



斜带石斑鱼甘露糖受体基因的克隆表达及其功能

张梦兰^{1,2}, 秦真东², 卢志杰², 赵丽娟², 潘淦^{1*}, 林鑫^{2*}

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东广州 510631;

2. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,

广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东广州 510225)

摘要: 为了研究斜带石斑鱼甘露糖受体 (*Epinephelus coioides* mannose receptor, *EcMR*) 在抗赤点石斑鱼神经坏死病毒 (red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV) 感染中的免疫功能, 实验成功克隆与表达了 *EcMR*。结果显示, *EcMR* cDNA 全长 4 793 bp, 共编码 1 446 个氨基酸。*EcMR* 的蛋白结构域包括 1 个信号肽 (signal peptide)、1 个富含蓖麻类 β 型三叶草结构域 (RICIN)、1 个 II 型纤维连接蛋白结构域 (FN II)、8 个串联的 C-型凝集素样结构域 (CLECTs) 以及 1 个跨膜结构域 (transmembrane region)。实时定量 PCR (qRT-PCR) 和细胞免疫荧光 (IF) 分析结果显示, *EcMR* 在斜带石斑鱼的 8 个组织中均有表达, 其 mRNA 的相对表达量顺序为鳃>头肾>脑>脾脏>肝脏>外周血>心脏>肌肉。在研究 *EcMR* 是否参与 RGNNV 入侵过程中时发现, RGNNV 可以在 GF-1 细胞系中快速增殖, 同时显著激活 *EcMR* 的表达。为进一步探究 RGNNV 对 GF-1 细胞系的影响, 本实验通过双染色法检测了 RGNNV 感染 GF-1 细胞系后的细胞凋亡情况, 研究表明, RGNNV 感染可以促进 GF-1 细胞系的凋亡, 并且细胞凋亡率随着 RGNNV 感染时间延长而增加。同时, qRT-PCR 和酶活性检测结果显示, RGNNV 的感染可以显著促进凋亡相关基因的转录水平以及 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 的酶活性水平。综上所述, 本研究成功克隆了 *EcMR*, 并揭示了其在 RGNNV 入侵过程中一定的相关性。本研究结果将为石斑鱼病毒性疾病的防控提供参考。

关键词: 斜带石斑鱼; 甘露糖受体; 赤点石斑鱼神经坏死病毒; 凋亡

中图分类号: Q 785; S 942.5

文献标志码: A

斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 属于鲈形目 (Perciformes) 鲷科 (Serranidae), 是珍贵的海水鱼类, 近年来成为台湾、广东、福建、海南等四省的重要经济养殖鱼类^[1-2]。赤点石斑鱼神经坏死病毒 (Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV) 隶属于野田病毒科 (Nodaviridae) β -野田村病毒属 (*Betanodavirus*), 为正义单链 RNA 病毒, 其包含 2 节段 RNA, RNA1 编码病毒 RNA 聚合

酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP), RNA2 编码病毒的衣壳蛋白 (capsid protein, CP), 是一种促凋亡因子^[3-6], 可以导致细胞发生凋亡^[7]。细胞凋亡 (apoptosis) 是一种程序性细胞死亡, 是细胞为维持内环境稳态, 受一些基因调控而进行的细胞自主死亡^[8-9]。RGNNV 是石斑鱼养殖产业的主要病原之一, 感染 RGNNV 可导致其神经系统和视网膜神经细胞的空泡化坏死, 最终导致石

收稿日期: 2020-08-25 修回日期: 2020-12-03

资助项目: 广东省海洋与渔业厅项目 (GDME-2018C006)

第一作者: 张梦兰 (照片), 从事水产病害免疫研究, E-mail: 2018022517@m.scnu.edu.cn

通信作者: 潘淦, E-mail: pg2829@sina.com; 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn



斑鱼幼鱼的大量死亡,对石斑鱼养殖产业造成了巨大的经济损失^[10-12]。

甘露糖受体 (mannose receptor, MR) 是 C-型凝集素超家族中甘露糖受体家族的一种,主要分布于巨噬细胞、上皮细胞和未成熟的树突状细胞上。甘露糖受体由胞质区、跨膜区和胞外区组成,胞外区由富含半胱氨酸的 CR 区、II 型纤维连接蛋白 FN II 区和 8 个串联的 C-型凝集素样结构域 CTLDs 组成^[13-14]。MR 是一种细胞膜表面上的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs), 可识别多种病原微生物表面的多糖成分和过敏原。因此, MR 是细菌 [如嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[15]、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)^[16]、寄生虫 [如杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*)^[17]、病毒 [如人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)^[18] 及过敏原 (如蟑螂过敏原^[19]) 的吞噬受体。随着 MR 的免疫功能不断被深入研究,近年来,多种鱼类的 MR 已经被陆续报道。目前成功克隆 MR 的鱼类主要有斑马鱼 (*Danio rerio*)^[20]、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[21]、何氏细须鲃 (*Leptobarbus hoevenii*)^[22]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[23]、淇河鲫 (*Carassius auratus*)^[24]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[25] 和大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[26] 等。目前研究表明, MR 广泛地参与宿主的抗病毒免疫,然而尚未有研究石斑鱼 MR 在抗 RGNNV 感染中的作用。

实验首次在斜带石斑鱼中成功克隆与表达了 MR (命名为 *EcMR*), 制备了 *EcMR* 兔源性多克隆抗体,并对多克隆抗体进行了抗体效价分析。利用实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析了 *EcMR* 在斜带石斑鱼各个组织中的表达分布,在 mRNA 和蛋白水平上检测了 *EcMR* 在 RGNNV 感染 GF-1 细胞系后的变化情况。同时,探究了 RGNNV 感染斜带石斑鱼鳍条细胞系 (grouper fin cell line, GF-1) 后的细胞凋亡情况,检测了凋亡相关基因和酶活性的变化情况。本研究结果有利于进一步了解斜带石斑鱼甘露糖受体在抗病毒免疫中的功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验斜带石斑鱼 (500 ± 50) g 购自广东省黄

沙水产市场,暂养于盐度为 20 的水循环持续曝气水缸中 2 周以上,养殖期间定时投喂饲料。GF-1 细胞系购自中国台湾生物资源研究及保存中心。RGNNV 分离自广东省大亚湾自然发病的赤点石斑鱼 (*E. akaara*) 稚鱼脑组织,由本实验室 -80 °C 冰箱保存。

1.2 斜带石斑鱼组织 RNA 的提取以及 *EcMR* 的基因克隆

选取 3 条斜带石斑鱼,用鱼安定麻醉,在冰上分别取其头肾、脾脏、肝脏、鳃、心脏、脑、肌肉和外周血共 8 个组织。按照 RNAiso Plus 试剂 (TaKaRa 公司,大连) 说明书对 8 个组织的总 RNA 进行提取,并用 Nano-2000 微量分光光度计 (杭州奥盛仪器有限公司) 检测 RNA 的质量和浓度。RNA 按照反转录试剂盒 (Vazyme 公司,南京) 说明书合成 cDNA, -20 °C 保存备用。

将 *EcMR* 的开放阅读框 (ORF) 序列分 5 段进行克隆,PCR 扩增引物见表 1。PCR 扩增反应体系: 1 μL cDNA 模板,上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 2× Taq Mix 酶 10 μL, ddH₂O 7 μL。扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,再利用胶回收试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司) 对目的基因片段进行纯化回收。然后将目的基因片段连接到 pMD™18-T Vector (TaKaRa 公司,大连),重组质粒转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 中,加入 1 mL 不含氨苄的 LB 培养基,于 37 °C 恒温摇床进行菌液复苏与活化,涂布于含氨苄抗性的固体培养基。次日,挑选阳性单菌落进行 PCR 鉴定与测序 (天一辉远生物科技有限公司),测序结果利用 Clone Manager 软件进行序列拼接与比对。

1.3 生物信息学分析

利用 ProtParam 蛋白质理化性质在线分析 *EcMR* 的 ORF 氨基酸序列并进行理化特性预测 (<http://web.expasy.org/protparam/>)。利用 NCBI 的 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 功能进行不同物种间 MR 的同源性分析;利用 DNAMAN 6.0 软件进行氨基酸序列分析及多序列比对。利用 MEGA 7.0 软件中的 Neighbor-Joining (NJ) 法进行进化树的构建;利用 SMART (<http://samrt.embl>

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

引物名称 primer	序列(5'-3') sequence
MR1-F	TGCATGGATAAAGTCTTCAGTTGTGG
MR1-R	AAGCTTTGGTGCTCCACATTGCGCAT
MR2-F	TACATCTGTTACAGTGAAGCCAC
MR2-R	ATTGTTTGGTTCTTCATCCTCCC
MR3-F	GGTTCGAGGCCAGAGATTACTGC
MR3-R	CGGACAATTTCTCTTTCCGGCTG
MR4-F	ACATGGCACTCCATTCTCTGGACT
MR4-R	ACGATTGCAATAATGACCAGCAC
MR5-F	AATGGGAGAAACACTTTTGGATC
MR5-R	GGATGATGAAATGCAGCAATGGT
β -actin F	GACATCAAGGAGAAGCTGTG
β -actin R	TGCTGTGTAGGTGGTCTCGT
MR-1-F	CGC GGATCC TCA CCA TTT CAA CTA ACC AAC AAG
MR-1-R	CCC AAGCTT GCA GTA GCC CCA GCG TTC ACT TTG
RGNNV-CP-F	TTGCTGGCTTCTGCCTGATC
RGNNV-CP-R	ACTGAGGTCGGACTGTTCTGC
qRT-EcMR-F	GCCTCTACGATTGTGACGAAAAG
qRT-EcMR -R	CTGTTTTGGAGAGAACTGCTGTG
FADD-F	CCTCGTCAACATTAACGACAGGAC
FADD-R	CAGCAGCTCCCTACCATTTCATCC
Fas-F	GGTCGGGTTC AAGTCGTT
Fas-R	GCCTTCACTGCGTCTCT
Bcl-2-F	CACACCTAACACGGCACAAAGG
Bcl-2-R	ACAACGGAAGAAGCTCAAGCCT
Bax-F	AACCACAAGAAGCTGGCACA
Bax-R	GAGAAGATGAAACGGACGGC
IL-1 β -F	AACCTCATCATCGCCACACA
IL-1 β -R	AGTTGCCTCACAACCGAACAC
IL-6-F	CTCTACTCAACCGGTACATGC
IL-6-R	TCATCTCAAACACTGCTTTTCGTG
IL-8-F	GCCGTCAGTGAAGGGAGTCTAG
IL-8-R	ATCGCAGTGGGAGTTTGCA
TNF α -F	GTGTCCTGCTGTTTGCTTGTA
TNF α -R	CAGTGTCCGACTTGATTAGTGCTT
p53-F	CGCAACAGGCTTCAATCGT
p53-R	GAAGCATCAGAGGCGAAGA

heidelberg.de) 在线预测 *EcMR* 的蛋白质结构域; 最后, 利用 WISS-MOEDL 进行 *EcMR* 的三级结构预测。

1.4 *EcMR* 重组质粒的构建、重组蛋白的表达和检测

根据 *EcMR* 结构域预测的结果, 将 *EcMR* 分为 3 段, 选取 RICIN-FN II 结构域进行基因克隆、重组蛋白表达与多克隆抗体制备, 并命名为 MR-1, 引物见表 1, PCR 反应条件与目的基因片段纯化回收方法同“斜带石斑鱼组织 RNA 的提取以及 *EcMR* 的基因克隆”。将目的基因 MR-1 与 pET-32a 质粒 (TaKaRa 公司, 大连) 进行 *Bam*H I 与 *Hind* III 双酶切和连接, 构建含有 His-tag 标签的融合蛋白的重组表达质粒 pET-32a-MR-1。将 pET-32a 空载和 pET-32a-MR-1 重组质粒分别转化到原核表达载体 *E. coli* BL21(DE3) 进行原核重组蛋白的表达, 使用 0.6 mmol/L IPTG 在 37 °C 下 180 r/min 振荡培养 5~6 h, 分别吸出 2 mL 菌液, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 2 min, 用 100 μ L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬沉淀, 加入 25 μ L 5 \times loading buffer 沸水煮 10 min, 12 000 r/min 离心 1 min。取等量上清液上样于浓度为 10% SDS-PAGE 胶, 80 V 电泳 2.5 h 后检测融合蛋白的表达。根据福因德生物《蛋白表达与抗体制备》技术手册对 MR-1 包涵体纯化与回收, 用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 测定其浓度后分装成 1 mL 冻存于 -80 °C 备用, 最后送去公司 (福因德科技武汉有限公司) 制备兔源性多克隆抗体。*EcMR* 多克隆抗体采用酶联免疫吸附检测法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测效价。

1.5 *EcMR* 的组织表达分布

利用 qRT-PCR 方法检测 *EcMR* 在上述 8 个不同组织中的分布情况, 其反应体系和反应程序参照 UltraSTBR Mixture (北京康为世纪生物科技有限公司) 试剂说明书, 反应在 qTOWER3 touch3 (JENA, 德国) 荧光定量 PCR 仪中进行, 目的基因 *EcMR* 和内参基因 β -actin 分别独立做 3 次重复, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行数据分析。数据显示方式为平均值 \pm 标准差, 使用 GraphPad Prism 7 软件进行作图和单因素方差分析, $P < 0.05$ (*) 表示差异显著, $P < 0.01$ (**) 表示差异极显著。

1.6 GF-1 细胞系的培养

用含 10% 胎牛血清 (FBS, Invitrogen, 美国) 和 1% 青霉素-链霉素溶液 (浙江吉诺生物医药技术有限公司) 的 L15 培养基 (Gibco, 美国) 在 5% CO₂、28 °C 细胞培养箱中培养 GF-1 细胞系。待 GF-1 细胞密度达到 95% 时, 将细胞接种在 12 孔板中, 培养温度为 28 °C, 待细胞密度达到约 90% 时, 去掉培养基, 用 PBS 润洗细胞 3 次, 每次 5 min, 再换不含 FBS 的 L-15 培养基进行培养。实验组用 1.0 MOI (multiplicity of infection) RGNNV 进行感染, 阴性对照组加入等量的 PBS, 阳性对照加入等量的 Poly (I:C) (Sigma, 美国), 随后置于 5% CO₂、28 °C 培养箱中培养, 分别收集感染后 0、6、12、24 和 48 h 的样品。

1.7 RGNNV 感染 GF-1 细胞系后相关基因的表达量分析

利用 qRT-PCR 检测 RGNNV 感染 GF-1 细胞系后 *EcMR*、*RGNNV-CP*、凋亡基因 (*FADD*、*Fas*、*Bcl-2*、*Bax*、*p53*) 和炎症因子基因 (*IL-6*、*IL-8*、*TNF α* 、*IL-1 β*) 的表达模式, 引物见表 1, 反应程序和分析方法同“*EcMR* 的组织表达分布”。

1.8 间接免疫荧光检测 RGNNV 感染 GF-1 细胞后 *EcMR* 及 *RGNNV-CP* 的表达量变化

将细胞爬片用清洁剂清洗干净, 用灭菌蒸馏水冲洗爬片 3 次, 泡在 75% 的乙醇中静置 10 min, 将细胞爬片上的乙醇烧干并放入单孔细胞培养皿中, 待爬片冷却后将细胞悬液 ($1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ 个细胞) 滴加在爬片上培养 24 h, 待细胞长满爬片后去掉培养基, 实验组和对照组应激方法同“GF-1 细胞系培养”; 然后分别收集感染后 0、6、12、24 和 48 h 的样品。加入 PBS 清洗 3 次细胞, 每次 5 min, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 去掉固定液, 以 PBS 洗 3 次细胞, 每次 5 min, 再加入 2 mL PBS 覆盖细胞, 4 °C 保存。

细胞爬片稍甩干后用免疫组化笔在爬片中间细胞分布均匀的位置画圈, 加 50~100 μ L 的 0.1% Triton X-100, 室温孵育 10 min 后用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用 5% 的山羊血清封闭 1 h 后轻轻甩掉封闭液, 在单孔板中滴加用抗体稀释液按照 1:100 稀释的一抗, 平放于湿盒内 4 °C 孵育过夜。爬片用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。去除 PBST 后在圈内滴加以抗体稀释液按 1:500 稀释的山羊抗兔二抗覆盖细胞, 避光室温孵育

50 min 后用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 去除 PBST 后在圈内滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10 min。再用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。爬片稍甩干后将有细胞的一面朝下用抗荧光淬灭封片剂将爬片封固在载玻片上封片, 切片于正置荧光显微镜 (尼康, 日本) 下观察并采集图像。

1.9 GF-1 细胞凋亡的检测

将 GF-1 细胞系接种在单孔板中, 实验组和对照组应激方法同“GF-1 细胞系的培养”; 分别收集感染后 0、6、12、24 和 48 h 的样品检测细胞凋亡。细胞凋亡利用 Alexa Fluor[®] 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa[®] Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry (Invitrogen, 美国) 试剂盒进行检测, 于正置荧光显微镜 (尼康, 日本) 下观察并采集图像。

1.10 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 活性的检测

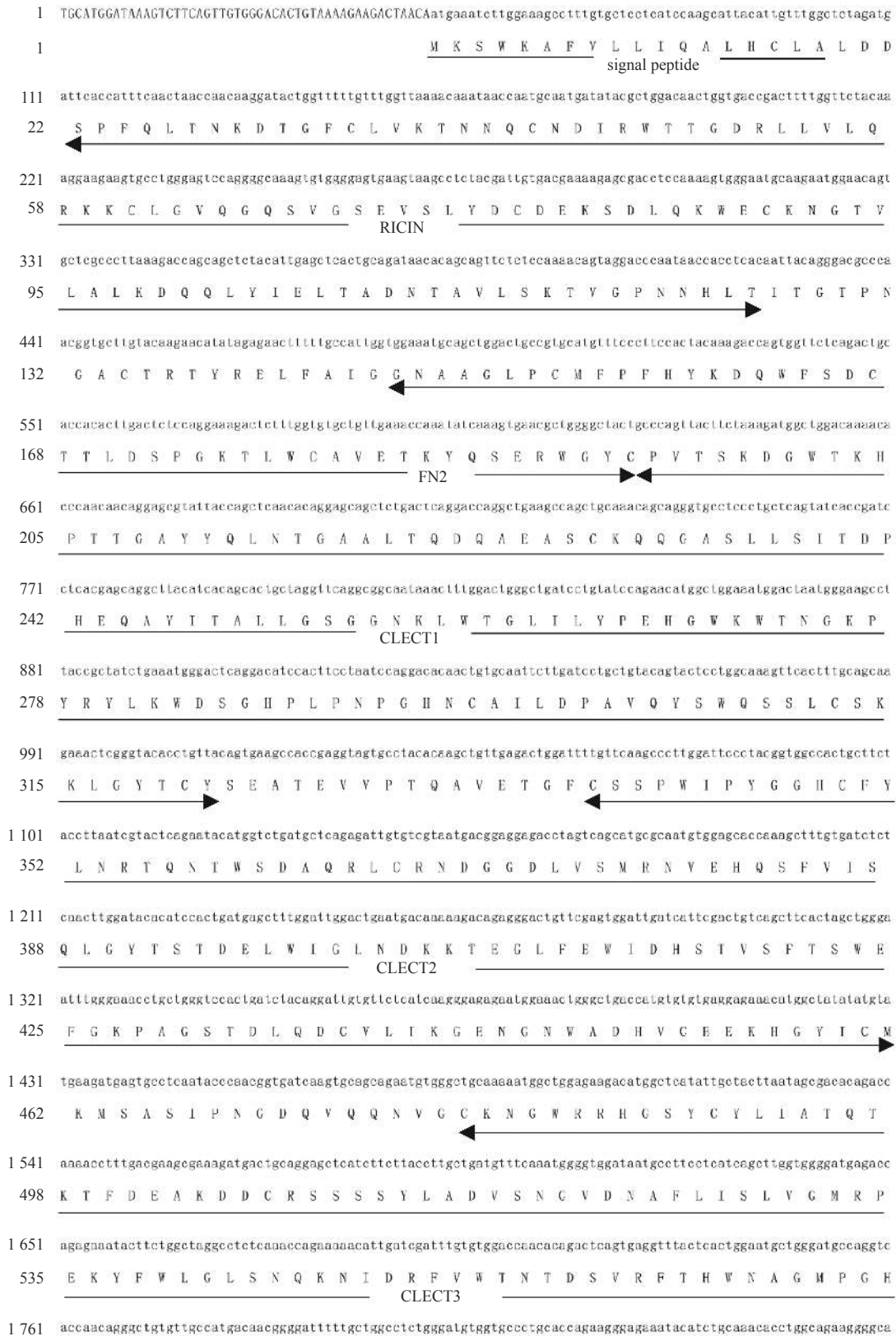
根据 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 活性检测试剂盒说明书 (南京建成生物工程研究所) 对 RGNNV 感染的 GF-1 细胞用酶标仪检测 OD_{450 nm} 吸光值以检测 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 的酶活性。

2 结果

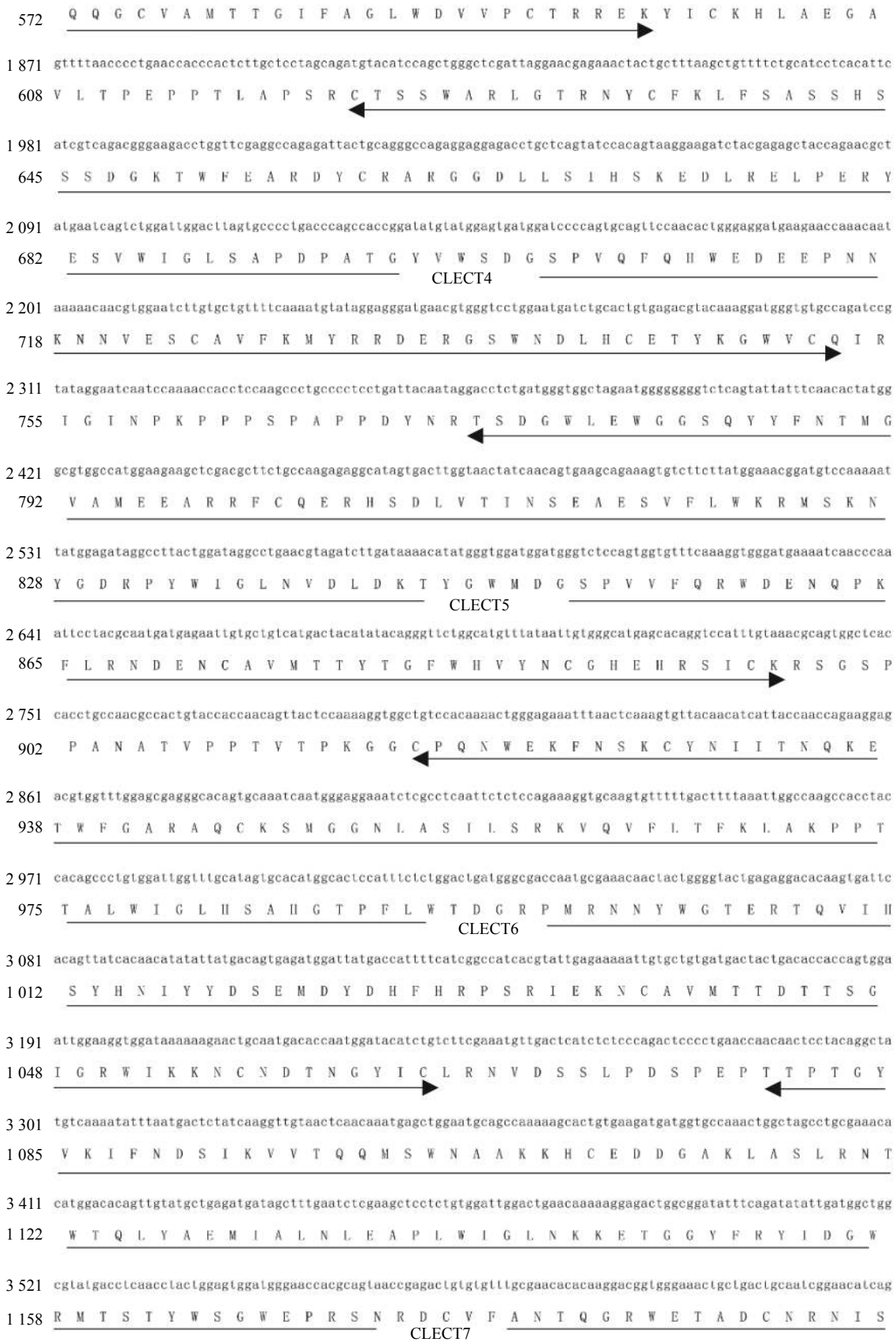
2.1 *EcMR* 的克隆和生物信息学分析

EcMR cDNA 全长 4 793 bp, 其中 ORF 为 4 341 bp, 编码 1 446 个 aa, 5' 非编码区 (UTR) 49 bp, 3' 非编码区 (UTR) 403 bp (图 1-a)。ProtParam 在线软件预测 ORF 编码的氨基酸分子量为 163.687 ku, 等电点为 6.92; SMRAT 在线软件预测 *EcMR* 的结构域由 1 个信号肽 (signal peptide)、1 个富含蓖麻类 β 型三叶草结构域 (RICIN)、1 个 II 型纤维连接蛋白结构域 (FN II)、8 个串联的 C-型凝集素样结构域 (CLECTs) 以及 1 个跨膜结构域 (transmembrane region) 组成 (图 1-b)。EcMR 三维结构与人类 MR 的相似性为 41.97% (图 1-c)。EcMR 与其他生物的 MR 具有较高的同源性, 与不同鲈形目序列之间较为保守, 其中和黄金鲈 (*Perca flavescens*) 的同源性最高, 为 74.17%, 和加利福尼亚湾石首鱼 (*Totoaba macdonaldi*) 的同源性为 69.81%, 和大刺鲈 (*Mastacembelus armatus*) 的同源性为 68.67%, 和大黄鱼的同源性为 67.91%

(图 2)。利用 MEGA 7.0 软件, 采用 NJ 法构建 *EcMR* 与黄金鲈的 MR 聚为一支(图 3) *EcMR* 和其他物种的 MR 的系统进化树, 发现



(图 1 Fig. 1)



(图 1 Fig. 1)

```

3 631  cagcatttgeatgaagttetacngatgtgoccecaacagacecaagtgattteccaggatitttgeectgaagneceagaccacecagotacttaogeggaactaaeagct
1 195  S T C M K S T D V P P T D P S D F P G F C P E D P E Q P R Y L R R T N S W
3 741  ggcaccattlaaggctaattgttaectcaittttacagcaggalligagtgccasgaagcaaceacaaactgctgaagecaltggggaactcttgaagcattgaagat
1 232  L P F K A V C Y L I F T D R I E W Q E A T T V C A R H G G T L A S I E D
3 851  ecttelgagcaagcattcttaagcagatacagatgttlegagacacccaatcatcattctggatcgcttatataaaactcagcagagcacttggcagtggttggga
1 268  P S E Q A F I L S S I Q M F R D S Q S S F W I G L Y K T H R G T W Q W L D
3 961  taaaacccccctggactatactaactggggtgaaagtccaatgggagaacaacttttggatcca taagagctgcagatgggatgggacaactggccaaaagtggatg
1 305  K T P L D Y T N W G E S P N G R N T F G S I R A A D G M W T T G Q K W Y D
4 071  acagaggatattttgcaagcaccacaagaactattaaaggggcacagacaacggtaactcctatgacggaacctcaaccctggccacatcttggtagttttg
1 342  R G Y I C K A P K E L L K G A Q T T V T P M T E P Q T R G H I I I L V V L
4 181  ccggctcattattgcaatcgctcatagggacagtcacgccttattctcttcaagaactctggtcgcgcttacctatccctgaaaggttctcaacctttgacaaccact
1 378  P V I I A I V I G T V I A L F L F K K S G R R L P I P E R F S T F D N P L
4 291  cttttcaacaatgagcgggtccagcctggctggtegecaccacaagaaactggtagcaaatgcagaagaggagaaccctgcaccctgttctaacgtgttaaTGTAATAACC
1 415  F F N K E R F Q P G L V D T K K L V A N A E E E N P A P V L T V *
                                CLECT8
4 401  AGCAGAACTACTCGGGCATAACAATGTACAAVTGTAATTTGATGGCACCTGACAAGAATTCATTTTCTTTTGAANTGACAGATCTTTCAGTGTACCTGGCTAACTGGC
4 511  TTTAATGAACAAAATAATTTAAGATGTAGGATGCTTATTGTATATATAAATCTCCATTTGTAATCATTGGAATAATGTTTAATGTATATTTTATGACAGCAGAATT
4 621  ACTEACTGATTAAGTAATTCATTTATACATATTTTACTTTAAAGTACTATGCTTGCTAGCATTGCAAAATGCTACTAGACTTTGAACTTGGCCAAAATGAATAACATT
4 731  CCTGTTGGACTATAAAGAAGACAGTTAAGACAGACAGTATACCATTGCTGCATTTCATCATCC 4793

```

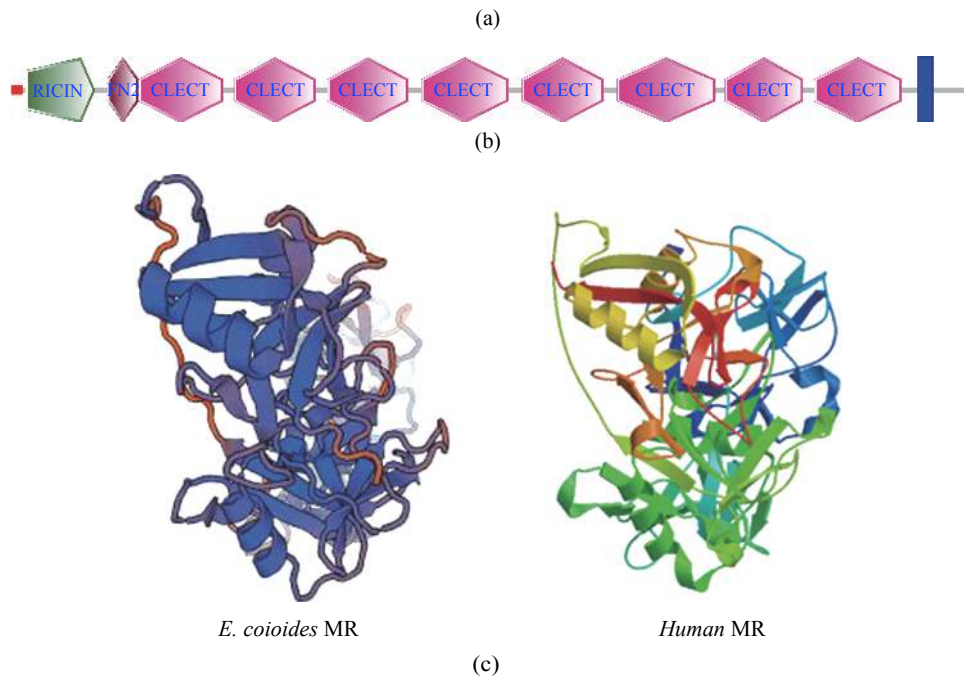


图 1 *EcMR* 的 cDNA 核苷酸序列、结构域分析及三级结构预测

(a) *EcMR* 的信号肽用直线标出, 跨膜结构域用长方形方框标出; (b) *EcMR* 的结构域预测; (c) *EcMR* 与人的 MR 的三级结构域比较

Fig. 1 cDNA nucleotide sequence, domain analysis and tertiary structure prediction of *EcMR*

(a) signal peptide of *EcMR* is marked with a straight line, and the transmembrane domain is marked with a rectangular squares; (b) domain prediction of *EcMR*; (c) comparison of tertiary domains between *EcMR* and human MR

2.2 EcMR 多克隆抗体效价检测

根据酶联免疫吸附法检测 EcMR 多克隆抗体的效价结果显示, EcMR 多克隆抗体的效价达到 128 000 倍(图 4)。

2.3 EcMR 在不同组织中的表达

qRT-PCR 检测结果显示(图 5), EcMR 在斜带石斑鱼的头肾、肝脏、脾脏、心脏、肌肉、鳃、脑以及外周血中均有表达, 在鳃和头肾中



图 2 EcMR 与其他物种 MR 氨基酸多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of MR amino acids between EcMR and other species

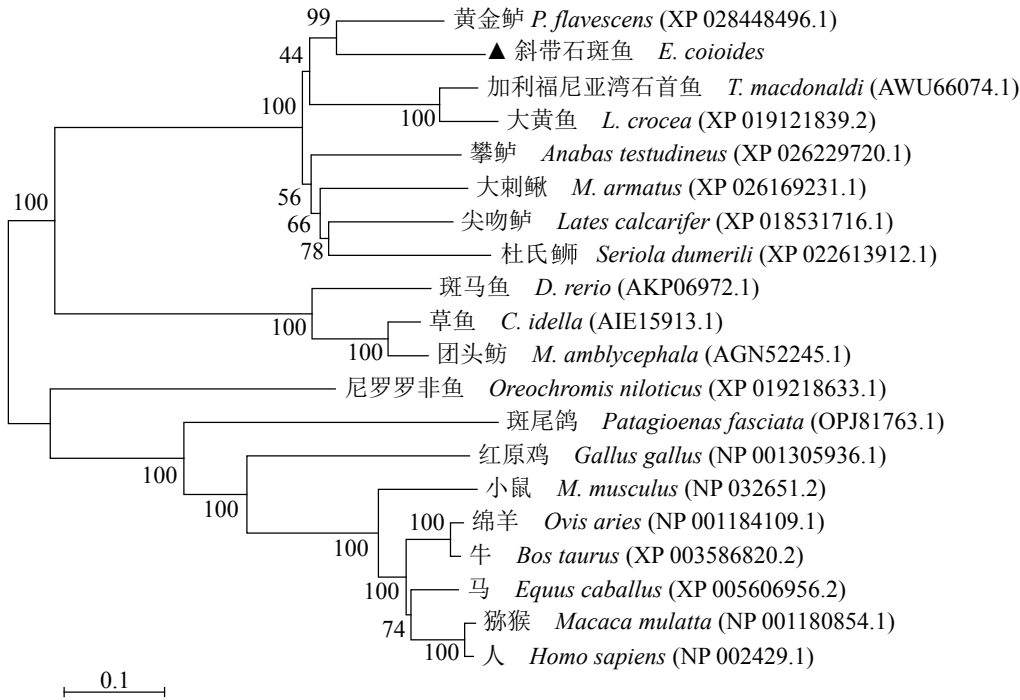


图 3 EcMR 与其他物种 MR 的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis between MR in other species and EcMR

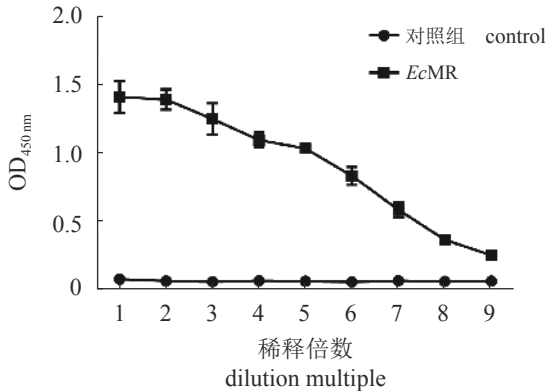


图 4 EcMR 多克隆抗体效价检测

Fig. 4 Titer detection of EcMR polyclonal antibody

1. 500×, 2. 1 000×, 3. 2 000×, 4. 4 000×, 5. 8 000×, 6. 16 000×, 7. 32 000×, 8. 64 000×, 9. 128 000×

的表达量最高, 其次是脑、脾脏和肝脏, 在肌肉中的表达量最低。

2.4 RGNNV 和 Poly (I:C) 感染 GF-1 细胞系后 EcMR 和 RGNNV-CP 表达模式的分析

在 RGNNV 应激 GF-1 细胞系后, EcMR 的 mRNA 表达水平在 6、24 和 48 h 显著上升 (P<0.01) (图 6-a); Poly (I:C) 应激 GF-1 细胞系后, 在 6 h (P<0.01) 显著上升 (图 6-a)。RGNNV-CP 的 mRNA 表达量从 0 h 到 48 h 显著上升 (P<0.05) (图 6-b)。

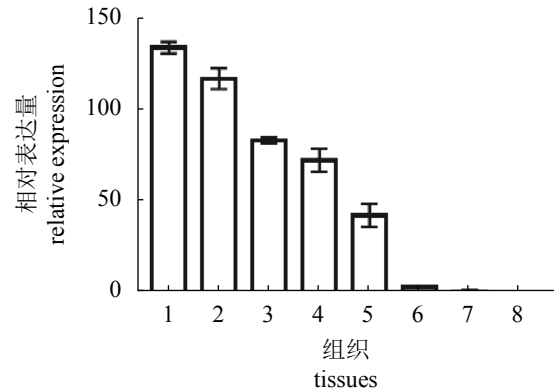


图 5 EcMR 在不同组织中的相对表达量

1. 鳃, 2. 头肾, 3. 脑, 4. 脾脏, 5. 肝脏, 6. 血脏, 7. 心脏, 8. 肌肉

Fig. 5 Relative expression of EcMR in different tissues

1. gill, 2. head kidney, 3. brain, 4. spleen, 5. liver, 6. blood, 7. heart, 8. muscle

2.5 RGNNV 感染 GF-1 细胞系后 EcMR 和 RGNNV-CP 在蛋白水平上的变化

根据细胞免疫荧光结果显示, EcMR 的表达水平在 6 h 明显升高, 在 12 h 下降, 24 h 再次升高, 与其 mRNA 表达水平一致。(图版 I -a)。在 RGNNV 感染 GF-1 细胞系 6~24 h 后, RGNNV-CP 的蛋白表达水平随时间的增加不断升高, 与其 mRNA 表达水平基本一致。(图版 I -b)。

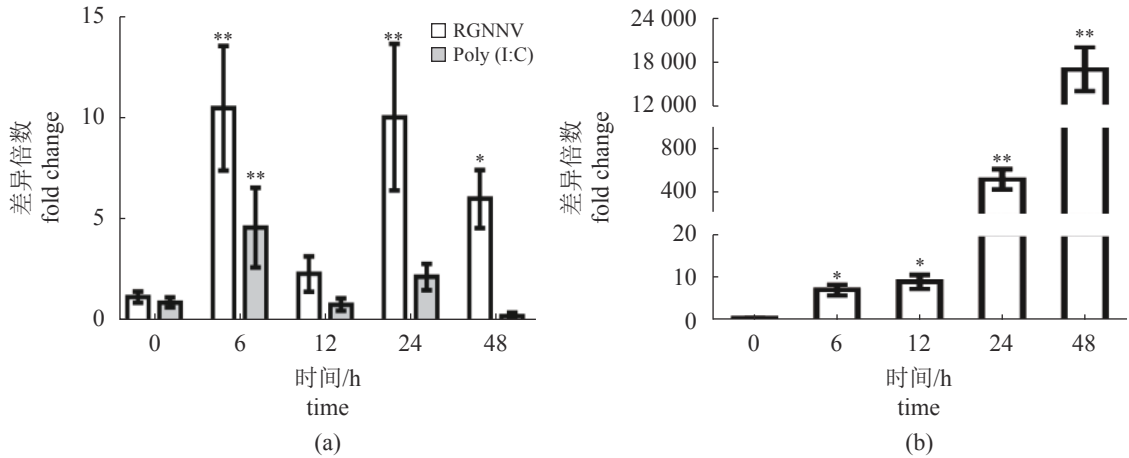


图 6 RGNNV 感染 GF-1 细胞系后 *EcMR* 和 *RGNNV-CP* 的表达量

(a) *EcMR* 表达量; (b) *RGNNV-CP* 表达量

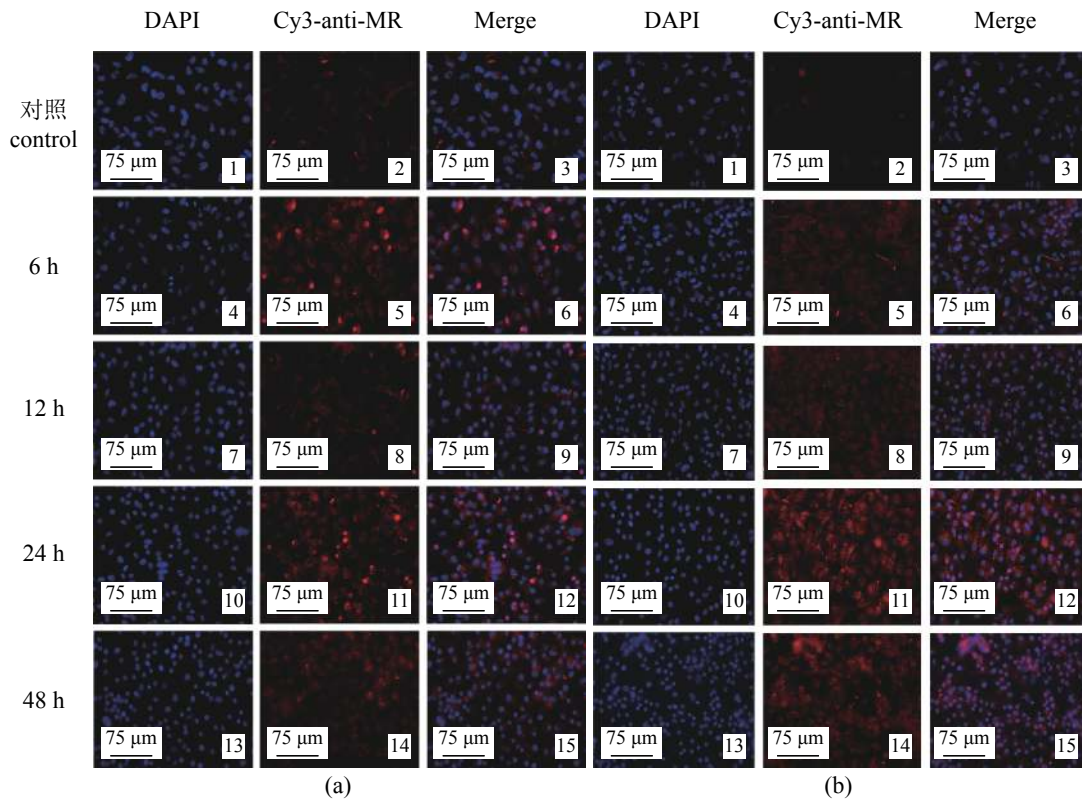
Fig. 6 Expression of *EcMR* and *RGNNV-CP* in GF-1 cells infected by RGNNV and poly (I:C)

(a) expression of *EcMR*; (b) expression of *RGNNV-CP*

2.6 RGNNV 感染 GF-1 细胞系后细胞凋亡的检测

RGNNV 感染 GF-1 细胞系后, 随着时间的增加, 明场中细胞出现空斑不断增多 (白色箭头)。

用细胞凋亡检测试剂盒对 GF-1 细胞系进行凋亡检测, Annexin V 染色显示绿色荧光信号, 表示早期凋亡细胞; PI 染色显示红色荧光信号, 表示晚期凋亡细胞。结果显示, 随着感染时间的



图版 I RGNNV 感染 GF-1 细胞后 *EcMR* 和 *RGNNV-CP* 的细胞免疫荧光

(a) *EcMR* 多克隆抗体; (b) *RGNNV-CP* 多克隆抗体

Plate I Cellular immunofluorescence of *EcMR* and *RGNNV-CP* after RGNNV infection of GF-1 cells

(a) *EcMR* poly clonal antibody; (b) *RGNNV-CP* polyclonal antibody

增加, 红色和绿色荧光信号逐渐增多, 说明 RGNNV 感染 GF-1 细胞系可以促进 GF-1 的细胞凋亡 (图版 II)。

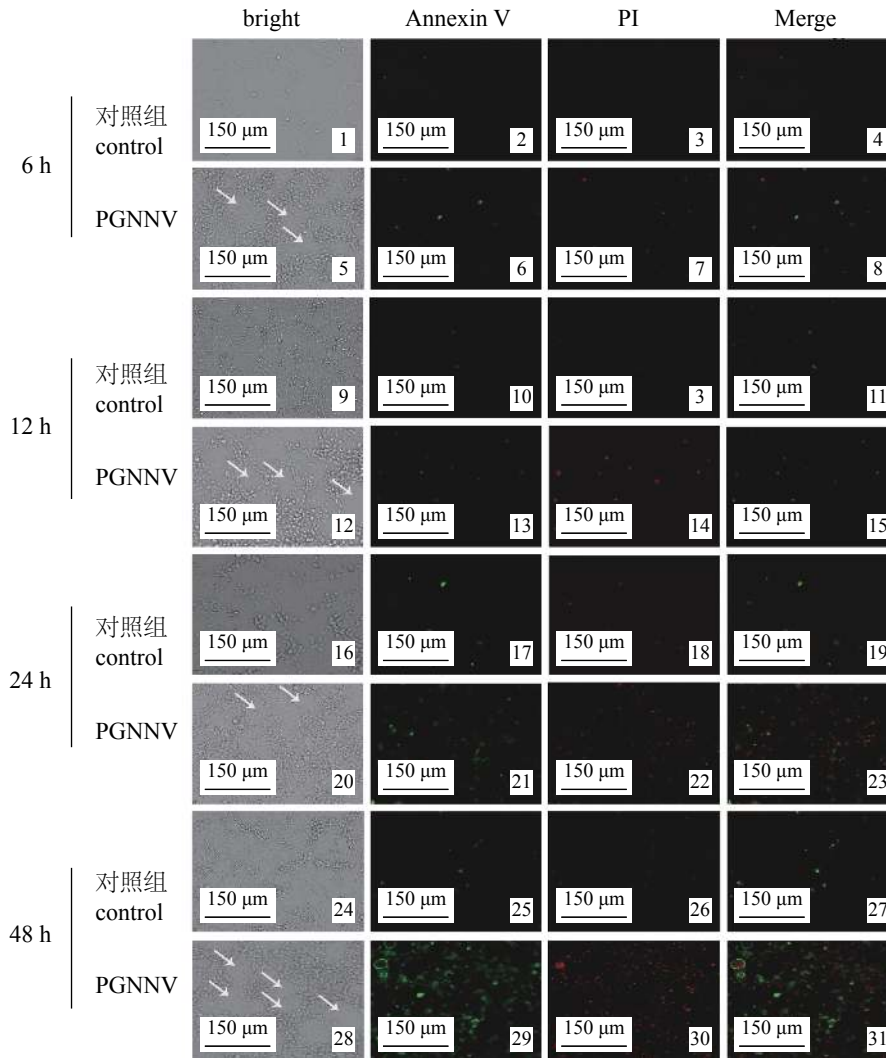
2.7 RGNNV 感染 GF-1 细胞系后炎症因子基因和凋亡相关基因 mRNA 表达水平的检测

通过 qRT-PCR 检测炎症因子基因和凋亡相关基因的 mRNA 表达水平, 结果显示, 在 RGNNV 感染 GF-1 细胞系后, 凋亡相关基因 *Fas*、*FADD*、*Bcl-2*、*Bax* 和 *p53* 在 6、24 和 48h 的 mRNA 相对表达量均上调; *FADD*、*Bcl-2* 和 *Bax* 的 mRNA 相对表量在 6 h ($P<0.01$) 达到峰值; *Fas* 的最高 mRNA 转录水平在 24 h ($P<0.01$) 检测到, *p53* 的 mRNA 相对表达水平在 48 h ($P<0.01$) 达到峰值。RGNNV 感染 GF-1 细胞系后, 炎症因子基因 *IL-6*、

IL-8、*TNF α* 和 *IL-1 β* 的 mRNA 相对表达量在 6、12、24 和 48 h 与 0 h 相比均升高; *IL-8* 和 *TNF α* 最高 mRNA 转录水平在 24 h ($P<0.01$); *IL-6* 的 mRNA 相对表达量在 6 h ($P<0.01$) 达峰值; *IL-1 β* 的 mRNA 相对表达量分别在 6 ($P<0.05$) 和 48 h ($P<0.01$) 出现峰值 (图 7)。

2.8 RGNNV 感染 GF-1 细胞后对 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 活性的检测

为了进一步研究 RGNNV 感染引起的 GF-1 细胞凋亡通路上 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 活性的变化, 本实验对 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 酶活性进行检测, 其结果表明, 随着感染时间的延长, Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 的酶活性均逐渐显著上调 ($P<0.01$)。因此,



图版 II RGNNV 感染 GF-1 后细胞凋亡的检测

Plate II Detection of apoptosis after RGNNV infection with GF-1 cells

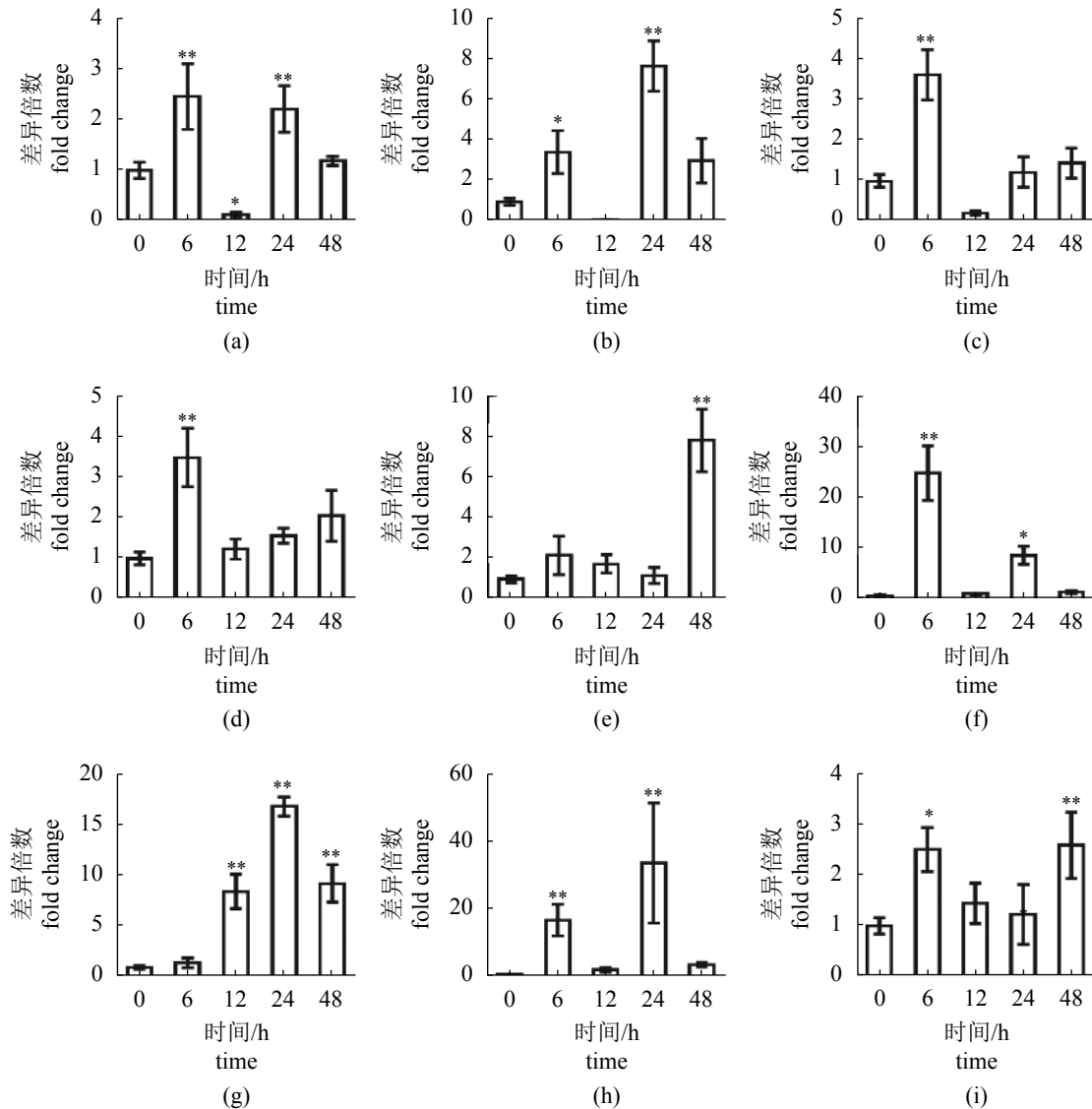


图7 RGNNV感染GF-1后对炎症因子基因和凋亡基因的检测

Fig. 7 Detection of inflammatory cytokines and apoptotic genes after RGNNV infection with GF-1 cells

(a) *FADD*, (b) *Fas*, (c) *Bcl-2*, (d) *Bax*, (e) *p53*, (f) *IL-6*, (g) *IL-8*, (h) *TNFα*, (i) *IL-1β*

RGNNV感染GF-1细胞后,能够引起细胞凋亡,从而导致GF-1细胞中Caspase-3、Caspase-8和Caspase-9活性的显著升高(图8)。

3 讨论

甘露糖受体作为一种模式识别受体,可以识别多种病原体,其在先天性免疫应答中起到关键作用^[27]。MR主要通过识别病原微生物的多糖成分,如脂多糖(LPS)、酵母甘露聚糖、细菌荚膜等来识别病原体^[28],同时也有研究发现,人甘露糖受体C-1型(human mannose receptor 1, hMRC1)可以识别HIV,并抑制出芽病毒粒子从

细胞表面脱离^[29]。研究表明,MR可以作为HIV的限制因子^[30],也可以增强HIV-1与巨噬细胞的结合^[18];其次,也有报道表明,MR是人巨噬细胞感染登革热病毒(Dengue virus, DV)的功能性受体之一^[31]。然而,有关鱼类中的MR在抗病毒免疫中免疫功能的相关研究还十分缺乏。

本实验成功克隆出*EcMR*的全长序列,编码了1446个氨基酸。结构预测结果显示,*EcMR*的结构域由1个富含蓖麻类β型三叶草的结构域(RICIN)、1个II型纤维连接蛋白结构域(FN II)、8个串联的C型凝集素样结构域(CLECTs)以及1个跨膜结构域(transmembrane region)组成,

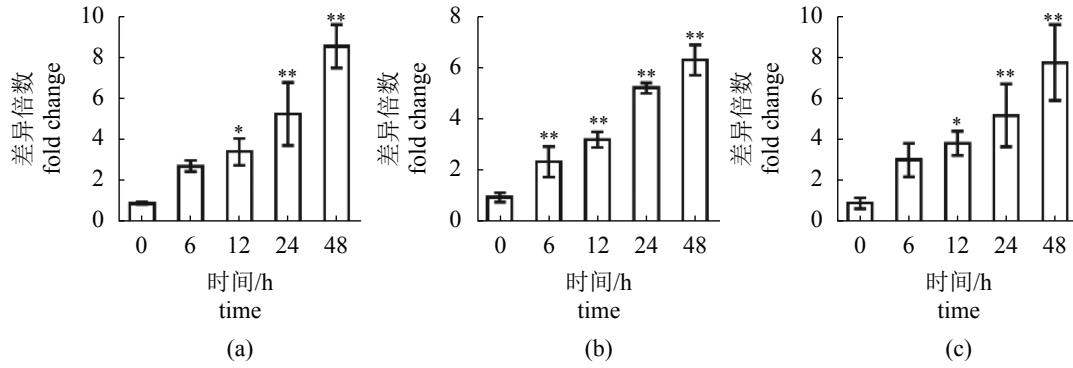


图 8 RGNNV 感染 GF-1 细胞后对 Caspase-3 (a)、Caspase-8 (b) 和 Caspase-9 (c) 活性的影响

Fig. 8 Effect of Caspase-3 (a), Caspase-8 (b) and Caspase-9 (c) activities after RGNNV infection in GF-1 cells

这与苏丹鱼^[22]的MR结构域预测一致。MR氨基酸多序列比对表明, *EcMR*和黄金鲈的同源性最高, 其次是加利福尼亚湾石首鱼和大刺鲷。

MR属于C-型凝集素超家族中的一员, 存在8个串联的C-型凝集素结构域, C-型凝集素在鱼体感染病原微生物的免疫中有极其重要的地位^[32]。近年来, 有研究显示C-型凝集素与病毒的蛋白之间有相互作用关系, 如凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的C-型凝集素能够结合白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)的VP95、VP28和VP14等, 从而抑制病毒复制^[33]。为了探究*EcMR*是否参与RGNNV感染时的免疫应答过程, 本实验分别以RGNNV和Poly(I:C)感染GF-1细胞系, 通过qRT-PCR和间接免疫荧光检测*EcMR*的表达情况, 结果显示, RGNNV感染GF-1细胞系12、24和48h后, *EcMR*的表达水平显著升高, 表明*EcMR*响应了RGNNV的感染过程免疫, 这与日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)在WSSV感染后, 虾体内的6-磷酸甘露糖受体表达量显著上调的研究结果一致^[34]。

部分研究表明, 病毒入侵可以促进细胞凋亡的发生, 为进一步研究RGNNV对GF-1细胞系的影响, 本研究检测了RGNNV感染细胞后的凋亡情况。引起细胞凋亡主要有2种途径: ①内源性途径或“线粒体途径”, 线粒体是细胞凋亡途径的“中央信号传递器”, 它可以直接依赖或者不依赖半胱天冬酶(Caspase)激活细胞凋亡; ②外源性(extrinsic)途径或“受体介导途径”^[35], 细胞凋亡的外源性途径主要是由细胞表面的死亡受体如肿瘤坏死因子TNF α 和Fas介导^[36]。其中, 受体途径的激活包括Fas死亡受体被病原微生物激活后, 死亡受体配体通过受体寡聚化启动信

号转导, 从而导致特异接头蛋白的募集, 以及Caspase级联反应的激活^[37]; FasL的结合诱导Fas三聚化, 从而通过接头蛋白FADD招募启动型Caspase-8。然后, Caspase-8寡聚化并通过自催化被激活; 激活的Caspase-8可通过2条并行级联反应诱发凋亡, 它既可以直接剪切并激活Caspase-3, 也可以剪切Bcl-2家族的促凋亡蛋白Bid, 截短型Bid(tBid)可以启动线粒体凋亡途径, 诱导细胞色素C(cytochrome C)释放, 从而激活Caspase-9和Caspase-3, 最后导致凋亡的产生^[38]。有研究表明, DNA损伤如DNA片段化时, Caspase-8的激活可能对p53介导的细胞凋亡起重要作用^[39]。除此之外, Caspase-3的激活不仅可以激活炎症因子的表达, 而且会促进降解凋亡抑制蛋白Bcl-2^[40-41]。在本研究中, RGNNV感染GF-1细胞系是通过外源性途径, 即Fas死亡受体介导细胞凋亡的。根据检测RGNNV感染GF-1细胞系凋亡的结果显示, 随着时间的延长, GF-1细胞系的凋亡信号显著增加, 表明RGNNV的入侵可以激活GF-1细胞系凋亡的发生, 与由虹彩病毒感染斜带石斑鱼的脾脏细胞而引起细胞凋亡的现象一致^[42]。其次, 本研究通过qRT-PCR检测了5个凋亡相关基因(*Fas*、*FADD*、*Bcl-2*、*Bax*和*p53*)和4个炎症因子基因(*IL-6*、*IL-8*、*TNF α* 和*IL-1 β*) mRNA水平上的表达变化情况, 结果显示, RGNNV的感染, 均能激活相关基因的表达水平。有趣的是, RGNNV在感染12h后, 除了*IL-8*外, 其余基因的表达水平均有所下降, 其中FADD是所有死亡受体诱导凋亡所需的中央适配器。研究结果表明, FADD不仅是一种死亡工具, 并且也参与了TLR信号、炎症、先天免疫、坏死和自噬等过程^[43]。2018年Zhang^[44]等报道,

在斜带石斑鱼脾脏细胞 (grouper spleen cell) 中过表达 *FADD*, 会抑制石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) 的感染和复制; 反之, *FADD* 表达下调, 有利于病毒进行感染与复制。因此猜测, *FADD* 在 12 h 时表达下调, 可能与 RGNNV 感染 GF-1 细胞系后的自我复制有关, 同时也引起 *FADD* 上游基因 *Fas* 和抗凋亡因子基因 *Bcl-2* 表达下调。为进一步研究 RGNNV 的感染对 GF-1 细胞系的影响, 本研究也测定了 RGNNV 感染后 GF-1 细胞系中凋亡相关酶的活性情况发现, RGNNV 的感染可以激活 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 的活性, 进一步表明 RGNNV 感染会促进 GF-1 细胞系的凋亡, 本研究结果与斜带石斑鱼虹彩病毒研究结果一致^[42,44]。

综上所述, 本研究克隆表达了 *EcMR*, 并且首次发现 RGNNV 感染 GF-1 细胞系时, *EcMR* 响应了 RGNNV 的感染过程。其次, 还发现 RGNNV 可以通过 *Fas* 死亡受体介导 GF-1 的细胞系凋亡。本研究结果对洞悉 *EcMR* 如何参与抗病毒免疫功能具有重要的前期参考作用, 为 RGNNV 导致的石斑鱼病毒性疾病预防策略的制定提供基础理论参考。

参考文献 (References):

- [1] 丁少雄, 刘巧红, 吴昊昊, 等. 石斑鱼生物学及人工繁育研究进展[J]. 中国水产科学, 2018, 25(4): 737-752.
Ding S X, Liu Q H, Wu H H, *et al.* A review of research advances on the biology and artificial breeding of groupers[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(4): 737-752(in Chinese).
- [2] Pierre S, Gaillard S, Prévot-D'Alvise N, *et al.* Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials[J]. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2008, 18(3): 297-308.
- [3] 陈文捷, 刘晓丹, 胡先勤, 等. 鱼类神经坏死病毒研究进展与发展趋势[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1666-1672.
Chen W J, Liu X D, Hu X Q, *et al.* Trend and research progress of nervous necrosis virus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1666-1672(in Chinese).
- [4] Chen W J, Yi L Z, Feng S S, *et al.* Transcriptomic profiles of striped snakehead fish cells (SSN-1) infected with Red-Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) with an emphasis on apoptosis pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 346-354.
- [5] Wu H C, Chiu C S, Wu J L, *et al.* Zebrafish anti-apoptotic protein ZfBcl-X_L can block betanodavirus protein α -induced mitochondria-mediated secondary necrosis cell death[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(4): 436-449.
- [6] Costa J Z, Thompson K D. Understanding the interaction between betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 53: 35-49.
- [7] Lu M W, Ngou F H, Chao Y M, *et al.* Transcriptome characterization and gene expression of *Epinephelus* spp. in endoplasmic reticulum stress-related pathway during betanodavirus infection *in vitro*[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 651.
- [8] 王翀. 病毒感染对细胞凋亡的影响[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2019(3): 7-8.
Wang C. Effect of virus infection on apoptosis[J]. *Grazing Veterinary Sciences*, 2019(3): 7-8(in Chinese).
- [9] Numata T, Araya J, Fujii S, *et al.* Insulin-dependent phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Erk signaling pathways inhibit Tlr3-mediated human bronchial epithelial cell apoptosis[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(1): 510-519.
- [10] 葛辉, 吴丽云, 周宸, 等. 斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 病毒性神经坏死病毒的纯化分析及检测方法建立[J]. 渔业研究, 2019, 41(2): 96-105.
Ge H, Wu L Y, Zhou C, *et al.* The purification and detection methods research of viral nervous necrosis in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2019, 41(2): 96-105(in Chinese).
- [11] Wei J G, Zang S Q, Li C, *et al.* Grouper PKR activation inhibits Red-Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) replication in infected cells[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 111: 103744.
- [12] 林鑫, 黄剑南, 翁少萍, 等. 赤点石斑鱼病毒性神经坏死症的组织病理和电镜观察[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 519-523.
Lin L, Huang J N, Weng S P, *et al.* Histopathological examination and electron microscopy observation of viral nervous necrosis in red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(4): 519-523(in Chinese).

- [13] Taylor P R, Gordon S, Martinez-Pomares L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition[J]. *Trends in Immunology*, 2005, 26(2): 104-110.
- [14] 刘小玲, 曾令兵. 甘露糖受体结构、功能、表达和应用研究的新进展[J]. *水产学杂志*, 2013, 26(1): 54-59.
Liu X L, Zeng L B. A review of the research advancement of structure, function, expression and application of mannose receptor[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2013, 26(1): 54-59(in Chinese).
- [15] Wu C S, Zhao X H, Babu V S, *et al.* Distribution of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) during the embryonic development and its immune response to the challenge of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 52-59.
- [16] Zamze S, Martinez-Pomares L, Jones H, *et al.* Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(44): 41613-41623.
- [17] Chakraborty P, Ghosh D, Basu M K. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and Avirulent *Leishmania donovani* promastigotes[J]. *Journal of Parasitology*, 2001, 87(5): 1023-1027.
- [18] Nguyen D G, Hildreth J E K. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages[J]. *European Journal of Immunology*, 2003, 33(2): 483-493.
- [19] Zhou Y F, Do D C, Ishmael F T, *et al.* Mannose receptor modulates macrophage polarization and allergic inflammation through miR-511-3p[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(1): 350-364.
- [20] Zheng F F, Asim M, Lan J F, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of mannose receptor in zebra fish (*Danio rerio*) during infection with *Aeromonas sobria*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(12): 10997-11012.
- [21] Liu X L, Tang X C, Wang L, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(7): 4601-4611.
- [22] 何昕, 秦真东, 张凯, 等. 苏丹鱼甘露糖受体的基因克隆表达和免疫特性[J]. *水产学报*, 2020, 44(3): 378-390.
He X, Qin Z D, Zhang K, *et al.* Cloning, expression and immune features of Sultan fish (*Leptobarbus hoevenii*) mannose receptor[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(3): 378-390(in Chinese).
- [23] Wang L, Liu L C, Zhou Y, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor C type 1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 43(1): 54-58.
- [24] 王俊丽, 闫潇, 卢荣华, 等. 淇河鲫甘露糖受体基因克隆及嗜水气单胞菌感染对其基因表达的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(1): 18-28.
Wang J L, Yan X, Lu R H, *et al.* Molecular cloning of mannose receptor in *Carassius auratus* var. *Qihe* and effects of *Aeromonas hydrophila* infection on its gene expression[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(1): 18-28(in Chinese).
- [25] Fontenla F, Noia M, Leiro J M, *et al.* The turbot macrophage mannose receptor: phylogenetic analysis, functional characterization and changes in gene expression during vaccination and infection with *Philasterides dicentrarchi*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 53: 121-122.
- [26] Dong X L, Li J J, He J Y, *et al.* Anti-infective mannose receptor immune mechanism in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 257-265.
- [27] 郑菲菲. 斑马鱼甘露糖受体的分子克隆和功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
Zheng F F. Molecular cloning and functional characterization of mannose receptor in zebra fish (*Danio rerio*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [28] 徐明. 甘露糖受体在免疫调节中的作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2002, 18(6): 673-675.
Xu M. The role of mannose receptor in immune regulation[J]. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2002, 18(6): 673-675(in Chinese).
- [29] Sukegawa S, Miyagi E, Bouamr F, *et al.* Mannose receptor 1 restricts HIV particle release from infected macrophages[J]. *Cell Reports*, 2018, 22(3): 786-795.
- [30] Lubow J, Virgilio M C, Merlino M, *et al.* Mannose

- receptor is an HIV restriction factor counteracted by VPR in macrophages[J]. *eLife*, 2020, 9: e51035.
- [31] Miller J L, deWet B J M, Martinez-Pomares L, *et al.* The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages[J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(2): e17.
- [32] 王莉, 张杰, 赵贤亮, 等. 鱼类C-型凝集素结构特征及其免疫功能[J]. 水产科学, 2019, 38(2): 282-288.
Wang L, Zhang J, Zhao X L, *et al.* Structure characteristics and immune function of C-type lectin in fish: a review[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(2): 282-288(in Chinese).
- [33] Zhao Z Y, Yin Z X, Xu X P, *et al.* A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(1): 347-356.
- [34] 张可诒. 阳离子依赖的 6-磷酸甘露糖受体 (CD-MPR) 在日本囊对虾先天性免疫中的功能研究 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
Zhang K Y. Functional investigation of Cation-Dependent Mannose-6-Phosphate Receptor (CD-MPR) in the innate immunity of *Marsupenaeus japonicus*[D]. Ji'nan: Shandong University, 2018 (in Chinese).
- [35] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death[J]. *Physiological Reviews*, 2007, 87(1): 99-163.
- [36] Fujimoto A, Shingai Y, Oyama T B, *et al.* Apoptosis-inducing action of two products from oxidation of sesamol, an antioxidative constituent of sesame oil: a possible cytotoxicity of oxidized antioxidant[J]. *Toxicology in Vitro*, 2010, 24(6): 1720-1726.
- [37] Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 742-758.
- [38] Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2011, 1813(4): 558-563.
- [39] Ding H F, Lin Y L, McGill G, *et al.* Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(49): 38905-38911.
- [40] 毛德文, 陈月桥, 王丽, 等. Caspase-8及Caspase-3与细胞凋亡[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(10): 148-150.
Mao D W, Chen Y Q, Wang L, *et al.* Relationship of Caspase-8 and Caspase-3 to apoptosis[J]. *Journal of Liaoning University of TCM*, 2008, 10(10): 148-150(in Chinese).
- [41] 潘钰虹, 张兴翠, 贾仁勇. 黄病毒对细胞凋亡的调控作用[J]. 病毒学报, 2019, 35(4): 685-692.
Pan Y H, Zhang X C, Jia R Y. Regulatory Effect of flavivirus upon apoptosis[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2019, 35(4): 685-692(in Chinese).
- [42] Guo M L, Wei J G, Huang X H, *et al.* JNK1 derived from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, involving in the evasion and infection of Singapore grouper iridovirus (SGIV)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 121.
- [43] Tourneur L, Chiocchia G. FADD: a regulator of life and death[J]. *Trends in Immunology*, 2010, 31(7): 260-269.
- [44] Zhang X, Zang S Q, Li C, *et al.* Molecular cloning and characterization of FADD from the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 517-529.

Molecular cloning and functional study of mannose receptor gene in *Epinephelus coioides*

ZHANG Menglan^{1,2}, QIN Zhendong², LU Zhijie², ZHAO Lijuan², PAN Gan^{1*}, LIN Li^{2*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Mannose receptor (MR), also known as CD206, is an endocytosis receptor involved in pathogen recognition and antigen presentation. As a link between innate immunity and adaptive immunity, MR plays an important role in immune response. Viral nerve necrosis (VNN) caused by nerve necrosis virus (NNV) is a highly contagious neuropathological disease, which has caused the death of more than 50 important farmed juvenile fishes worldwide. At the same time, NNV is also one of the main viral pathogens causing huge economic losses to the *Epinephelus coioides* culture industry. Innate immunity can recognize pathogens by combining pattern recognition receptor (PRR) with pathogen-associated molecular pattern (PAMP). C-type lectins belong to PRR. MR as a member of C-type lectins family, is of great significance to study whether MR has immune function in NNV. Most of the studies on MR in fish are focused on the antibacterial activity of MR, but the relationship between MR and antiviral in fish is unknown. In order to study the immune function of *EcMR* gene against red grouper nerve necrosis virus (Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV), *EcMR* gene was cloned and expressed. The results showed that the *EcMR* cDNA full length sequence was 4 877 bp, and its open reading frame encoded 1 446 amino acids. The protein domain of *EcMR* was composed of a signal peptide, an extracellular ricin-like β -type clover domain (RICIN), a fibronectin type II domain (FN II), eight tandem C-type lectin-like domains (CLECTs) and a transmembrane domain. The results of real-time quantitative PCR (qRT-PCR) showed that *EcMR* gene widely existed in 8 examined tissues and the relative expression of mRNA was in the following order of gill > head kidney > brain > spleen > liver > peripheral blood > heart > muscle. The results showed that RGNNV could proliferate rapidly in GF-1 cells and significantly activate the expression of *EcMR* gene at 6 h and 24 h after infection. In order to further explore the effect of RGNNV on GF-1 cells, the apoptosis of GF-1 cells infected by RGNNV was detected by the Alexa Fluor[®] 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit. The results showed that RGNNV infection could promote the apoptosis of GF-1 cells, and the apoptosis rate increased with the prolongation of infection time. At the same time, the results of qRT-PCR and enzyme activity assay showed that RGNNV infection could significantly promote the transcription level of apoptosis-related genes, and the expression of inflammatory cytokines and the enzyme activity levels of Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9. To sum up, this study successfully cloned the *EcMR* gene and revealed its correlation in the process of RGNNV invasion. The results of this study will provide some basic theoretical reference for the prevention and control of grouper viral diseases.

Key words: *Epinephelus coioides*; mannose receptor; red-spotted grouper nervous necrosis virus; apoptosis

Corresponding authors: PAN Gan. E-mail: pg2829@sina.com;

LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

Funding project: Project of Guangdong Provincial Department of Oceans and Fisheries (GDME-2018C006)