殖的抑制作用后, 选用最大的抑制浓度8 μmol/L, 在感染ISKNV后12、24、36、48和72 h分别收取样品, 用q-PCR法测定病毒的滴度(图7)。从中可以看出在ISKNV感染的不同时间, CsA均能显著抑制其增殖, 其中在作用后72 h抑制效果最显著。

2.4 CsA对ISKNV感染诱导细胞因子表达的影响

ISKNV的感染会诱导宿主的先天性免疫反应, 导致宿主的一些细胞因子的表达发生变化。为研究CsA对ISKNV感染后的细胞因子表达

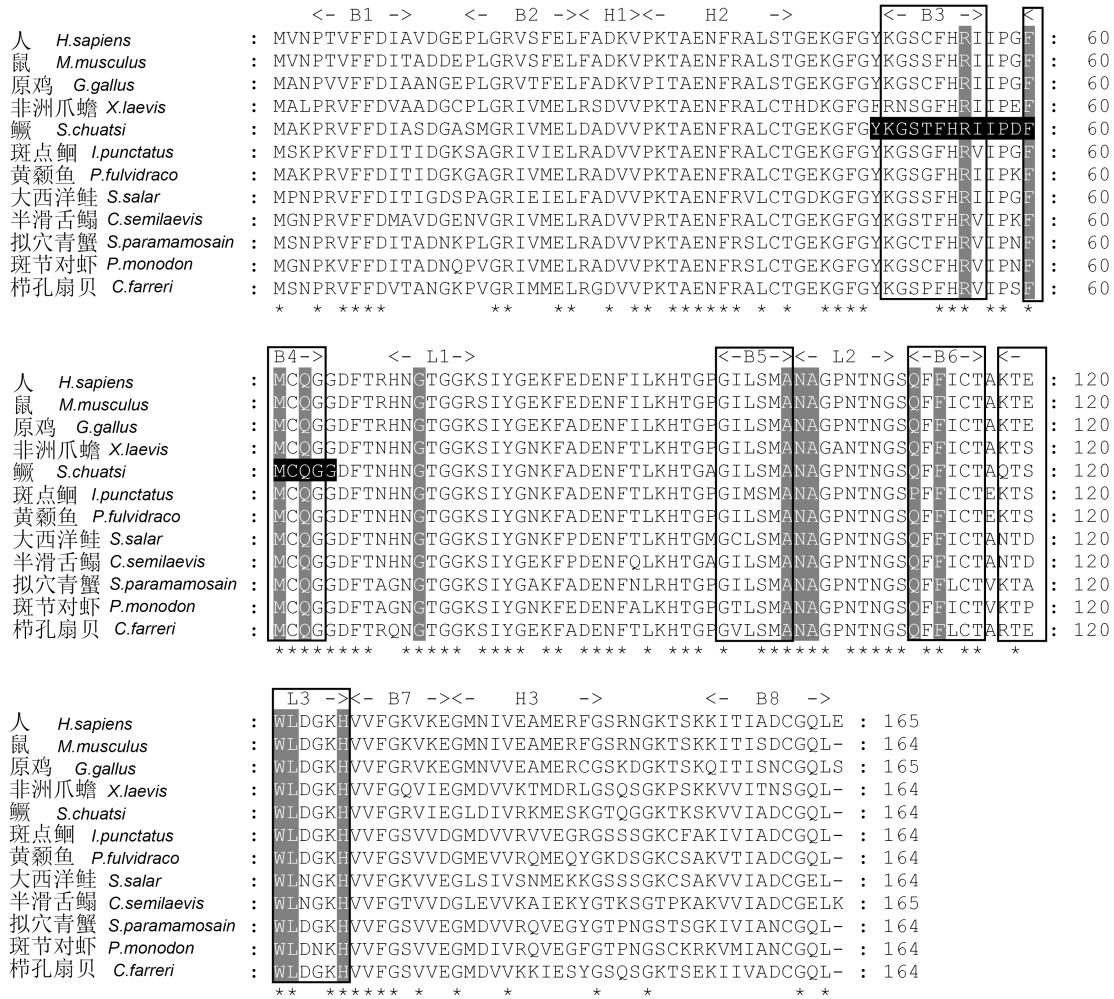


图2 鳊CypA与一些物种的CypA氨基酸序列比较

“B”表示β-折叠；“H”表示α-螺旋；“L”表示环；方框内表示CsA结合的区域(4个β-折叠和1个环)；浅色阴影部分显示的是13个与CsA相结合的保守氨基酸残基；深色阴影表示PPIase的信号区

Fig. 2 Multiple alignments of amino acid sequences of Cyclophilin A from *S. chuatsi* and other animals

“B”indicates β-strand; “H” indicates α-helix; “L” indicates loop; the cyclosporine A binding domains (four β-strands and one loop) are indicated on the top of sequences and are boxed; the 13 well conserved residues that constitute the CsA-binding site are shadowed; the signature of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is deep shadowed

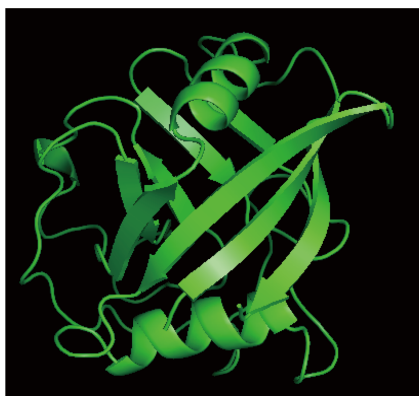


图3 鳊CypA的3D结构图

Fig. 3 The 3-D structure of SC-CypA

的影响，于感染后的6、12、24、36、48和72 h分别收集样品，用qRT-PCR方法检测CPB细胞中细胞因子的变化。结果表明，CsA对ISKNV感染后诱导的IL-1β、IL-8、IL-18和ISG15的表达均有抑制作用(图8)。

3 讨论

采用RT-PCR扩增技术获得了鳊CypA的ORF序列。通过生物学信息分析表明，鳊的CypA也包含有1个亲环蛋白的PPIase结构域，该结构域从无脊椎动物到脊椎动物都是高度保守的，提示鳊CypA也具有亲环蛋白的PPIase活性功

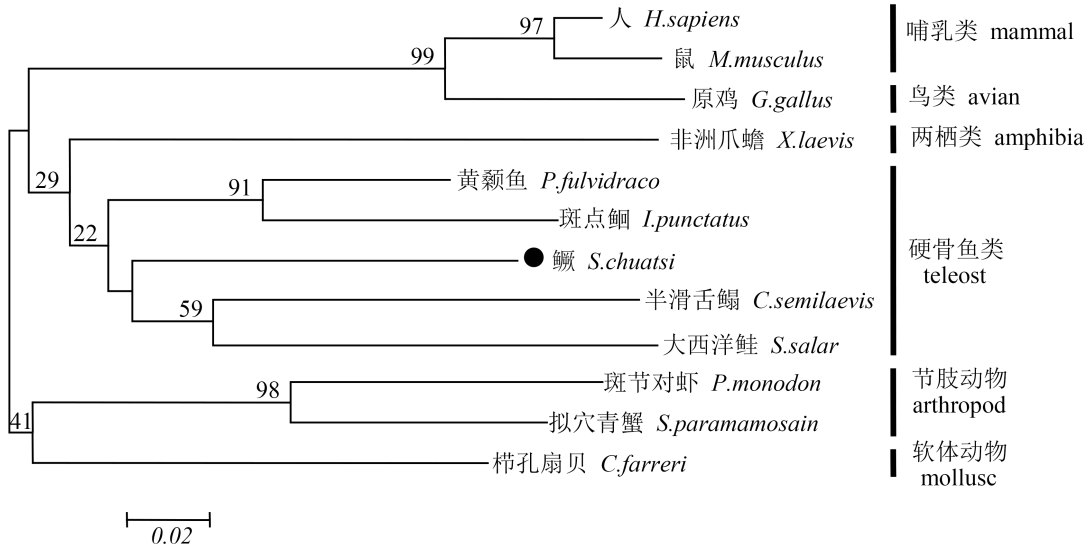


图 4 鳊CypA与其他动物CypA的进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of SC-CypA and other animals CypA

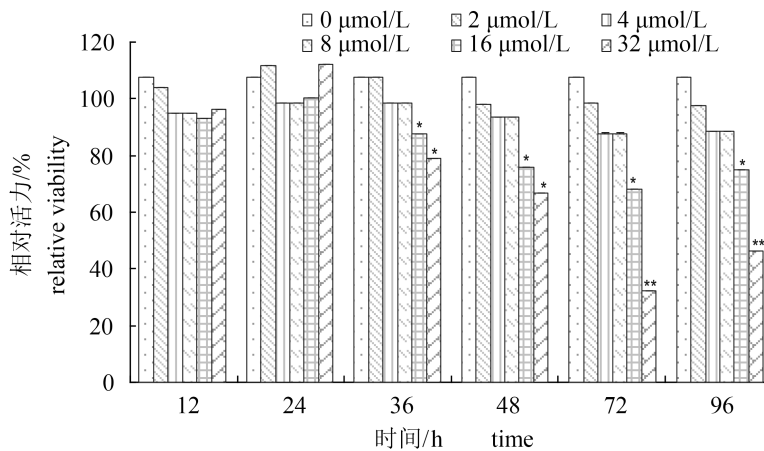


图 5 MTS法检测CsA对CPB细胞的毒性

Fig. 5 Cellular toxicity of CsA to CPB cell analyzed by MTS

“*”代表与对照组有显著性差异($P < 0.05$); “**”代表与对照组有极显著性差异($P < 0.01$); 下同

“*” indicates that it is significantly different compared with the control group ($P < 0.05$); “**” indicates that it is highly significantly different compared with the control group ($P < 0.01$); the same below

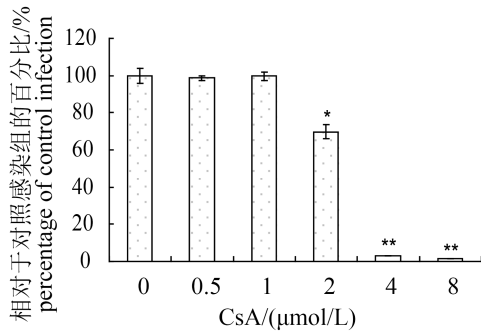


图 6 不同浓度CsA对ISKNV增殖的影响

Fig. 6 Effects of different concentration of CsA on the ISKNV replication

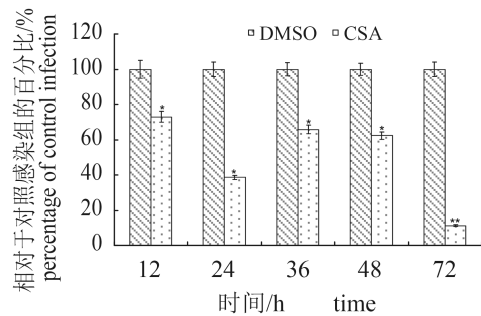


图 7 CsA作用不同时间对ISKNV增殖的抑制

Fig. 7 CsA inhibits the ISKNV replication at different time

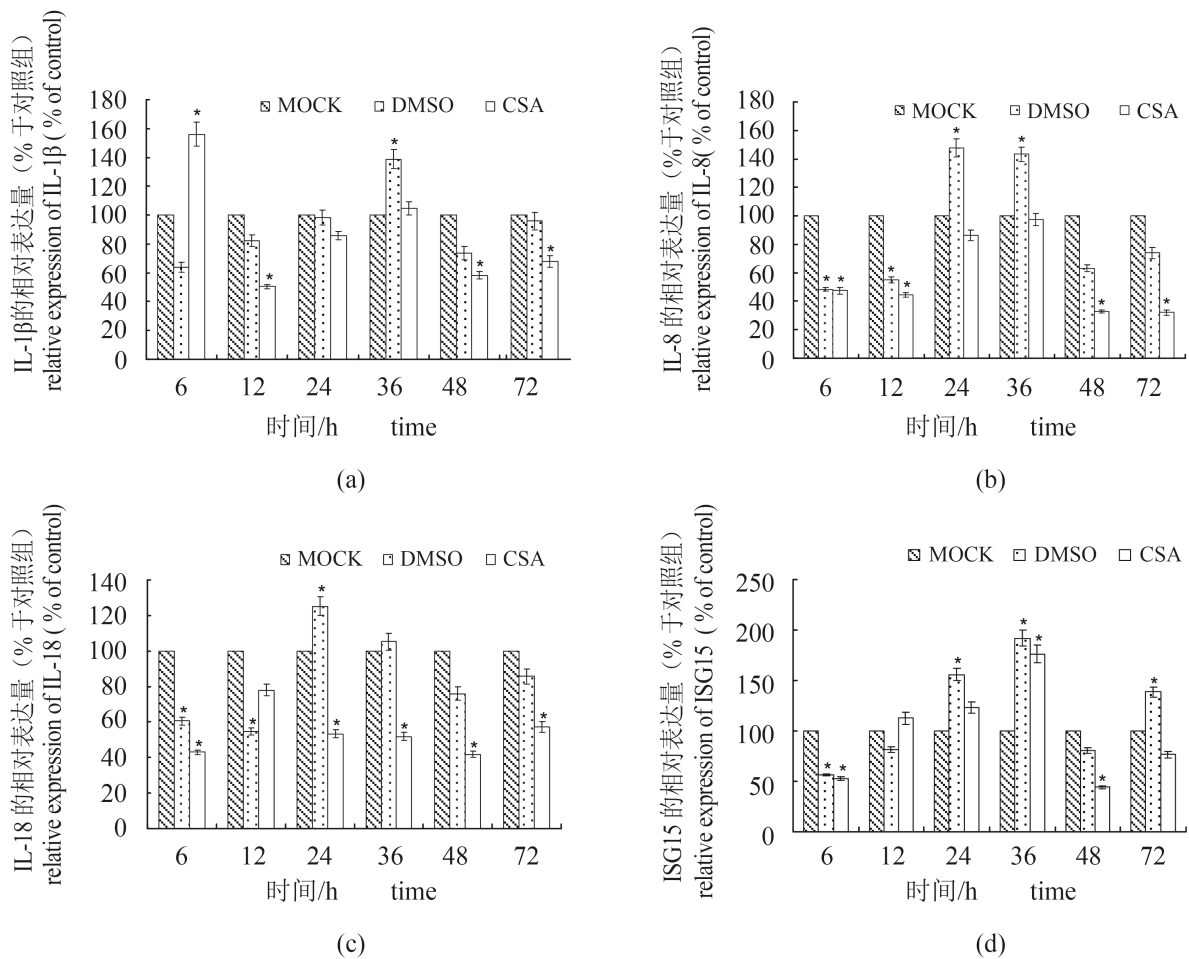


图 8 CsA对ISKNV感染后细胞因子表达的影响

Fig. 8 Effects of CsA on the expression of cytokines induced by ISKNV

能。对SC-CypA三维结构的预测发现，其具有8个 β 折叠和3个 α 螺旋，同时也具有和CsA结合的口袋结构，这与人类CypA的三维结构类似^[35]。在SC-CypA中也含有13个与CsA结合的高度保守的氨基酸残基，说明SC-CypA也具有和免疫抑制剂CsA相结合的功能。实验中与12种动物的CypA构建了进化树，进一步分析其蛋白的分子进化，结果发现，进化树的典型分类和系统发育转换是从无脊椎动物到脊椎动物，从水生动物到陆生动物，所有CypA的蛋白共享单一的进化支，提示它们可能从同一个具有相似生物学功能的古老基因进化而来。

已有研究表明，CypA在一些病毒的感染过程中发挥重要作用^[23, 27, 29]。为进一步研究CypA对ISKNV增殖的影响，实验用能与CypA结合的免疫抑制剂CsA作用于CPB细胞。研究结果发现，当CsA浓度不大于8 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞无毒性；在安全浓度范围，随CsA浓度提高，其对ISKNV增

殖的抑制作用增强；用8 $\mu\text{mol/L}$ CsA作用于CPB细胞，在不同的时间点，对ISKNV的增殖都有抑制作用，其中72 h的抑制作用最强。

关于CsA对病毒增殖的抑制作用已有很多的研究报道。Kim等^[36]对猪流行性腹泻病毒(PEDV)研究发现，CsA能抑制PEDV诱导的细胞凋亡，进而抑制PEDV的增殖。CsA对多种冠状病毒的增殖都有抑制作用^[37]。CsA通过调节干扰素途径的关键因子的表达，促进I型干扰素的先天性免疫功能，从而抑制轮状病毒的复制^[38]。本研究结果表明，CsA对ISKNV的增殖也有显著的抑制作用，有关于其作用机理需要进行进一步研究。

CypA作为细胞因子在体内发挥调节作用，能诱导机体的炎症反应^[16-18]。鱼类虹彩病毒的感染能在体外激活巨噬细胞的活性，产生类似IL-1和IL-6的细胞因子^[39]。通过实时定量PCR检测发现，CsA对ISKNV感染后诱导的IL-1 β 、IL-8、

IL-18和ISG15的表达有抑制作用。提示CsA对ISKNV感染诱导的细胞因子的表达具有调节作用,可能在相关信号通路中发挥重要作用,有关其具体机制需要进一步研究。

由于CsA对ISKNV的增殖具有显著的抑制作用,由此推测CsA及其衍生物将来可以作为防治ISKNV的候选药物。

参考文献:

- [1] Zhou W D, Zhang Y L, Wen Y, *et al.* Analysis of the transcriptomic profilings of Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) infected with *Flavobacterium columnare* with an emphasis on immune responses [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 111–119.
- [2] 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊暴发性传染病病原研究[J]. *水产学报*, 1997, 21(增1): 56–60.
Wu S Q, Li X H, Pan H J, *et al.* Research on the pathogen of the outbreak infective disease of *Siniperca chuatsi* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1997, 21(Suppl.1): 56–60 (in Chinese).
- [3] 何建国, 翁少萍, 黄志坚, 等. 鳊暴发性流行病病毒性病原研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1998, 37(5): 74–77.
He J G, Weng S P, Huang Z J, *et al.* Identification of outbreak and infectious diseases pathogen of *Siniperca chuatsi* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1998, 37(5): 74–77 (in Chinese).
- [4] 吴淑勤, 李新辉, 石存斌, 等. 鳊鱼病毒传播途径的初步研究[J]. *水产学报*, 2001, 25(5): 460–463.
Wu S Q, Li X H, Shi C B, *et al.* Preliminary study on the transmission route of *Siniperca chuatsi* virus [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(5): 460–463 (in Chinese).
- [5] 吴淑勤, 王亚军, 潘厚军, 等. 鳊鱼病害防治新技术(一)[J]. *科学养鱼*, 2007(8): 12–13.
Wu S Q, Wang Y J, Pan H J, *et al.* New technique for disease prevention and treatment of Mandarin fish (continued) [J]. *Scientific Fish Farming*, 2007(8): 12–13 (in Chinese).
- [6] Dong X X, Qin Z D, Hu X Q, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of cyclophilin A in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 422–430.
- [7] Bhaduri A, Misra R, Maji A, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* cyclophilin A uses novel signal sequence for secretion and mimics eukaryotic cyclophilins for interaction with host protein repertoire [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88090.
- [8] Chen L L, Mu C K, Zhao J M, *et al.* Molecular cloning and characterization of two isoforms of cyclophilin A gene from *Venerupis philippinarum* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 1218–1223.
- [9] Qiu L H, Jiang S G, Huang J H, *et al.* Molecular cloning and mRNA expression of cyclophilin A gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(1): 115–121.
- [10] Lee Y K, Hong C B, Suh Y, *et al.* A cDNA clone for cyclophilin from *Griffithsia japonica* and phylogenetic analysis of cyclophilins [J]. *Molecules and Cells*, 2002, 13(1): 12–20.
- [11] Martinez G J, Hegardt F G. Characterization of a cDNA encoding a cytosolic peptidylprolyl *cis-trans*-isomerase from *Blattella germanica* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 234(1): 284–292.
- [12] Fruman D A, Burakoff S J, Bierer B E. Immunophilins in protein folding and immunosuppression [J]. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1994, 8(6): 391–400.
- [13] Ryffel B, Woerly G, Greiner B, *et al.* Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues [J]. *Immunology*, 1991, 72(3): 399–404.
- [14] Wang P, Heitman J. The cyclophilins [J]. *Genome Biology*, 2005, 6(7): 226.
- [15] Handschumacher R E, Harding M W, Rice J, *et al.* Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A [J]. *Science*, 1984, 226(4674): 544–547.
- [16] Willenbrink W, Halasehek J, Schuffenhauer S, *et al.* CyclophilinA, the major intracellular receptor for the immunosuppressant cyclosporin A, maps to chromosome 7p11.2-p13: Four pseudogenes map to chromosomes 3, 10, 14, and 18 [J]. *Genomics*, 1995, 28(1): 101–104.
- [17] Satoh K, Nigro P, Motaba T, *et al.* Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms [J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(6): 649–656.
- [18] Camilloni C, Sahakyan A B, Holliday M J, *et al.* Cyclophilin A catalyzes proline isomerization by an electrostatic handle mechanism [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America, 2014, 111(28): 10203–10208.
- [19] Schreiber S L, Crabtree G R. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506 [J]. *ImmunologyToday*, 1992, 13(4): 136–142.
- [20] Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 47(2–3): 119–125.
- [21] Colgan J, Asmal M, Yu B, *et al.* Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine [J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 174(10): 6030–6038.
- [22] Tian X C, Zhao C, Zhu H G, *et al.* Hepatitis B virus (HBV) surface antigen interacts with and promotes cyclophilin a secretion: Possible link to pathogenesis of HBV infection [J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(7): 3373–3381.
- [23] Patient R, Hourieux C, Sizaret P Y, *et al.* Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking [J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(8): 3842–3851.
- [24] Zhao C, Fang C Y, Tian X C, *et al.* Proteomic analysis of hepatitis B surface antigen positive transgenic mouse liver and decrease of cyclophilin A [J]. *Journal of Medical Virology*, 2007, 79(10): 1478–1484.
- [25] Saphire A C S, Bobardt M D, Galloway P A. Cyclophilin A plays distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 entry and postentry events, as revealed by spinoculation [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(9): 4671–4677.
- [26] Misumi S. Multiple isoforms of cyclophilin A associated with human immunodeficiency virus type 1 [J]. *Uirusu*, 2005, 55(2): 273–279.
- [27] Takeuchi H. Contribution of Cyclophilin A to determination of simian immunodeficiency virus tropism: A progress update [J]. *Vaccine*, 2010, 28(Suppl.2): 51–54.
- [28] Liu X L, Zhao Z D, Liu W J. Insights into the roles of cyclophilin A during influenza virus infection [J]. *Viruses*, 2013, 5(1): 182–191.
- [29] Liu Z, Yang F, Robotham J M, *et al.* Critical role of cyclophilin A and its prolyl-peptidyl isomerase activity in the structure and function of the hepatitis C virus replication complex [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(13): 6554–6565.
- [30] Bobardt M, Hopkins S, Baugh J, *et al.* HCV NS5A and IRF9 compete for CypA binding [J]. *Journal of Hepatology*, 2013, 58(1): 16–23.
- [31] Pfefferle S, SchÖpf J, KÖgl M, *et al.* The SARS-coronavirus-host interactome: Identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors [J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(10): e1002331.
- [32] Bose S, Mathur M, Bates P, *et al.* Requirement for cyclophilin A for the replication of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype [J]. *Journal of General Virology*, 2003, 84(7): 1687–1699.
- [33] Hu X Q, Fu X Z, Li N Q, *et al.* Transcriptomic analysis of Mandarin fish brain cells infected with infectious spleen and kidney necrosis virus with an emphasis on retinoic acid-inducible gene 1-like receptors and apoptosis pathways [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 619–629.
- [34] 付小哲, 李宁求, 林强, 等. 基于荧光定量PCR的鳊传染性脾肾坏死病毒滴度检测方法[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1573–1578.
- Fu X Z, Li N Q, Lin Q, *et al.* qPCR method for virus titer testing of infectious spleen and kidney necrosis virus [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1573–1578 (in Chinese).
- [35] Ke H M, Zydowsky L D, Liu J, *et al.* Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(21): 9483–9487.
- [36] Kim Y, Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor [J]. *Virology*, 2014, 460–461: 180–193.
- [37] Tanaka Y, Sato Y, Sasaki T. Suppression of coronavirus replication by cyclophilin inhibitors [J]. *Viruses*, 2013, 5(5): 1250–1260.
- [38] Shen Z G, He H Y, Wu Y Z, *et al.* Cyclosporin A inhibits rotavirus replication and restores interferon-beta signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71815.
- [39] Siwicki A, Pozet F, Morand M, *et al.* Pathogenesis of iridovirus: *In vitro* influence on macrophage activity and cytokine-like protein production in fish [J]. *Acta Veterinaria Brno*, 2001, 70(4): 451–456.

Effect of mandarin fish cyclophilin A on the multiplication of infectious spleen and kidney necrosis virus

HU Xianqin^{1,2}, FU Xiaozhe³, DONG Xingxing¹, TU Jiagang¹,
ZHAO Lijuan¹, LIN Qiang^{1,3}, LI Ningqiu^{3*}, LIN Li^{1*}

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University,

Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China;

2. School of Animal Sciences and Nutritional Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province, Guangzhou 510380, China)

Abstract: It has been shown that host protein cyclophilin A (CypA) played a key role in the replication of several viruses. In order to address the function of Mandarin fish CypA (SC-CypA) in infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) replication, the full ORF of SC-CypA was first cloned and characterized. The ORF of SC-CypA encoded a polypeptide of 164 amino acids with calculated molecular weight of 17.59 ku. The deduced amino acid sequences of the SC-CypA shared highly conserved structures with CypAs from other species, indicating that SC-CypA should be a new member of the CypA family. Cyclosporin A (CsA) is a specific inhibitor of CypA. ISKNV replication was inhibited by the addition of CsA in a manner of dose dependence. CsA could effectively inhibit the replication of ISKNV at different time points after ISKNV infection, and the strongest inhibitory effect was observed at 72 h poi. The addition of CsA could inhibit the mRNA expressions of IL-1 β , IL-8, IL-18 and ISG15 in CPB cells after the infection of ISKNV. These suggest that SC-CypA plays a key role in the ISKNV replication, and CsA could effectively inhibit the replication of ISKNV.

Key words: *Siniperca chuatsi*; cyclophilin A; infectious spleen and kidney necrosis virus; cyclosporin A; molecular clone; virus replication

Corresponding author: LI Ningqiu. E-mail: liningq@126.com; LIN Li. E-mail: linli@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: Special Funds for the Science and Industry Development from the Administration of Ocean and Fisheries of Guangdong Province (A201501B12, A201512C03); Special Fund for Fish Diseases Prevention and Therapy from Guangdong Province (2015-115); Special Fund for Science and Technology from Hubei Province (2015BBA228)