



病毒感染过程中青鳉 *irf2* 基因过表达的双面性

姜正正¹, 罗君志¹, 申萍¹, 王志¹, 庞连慧¹,
潘启华^{1,2}, 刘红¹, 陈天圣^{1,2*}

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 集美大学水产学院, 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 为了探究干扰素调节因子 2 (interferon regulatory factor, IRF2) 如何通过调控干扰素 (IFN) 表达影响鱼类的免疫, 实验从青鳉中克隆了 *irf2* (*Oirf2*), 发现该基因在青鳉各个组织中均有表达; 将构建的真核表达载体 pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr 转染到胖头鲢肌肉细胞系 (FHM) 后, 发现瞬时过表达 *Oirf2* 能够显著促进鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV) 的复制, 并抑制抗病毒相关基因 *mx1*、*ifn* 和 *irf3* 的表达。进一步通过双荧光素报告系统发现, *Oirf2* 能够显著抑制 NF-κB 和 ISRE 的活性, 说明 *Oirf2* 可能通过抑制细胞的天然免疫应答进而促进病毒的增殖。然而持续过表达 *Oirf2* 则增强了细胞的抗病毒能力, 同时促进干扰素相关基因 *mx1*、*ifn* 和 *irf3* 的表达。因此, *Oirf2* 基于表达的持续时间不同而具有抗病毒或者促病毒的双面效果。实验通过研究 *Oirf2* 在抗病毒信号通路中发挥的作用, 为通过基因编辑或者转基因手段来构建抗病毒的鱼类提供了理论基础。

关键词: 干扰素调节因子 2; 青鳉; 鱼类细胞系; 鲤春病毒血症病毒 (SVCV); 双面性
中图分类号: Q 786; S 942 **文献标志码:** A

作为低等脊椎动物的鱼类其特异性免疫系统相对比较低级, 因此, 先天免疫系统在鱼类整个免疫系统中占据重要地位, 在防御细菌和病毒感染过程中起着重要作用。干扰素 (interferon, IFN) 因子的转录与激活对于硬骨鱼类的抗病毒先天免疫反应至关重要^[1-2]。干扰素通过调控多种干扰素刺激基因 (IFN-stimulated genes, ISGs) 的表达来发挥其多效性, 其本身受干扰素调节因子 (interferon regulatory factors, IRFs) 控制^[3], IRFs 也能调节 ISGs 的表达^[4]。IRFs 是 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)、维甲酸诱导基因-I (retinoic acid-

inducible gene I, RIG-I)、B 细胞受体 (B cell receptor, BCR) 等多个模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRR) 的下游转录因子^[5], 当这些 PRR 被病毒激活时, 可通过 IRFs 传递信号和级联激活干扰素信号通路。

IRFs 是非常重要的转录因子, 随着最早的 IRF1 于 1988 年被鉴定出来^[6], 至今在哺乳动物中共发现 9 种 IRF 蛋白: IRF1、IRF2、IRF3、IRF4、IRF5、IRF6、IRF7、IRF8 和 IRF9。此外, IRF10 仅在鸟类和硬骨鱼类中发现, 在哺乳动物中并不存在^[7], 而 IRF11 仅在鱼类基因组中存在, 是

收稿日期: 2021-04-29 修回日期: 2021-05-21

资助项目: 国家自然科学基金 (31771648, 31672653); 集美大学科研基金 (ZQ2020003); 国家重点基础研究发展计划 (2013CB967700)

第一作者: 姜正正 (照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: djokovicane@163.com

通信作者: 陈天圣, E-mail: tiansheng.chen@jmu.edu.cn



鱼类特有的 IRFs 家族成员^[8]。根据系统进化分析, IRFs 可分为 4 个亚家族: IRF1 亚家族 (IRF1、IRF2、IRF11)、IRF3 亚家族 (IRF3、IRF7)、IRF4 亚家族 (IRF4、IRF8、IRF9、IRF10) 和 IRF5 亚家族 (IRF5、IRF6)。

IRF2 是一种多功能的转录调控因子, 在细胞凋亡、调控细胞周期、调节病毒感染以及调节细胞生长和转化的过程中扮演着十分重要的角色^[9]。和其他 IRF 相似, IRF2 也具有保守的螺旋-转角-螺旋结构的 DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD), 在机体感染尤其是病毒感染时能够与目标基因启动子上的特异性元件——干扰素刺激应答元件 (interferon-stimulated response element, ISRE) 结合^[10-12]。其他 IRFs 家族成员 C 端具有一个 IRF 关联域 (IRF association domain, IAD), 而 IRF1 和 IRF2 的 C 端则是 IAD2, 可介导同型二聚体或异源二聚体分子内相互作用^[13]。IRF2 与 IRF1 通过识别相同的 DNA 基序从而产生拮抗作用^[14], 因此 IRF2 被认为是干扰素系统基因的负调控因子, 同时 IRF2 还作为正调控因子激活白细胞介素-7 基因、II 类转录活化子基因和 *gig2* 的转录^[14-16]。目前, *irf2* 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[17]、鳊 (*Siniperca chuatsi*)^[18]、乌鳢 (*Channa argus*)^[19]、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[20] 和匙吻鲟 (*Polyodon spathula*)^[21] 等多种鱼类中被鉴定。研究显示, *irf2* 在受到 IFN、poly I:C 等诱导后大量表达^[20-22]。综合已有研究, IRF2 在抗病毒过程可作为正向或负向调控的多功能因子而存在。

本实验鉴定了青鳉 (*Oryzias latipes*) 的 *irf2* (*Olrif2*), 并在细胞中通过过表达的方法研究其在病毒感染过程中的潜在功能, 为后期的抗病毒青鳉品系的构建奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼和细胞

实验青鳉养殖于 14 h 光照、10 h 避光, 恒温 28 °C 的循环水养殖系统中, 所有的操作均严格按照华中农业大学科学伦理委员会批准的规程进行^[23]。胖头鲂肌肉细胞系 (Fathead minnow muscle cell line, FHM) 使用含有 10% 胎牛血清 (HyClone, 美国)、100 μg/mL 青霉素和链霉素的 M199 (Gibco, 美国) 培养基, 在 28 °C, 3.5% CO₂

饱和湿度恒温培养箱培养。

1.2 *Olrif2* 的克隆及真核表达载体的构建

参考 RNAiso Plus 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 说明书提取青鳉组织总 RNA, 取 1 μg 总 RNA 为模板, 使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本) 合成 cDNA 第一条链。根据 *Olrif2* 序列 (Gene ID: 101175576) 设计特异性引物 (表 1), 扩增 *Olrif2* cDNA。使用 Q5 高保真 DNA 聚合酶 (NEB, 美国) 从青鳉成鱼的心脏组织 cDNA 中扩增 *Olrif2* 的编码区序列, PCR 程序: 94 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。随后将扩增的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 确定为目的基因后回收目的片段并连接到 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 日本), 随后转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 感受态细胞中, 送阳性克隆至北京擎科生物科技有限公司测序。使用 Q5 高保真 DNA 聚合酶, 以 pMD18T-IRF2 为模板, 通过 PCR 扩增得到 *Olrif2* 目的片段, 同时使用 *Nhe* I 和 *Kpn* I (NEB, 美国) 酶切 pTol2/CMV/IE1-pr 载体, 得到线性化载体, 该载体含有可以药物筛选和红色荧光的融合基因 (*PR: pac-DsRed*)。使用 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit (Vazyme, 中国) 试剂盒将目的片段与线性化载体进行连接, 转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 挑取阳性克隆用于后续的实验。

1.3 IRF2 蛋白序列多重比对和系统进化分析

根据 NCBI 数据库中已知的蛋白序列, 利用 MEGA-X 软件对多个物种的 IRF1 亚家族的氨基酸序列进行多重比对和系统进化分析。采用邻接法的系统发育树比较不同类群 IRF1 亚家族的氨基酸序列。

1.4 *Olrif2* 在不同组织中的表达

取健康的野生型青鳉雌雄各 3 尾, 用鱼安定 (MS-222) 麻醉后分别取新鲜的脑、眼、鳃、肠、头肾、脾脏、肝脏、肠、精巢和卵巢等 10 个组织迅速加入 TRIzol 试剂, 提取青鳉各组织总 RNA, 反转录后用定量逆转录 PCR (qRT-PCR) 检测 *Olrif2* 的表达水平。

将健康的野生型青鳉 64 尾共分为 8 组, 所有鱼适应新环境后, 4 组腹腔注射 $2 \times 10^{7.875 \pm 5}$ 神经

表 1 本研究所用引物列表
Tab. 1 Primers used in this study

| 引物名称 primer name | 碱基序列(5'-3') base sequence (5'-3') | 用途 usage |
|-------------------------------------|--|----------------------|
| meIRF2 qRT-PCR F | GACGACATGACAGAGCCGTAG | qRT-PCR的扩增引物 |
| meIRF2 qRT-PCR R | AGCATCTTTCTCCAGGTCCC | |
| me β -actin qRT-PCR F | TATCATTCGCCTGAAACCGAT | qRT-PCR的内参引物 |
| me β -actin qRT-PCR R | CTTTGCACATGCCAGATCCG | |
| FHM β -actin qRT-PCR F | GGTATCGTGATGGACTCTGGTG | qRT-PCR的内参引物 |
| FHM β -actin qRT-PCR R | ATGAGGTAGTCAGTCAGGTCAC | |
| NNV qRT-PCR F | AAATGGTGGGAAAGCAGAACA | qRT-PCR的扩增引物 |
| NNV qRT-PCR R | CGAACACTCCAGCGACACA | |
| SVCV-g qRT-PCR F | TGCTGTGTTGCTTGCACTTATYT | qRT-PCR的扩增引物 |
| SVCV-g qRT-PCR R | TCAAACKAARGACCGCATTTTCG | |
| IRF2 F 18T | CCAGTTGAAAGAATGCGGATGC | 扩增 <i>IRF2</i> CDS区域 |
| IRF2 R 18T | TCAGGAGGAGGAGGTGATGTCAGA | |
| IRF2 infusion primer F <i>Nhe</i> I | GGGGTACCTCAGGAGGAGGAGGTGATGTCAGA | 构建真核表达载体 |
| IRF2 infusion primer R <i>Kpn</i> I | GCTATGCATCAGCTGCTAGCTCAGTGCTAGCTA GCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAG | |
| psiCHECK-2_4x ISRE F | GGCTCGACAGGTACCGAAACTGAACTGAAAC TGAAACTGAACTGAAACT | 构建双荧光素酶表达载体及验证 |
| 4×SRE_miniP R | ATATACCCTCTAAGTTTCAGTTTCAGTTTCAGTT TCAGTTTCAGTTTCAGTT | |
| 4× ISRE_miniP F | ACTGAAACTGAAACTGAAACTGAAACTGAAACT GAAACTTAGAGGGTATAT | |
| miniP_psiCHECK-2 R | GCCATGGTGGCTAGCCTGGAAGTCGAGCTTCCA TTATATACCCTCTAAGT | |
| psiCHECK-2_NF- κ B F | GGCTCGACAGGTACCGGAATTTCCGGGAATTT CCGGGAATTTCCGGGAATTTCTCTAGA | |
| miniP_psiCHECK-2 F | GCCATGGTGGCTAGCCTGGAAGTCGAGCTTCCA TTATATACCCTCTAGGAAATTTCCCG | |
| MX1 qRT-PCR F | TGGCATGGGAGAATCAGTTACAAG | 抗病毒相关基因 |
| MX1 qRT-PCR R | TGCCCCAGCCATCTCATCC | qRT-PCR的扩增引物 |
| IFN qRT-PCR F | CAACAACATCATGACCCGCTACCT | |
| IFN qRT-PCR R | GTTCTCTGCCTCCGTTCTGTCTT | |
| IRF3 qRT-PCR F | AGCATGCTTTGAGACAGGAC | |
| IRF3 qRT-PCR R | CACGAAGAGCGCTACGGAAGTT | |

坏死病毒 (nervous necrosis virus, NNV) 15 μ L (NNV 为实验室制备和保存的石斑鱼神经坏死病毒, 青鳉对此病毒敏感), 另外 4 组注射等量的制取 NNV 的培养基。取注射后不同阶段 (12、24、48 和 72 h) 的鳃和头肾组织, 采用 qRT-PCR 检测 *Olfirf2*

的相对表达水平, β -actin 为内参基因。

1.5 细胞转染

将生长状态良好的 FHM 接种于 12 孔板中, 每孔接种 5×10^5 个细胞, 待细胞生长密度达 80%~

90%时开始转染。转染具体步骤按照 Lipo-fectamine™2000 (Invitrogen, 美国) 说明书进行, 设置3组平行。实验组每孔加入 1 μg pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr 与 3 μL lipofectamine 2000 试剂, 对照组加入 pTol2/CMV/IE1-pr 载体进行转染, 转染 3 h 后培养液换成含 10% 胎牛血清的 M199 培养基。收集转染后 24 和 48 h 的 FHM, 提取 RNA 反转录后采用 qRT-PCR 检测相关抗病毒基因的表达量。为了获得 *Olrif2* 或 *pr* 稳定过表达的 FHM, 按照上述方法转染 FHM, 转染 24 h 后, 用含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素 (Gibco, 美国) 的 M199 培养基筛选细胞 14 d, 每 2 天更换一次培养基, 直到荧光显微镜 (尼康, 日本) 下红色荧光蛋白 (RFP) 比例为 100%, 即为稳定过表达的 FHM, 后面再检测相关抗病毒基因的表达。

1.6 病毒感染

为了探究 *Olrif2* 对病毒的作用, 实验选择对鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV) 敏感的 FHM 检测过表达 *Olrif2* 对上述病毒复制的影响, SVCV 为本实验室保存。转染 pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr 与 pTol2/CMV/IE1-pr 质粒 24 h 后, 每组分别接种 1 MOI 和 0.1 MOI 的 SVCV 孵育 1 h, 然后用含 5% 胎牛血清的 M199 培养基替换上清病毒混合物, 感染 24 h 后, 收集上清于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 用 RNAiso Plus 试剂提取细胞的 RNA, 反转录后通过 qRT-PCR 检测 *svcv-g* 的表达。收获病毒液将其稀释 $10^{-1}\sim 10^{-8}$ 倍后, 向铺满单层 FHM 的 96 孔板中每孔加入稀释后的 100 μL 病毒液, 1 h 后加入等量的含 10% 胎牛血清的 M199 培养基, 7 d 后统计细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 明显的孔数。

1.7 双荧光素酶报告系统

根据已经有文献中 4 \times ISRE-miniP 和 NF- κ B-miniP 序列^[12] 人工设计引物, 并送公司合成引物。通过重叠延伸 PCR 技术合成 4 \times ISRE-miniP 和 NF- κ B-miniP 序列, 两端带有 psiCHECK-2 用 *Kpn* I 和 *Nhe* I 线性化后的同源序列, 使用限制性核酸内切酶 *Kpn* I 和 *Nhe* I 同时酶切 psiCHECK-2 以获得线性化载体, 将线性化载体与目的片段采用 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 连接后, 筛选阳性质粒并测序后, 扩大培养和提取质粒。

将 FHM 接种于 24 孔板中, 每孔加入 400 ng

pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr 和 200 ng 启动子荧光素酶报告系统及 1.8 μL lipofectamine 2000 试剂, 对照加入 400 ng pTol2/CMV/IE1-pr 质粒, 其余条件均相同。转染 24 h 后, 加入 1 MOI SVCV 以及未处理的 FHM 再孵育 24 h。使用双荧光素酶报告基因检测系统 (Promega, 美国) 检测总细胞裂解液中的荧光素酶活性, 结果取报告启动子-萤火虫荧光素酶信号值与内参启动子-海肾荧光素酶活性值的比值, 实验重复 3 次。实验数据均用平均值 \pm 标准差表示, 并用 SPSS 软件对实验结果进行统计学分析, 选择 One-Way ANOVA 方法中的 Duncan 氏检验比较组间差异, 显著性水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 *Olrif2* 的克隆及分析

采用 PCR 技术从成鱼心脏组织中扩增得到 *Olrif2* 编码区 (coding sequence, CDS), 编码 320 个氨基酸, 并以此为模板构建了真核表达载体 pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr (图 1), 该载体含有用于筛选的嘌呤霉素 (*pac*) 和红色荧光 (*DsRed*) 标记的融合基因。和其他脊椎动物相同, OLIRF2 含有 1 个 DBD 和 IAD2 结构域 (图 2)。氨基酸序列比对结果显示, 青鳉与牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) IRF2 氨基酸序列相似度最高, 高达 73.35%, 其次是点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*), 氨基酸序列相似度为 71.68%, 而和哺乳动物以及非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的相似度较低, 与非洲爪蟾的相似度仅为 50.00% (图 2)。将 IRF2 所属的 IRF1 亚家族进行系统进化分析发现, OLIRF2 与其他物种的 IRF2 聚为一支, 其中与牙鲈、点带石斑鱼的 IRF2 亲缘关系最接近, 而与同亚族的 IRF1 和 IRF11 亲缘关系最远 (图 3)。

2.2 *Olrif2* 在不同组织中的表达

以 β -actin 作为内参, 以脾脏中 *Olrif2* 的表达水平作为基线, 结果显示, *Olrif2* 在脑、眼、鳃、肠、头肾、脾脏、肝脏、肠、精巢和卵巢等 10 个组织中均有表达, 主要在脑、头肾以及性腺中表达, 在鳃中的表达水平较其他组织都要低 (图 4-a)。

为了解 *Olrif2* 是否参与青鳉体内的抗病毒反应, 实验通过 qRT-PCR 检测了青鳉在感染病毒后头肾中的 *Olrif2* 的表达水平。实验结果显示,

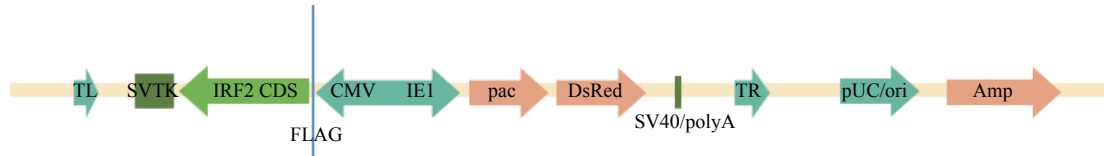


图 1 *Olirf2* 表达载体 pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr

CMV 启动子驱动 *Olirf2* 编码序列 (CDS), 用嘌呤霉素 (pac) 筛选稳定表达细胞

Fig. 1 The diagram of *Olirf2* expression vector pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr

The *Olirf2* coding sequence (CDS) was driven by CMV promoter, and stable expression cells would be selected by puromycin (pac)

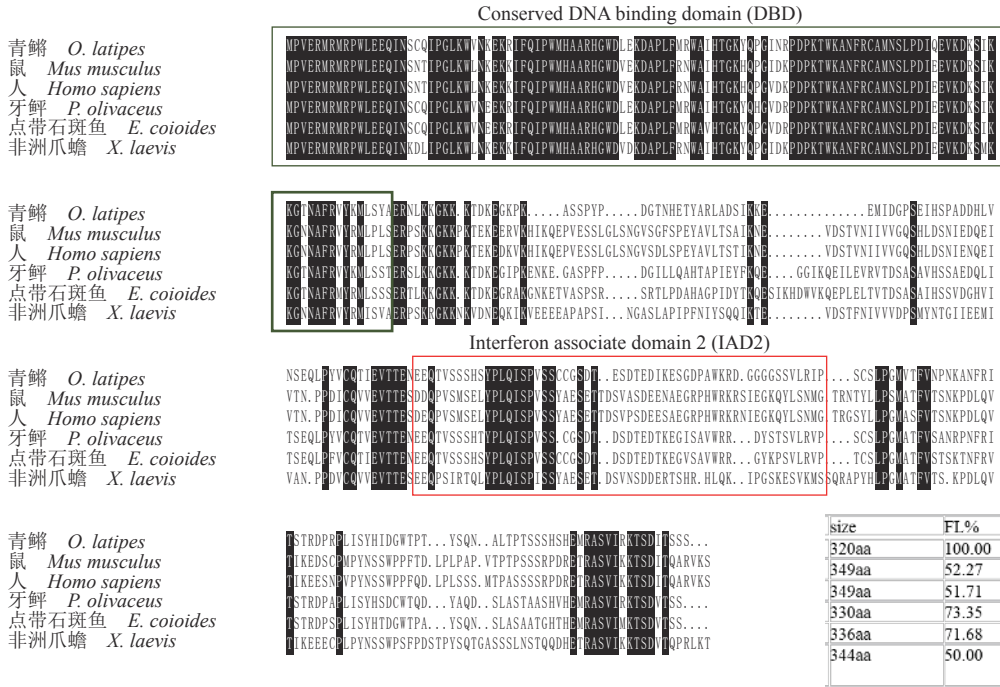


图 2 IRF2 的蛋白结构域和序列比对

相同氨基酸显示黑色, DBD 结构域用黑色方框突出, IAD2 结构域用红色方框突出

Fig. 2 Structure domain and multiple sequences alignment of IRF2 homologs

Identical residues are indicated in black, the conserved DNA binding domain is highlighted by black box, and interferon associate domain 2 is highlighted by red box

在感染病毒 72 h 后, 头肾中 *Olirf2* 的表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 4-b)。

2.3 FHM 中瞬转 *Olirf2* 促进 SVCV 病毒的增殖

FHM 转染 pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr, 以转染 pTol2/CMV/IE1-pr 的细胞为对照, 24 h 后采用 1 MOI 以及 0.1 MOI 的 SVCV 感染细胞, 感染 24 h 后 CPE 明显 (图版 I)。收集感染 1 MOI 以及 0.1 MOI 病毒后的细胞上清液, 将其稀释后加入 96 孔板中, 重复 3 次, 根据 CPE 孔数显示, 转染 pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr 的实验组病毒滴度较对照组显著升高 (图 5-a)。此外, 与转染 pTol2/CMV/IE1-pr 相比较, 无论是接种 1 MOI 还是 0.1 MOI SVCV, 转染 pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr 的实验组, 检测其

svcv-g 的表达水平均显著高于对照组 (图 5-b)。为了探究瞬转 *Olirf2* 的 FHM 促进病毒增殖的原因, 以 β -actin 作为内参, 检测 3 个抗病毒相关基因 *mx1*、*ifn* 和 *irf3* 的表达水平。转染 24 或 48 h 后, 相较于对照组而言, 瞬转 *Olirf2* 组中 *mx1* 和 *ifn* 的表达量均显著降低, 转染 48 h 后, 在瞬转 *Olirf2* 的细胞系中 *irf3* 的表达水平与也受到了显著抑制 (图 6)。

2.4 瞬转 *Olirf2* 抑制细胞中干扰素的应答

为了研究 *Olirf2* 对干扰素信号传导能力的影响, 在 FHM 中将 pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr 质粒与干扰素报告启动子 psiCHECK-2-NF- κ B 或 psiCHECK-2-ISRE 质粒共转染。双荧光素酶活性测定结果

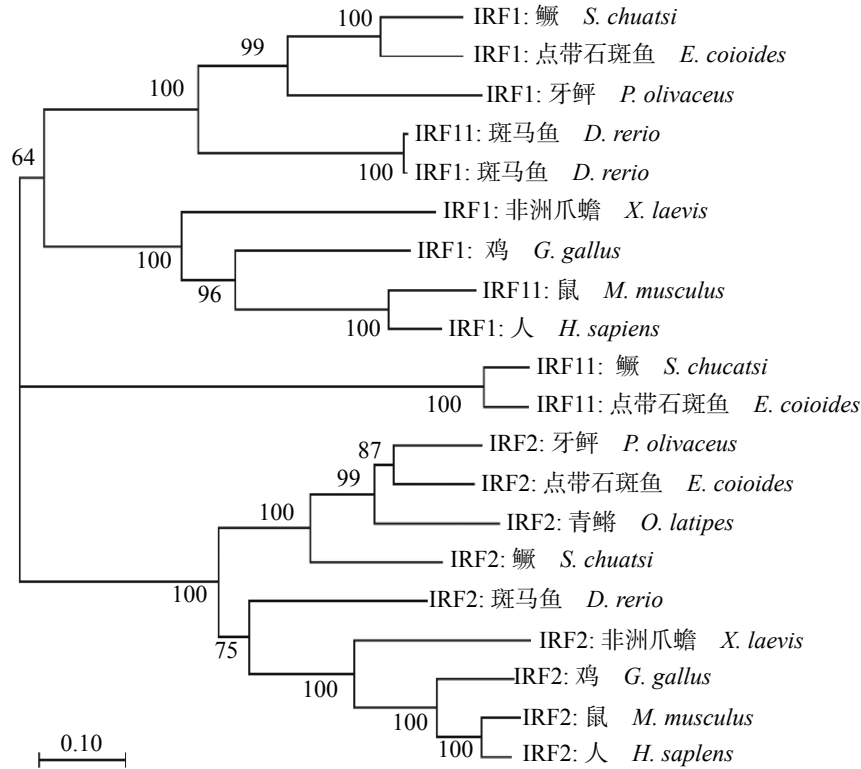


图3 IRF2 的系统进化分析

采用邻接法，利用 MEGA-X 软件 bootstrap 进行 1 000 次复制，构建系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of IRF2

The phylogenetic tree was constructed by using the neighbor-joining method in MEGA-X software, 1 000 replications of bootstrap were performed

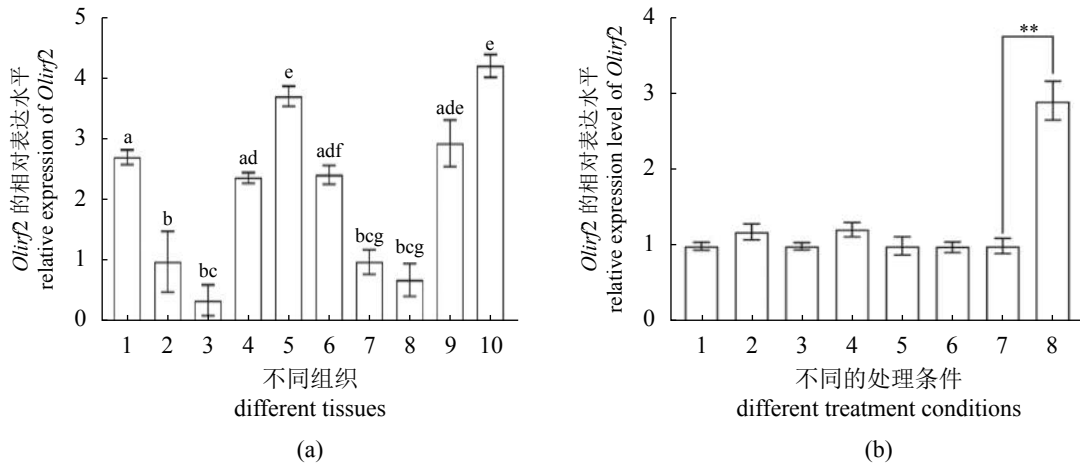
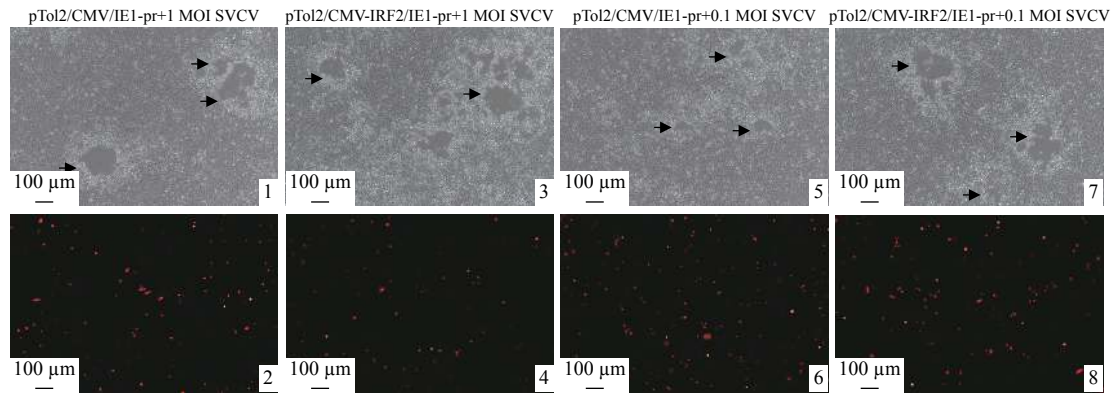


图4 不同组织 (a) 和不同处理条件下头肾 (b) 中 Olirf2 的相对表达水平

(a) 1~10 分别代表脑、眼、鳃、心脏、头肾、肝脏、脾脏、肠、精巢和卵巢，(b) 1、3、5 和 7 分别代表腹腔注射培养基 12、24、48 和 72 h 后头肾中 Olirf2 的相对表达水平，2、4、6 和 8 分别代表腹腔注射 NNV 12、24、48 和 72 h 后头肾中 Olirf2 的相对表达水平；不同字母间差异显著 ($P<0.05$)，** 极显著差异 ($P<0.01$)

Fig. 4 The relative expression level of Olirf2 in different tissues(a) and in head kidney(b)with different treatment conditions

(a) 1-10 represent brain, eyes, gills, heart, head kidney, liver, spleen, intestine, testis and ovary, respectively, (b) 1, 3, 5, 7 represent the mRNA expression level of Olirf2 in the head kidney at 12, 24, 48 and 72 h after intraperitoneal injection of medium, 2, 4, 6, 8 represent the mRNA expression level of Olirf2 in the head kidney at 12, 24, 48 and 72 h after intraperitoneal injection of NNV; different letters indicate significant difference ($P<0.05$); **, highly significant difference ($P<0.01$)



图版 I *Olirf2* 在瞬时转染 FHM 中的促病毒增殖作用

FHM 转染 pTol2/CMV-/IE1-pr 或 pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr 质粒 24 h 后接种 1 MOI SVCV 或 0.1 MOI SVCV, 24 h 后细胞病变效应; 箭头表示感染 SVCV 后细胞的 CPE; 1, 3, 5, 7. 相差显微镜成像, 2, 4, 6, 8. 红色荧光蛋白图像; 下同

Plate I The pro-viral effect of *Olirf2* in transiently transfected FHM

Transfected with pTol2/CMV/IE1-pr or pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr at 24 h after, FHM were inoculated with SVCV virus at MOI 1 or 0.1 for another 24 h; the arrows indicated CPE of the cells infected with SVCV; 1, 3, 5, 7. phase contrast image, 2, 4, 6, 8. the RFP was observed under microscope; the same below

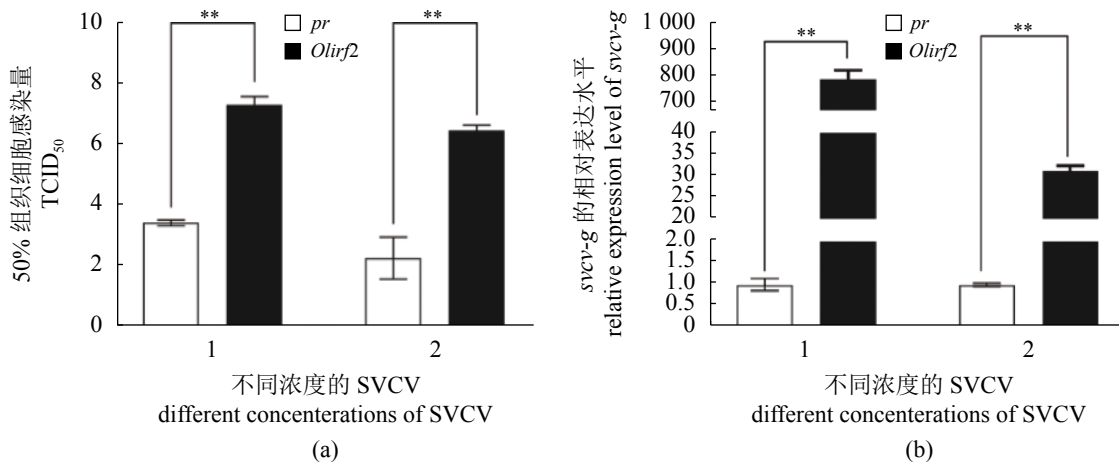


图 5 *Olirf2* 在瞬时转染 FHM 后 TCID₅₀ 及 *svcv-g* 的变化

(a) 将 SVCV 感染细胞后的上清接种 FHM, 测定上清 TCID₅₀, (b) 感染 SVCV 后 FHM 中 *svcv-g* 的表达水平; 1. 1 MOI SVCV, 2. 0.1 MOI SVCV; *, 显著差异 ($P < 0.05$), **, 极显著差异 ($P < 0.01$); 下同

Fig. 5 Changes of TCID₅₀ and *svcv-g* after transient transfection of *Olirf2* in FHM

(a) TCID₅₀ of FHM supernatant after being infected by SVCV, (b) expression level of *svcv-g* in FHM infected by SVCV; 1. 1 MOI SVCV, 2. 0.1 MOI SVCV; *, significant difference ($P < 0.05$), **, extremely significant difference ($P < 0.01$); the same below

显示, *Olirf2* 表达显著抑制了 1 MOI SVCV 诱导的 NF- κ B 以及 ISRE 的启动子活性。当没有 SVCV 刺激的情况下, *Olirf2* 也能够抑制 NF- κ B 和 ISRE 的活性, 说明无论 FHM 是否感染 SVCV, *Olirf2* 都显著抑制细胞中 NF- κ B(图 7-a) 和 ISRE 启动子的应答(图 7-b)。

2.5 FHM 中稳定转染 *Olirf2* 后抗病毒活性的检测

为了探究稳定转染 *Olirf2* 的细胞是否同样具

有促进病毒增殖的能力, 通过药物筛选出红色荧光蛋白比例为 100% 的转染 *Olirf2* 以及转染 pTol2/CMV/IE1-pr 的 FHM, 建立稳转 *Olirf2* 以及 *pr* 的细胞系。用 1 MOI 以及 0.1 MOI SVCV 感染稳转的细胞系, 感染 24 h 后待出现明显的 CPE(图版 II), 收集上清液检测 FHM 的 TCID₅₀。有趣的是, 与对照组相比较, 稳转 *Olirf2* 的 FHM 的病毒滴度较低(图 8-a)。此外, 检测稳转细胞系中 *svcv-g* 的表达水平, 发现 2 组之间略有差距, 但相较于对照组, 稳转 *Olirf2* 的 FHM 中 *svcv-g* 的表达低

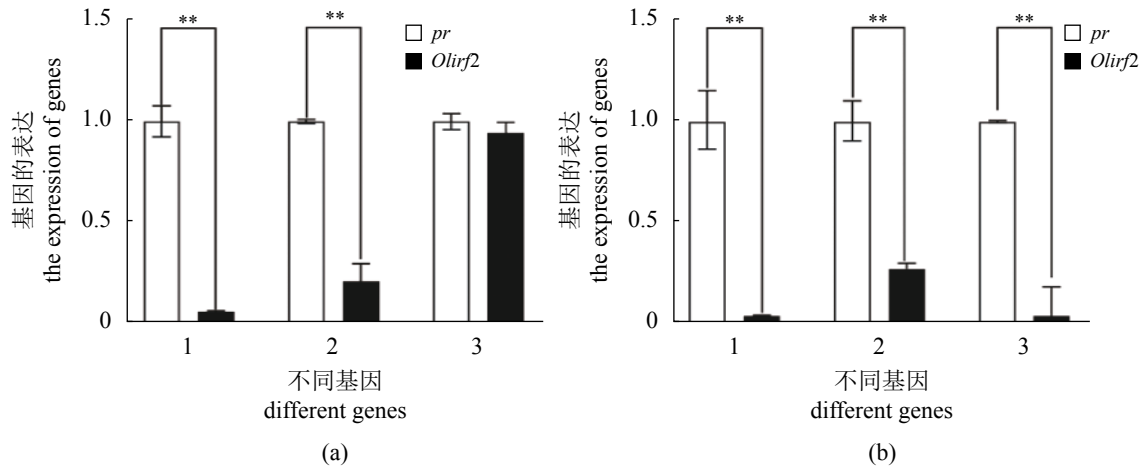


图 6 *Olirf2* 瞬时过表达对干扰素相关基因的表达的影响

(a) FHM 中 3 个抗病毒相关基因在转染 *Olirf2* 24 h 后的表达水平, (b) FHM 中 3 个抗病毒相关基因在转染 *Olirf2* 48 h 后的表达水平; 1~3 分别代表 *mx1*、*ifn* 和 *irf3*; *. 显著差异 ($P<0.05$), **. 极显著差异 ($P<0.01$); 下同

Fig. 6 Effects of *Olirf2* transient overexpression on the expression of antiviral related genes

(a) expression level of 3 antiviral relative genes in FHM at 24 h after being transfected with *Olirf2*, (b) expression level of 3 antiviral relative genes in FHM at 48 h after being transfected with *Olirf2*; 1-3. *mx1*, *ifn* and *irf3*; *. significant difference ($P<0.05$), **. extremely significant difference ($P<0.01$); the same below

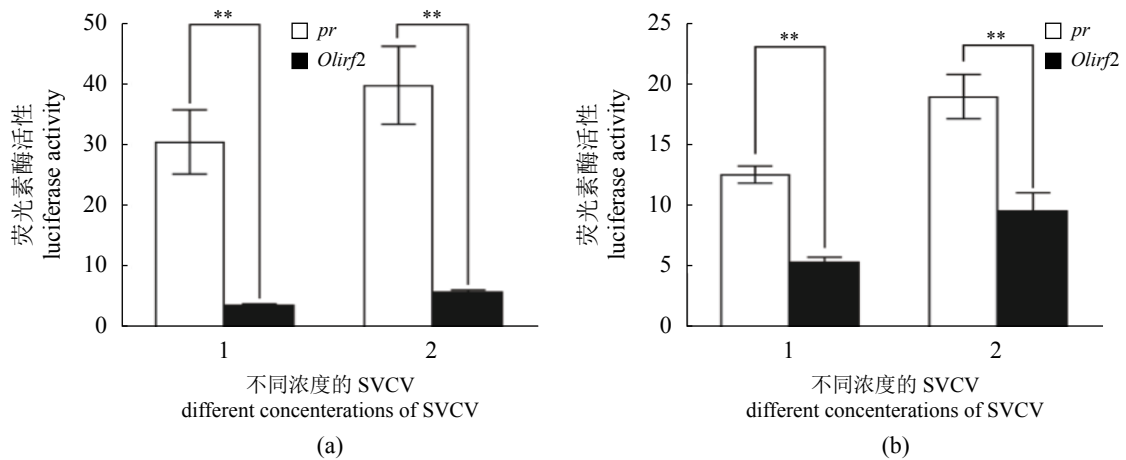


图 7 瞬转 *Olirf2* 对 NF-kB/ISRE 启动子活性的影响

(a) NF-κB-miniP 启动子活性, (b) FHM ISRE-miniP 启动子活性; 1. 未感染 SVCV, 2. 1 MOI SVCV

Fig. 7 Effects of *Olirf2* on NF-κB/ISRE promoter activity in transient transfected FHM

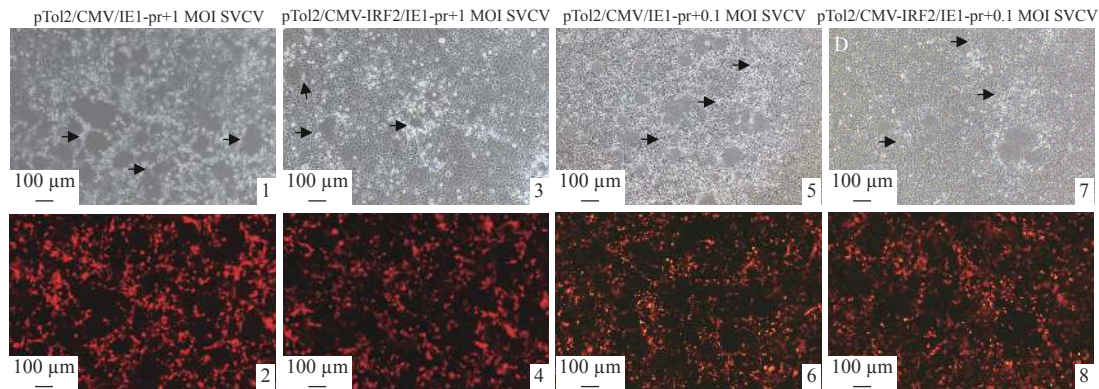
(a) NF-κB-miniP activity; (b) ISRE-miniP activity; 1. uninfected SVCV, 2. infected 1 MOI SVCV

于对照组 (图 8-b)。同时发现在稳转 *Olirf2* 的 FHM 中 3 个抗病毒相关基因 *mx1*、*ifn* 和 *irf3* 的表达水平显著提高 (图 9)。

3 讨论

IRFs 是干扰素产生和信号转导的关键调节器, 其在协调机体的先天性和适应性免疫应答过程中对免疫细胞的生长、分化和功能具有多种且重要的调节作用, 其中 IRF2 是一类重要的

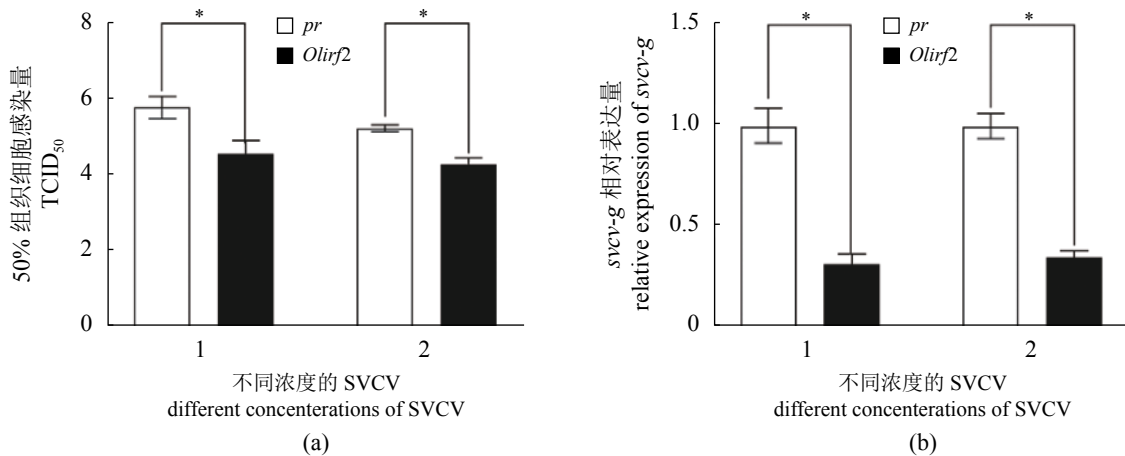
干扰素调节因子。这里, 我们克隆和鉴定了 *Olirf2*, 并对 OLIRF2 的系统进化分析发现, 其与其他鱼类的 IRF2 聚集在一起。通过将 OLIRF2 与其他物种的氨基酸序列多重比对后, 发现 OLIRF2 在进化上是保守的, 其与牙鲆的相似度最高。据已有的报道, *irf2* 在各种组织或器官中均有表达, 本研究也表明 *Olirf2* 在青鳞 10 种组织中均有表达, 在鳃中的表达量最低, 在性腺以及头肾中表达量较高, 这与大西洋鲑 (*Salmo salar*) 中性腺的高表达一致^[24]。将青鳞腹腔注射病毒后, 无

图版 II *Olirf2* 在稳定转染的 FHM 中的抗病毒作用

稳定转染 pTol2/CMV/IE1-pr 或 pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr 的 FHM 感染 1 MOI SVCV 或者 0.1 MOI SVCV 24 h 后的细胞状态; 箭头表示受 SVCV 感染后细胞的 CPE

Plate II The antiviral effect of *Olirf2* in stably transfected FHM

Stably transfected pTol2/CMV/IE1-pr or pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr FHM was inoculated with SVCV virus at MOI value of 1 or 0.1 for 24 h; the arrows indicated the CPE of infected cells

图 8 在 FHM 中稳定转染 *Olirf2* 后 $TCID_{50}$ 及 *svcv-g* 的变化

(a) $TCID_{50}$ 测定, (b) *svcv-g* 的表达水平

Fig. 8 Changes of $TCID_{50}$ and *svcv-g* after stably transfection of *Olirf2* in FHM

(a) the $TCID_{50}$ of supernatants of stably transfected cell, (b) expression level of *svcv-g* in stable transfected FHM

论是鳃还是头肾, *Olirf2* 的表达水平显著提高, 表明 *Olirf2* 参与了青鳉的抗病毒免疫反应。

实验发现在 FHM 中瞬时 (24~48 h) 过表达 *Olirf2* 表现出明显的促进病毒增殖的作用, 包括 *svcv-g* 的拷贝数和 $TCID_{50}$ 的倍增。众所周知, IRFs 是一类调控 IFN 转录和 IFN 诱导基因表达的同源蛋白家族, 它们是 TLR 和 IFN 信号通路的关键调节剂, IRFs 可与包括 IRFs、STATs 及 NF- κ B 在内的多种转录因子共同作用^[25]。IRF2 参与了免疫应答, 在虹鳉、点带石斑鱼、草鱼等物种中都能被 poly I:C 诱导^[19, 26-27]。在 FHM 中瞬转 *Olirf2* 显著抑制 NF- κ B 和 ISRE 的活性, 同

时也抑制了抗病毒相关基因如 *mx1*、*ifn* 和 *irf3* 的表达水平。在哺乳类动物的 IFN 信号通路中, IRF1 是 IFN 转录激活因子, 而 IRF2 是转录抑制因子, IRF2 抑制相关基因启动子活性, 从而抑制基因的表达。当病毒感染细胞后, IRF2 可以和 IRF1 竞争下游基因启动子中的相同顺式作用元件, 从而与 IRF1 形成拮抗的作用^[28]。此外, IRF2 通过其 DBD 结构域结合 IFN 和 ISGs 的 ISRE, 达到抑制 IFN 和多种 ISGs 转录的效果^[29], 因此在本研究中瞬转 *Olirf2* 除了抑制 NF- κ B 和 ISRE 的活性, 也抑制了抗病毒相关基因的表达水平。IRF2 除了抑制 *ifn β* 的表达外^[30], 它还下调 ISGs

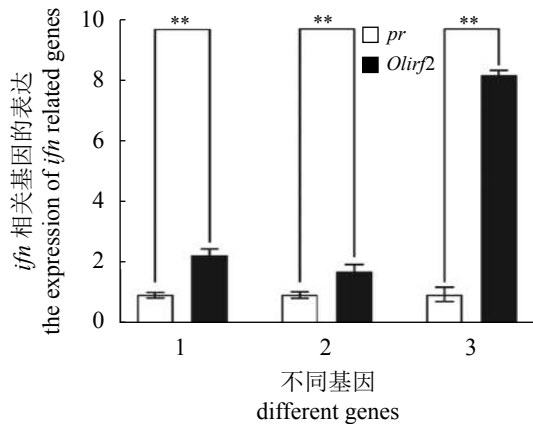


图9 稳转后抗病毒相关基因的RNA表达

mx1、*ifn* 和 *irf3* 等3个抗病毒相关基因在稳定转染 *pr* 或 *Olirf2* 后在 FHM 中的表达水平, 1~3 分别代表 *mx1*、*ifn* 和 *irf3*

Fig. 9 The RNA expression of antiviral related genes in stably transfected FHM

The RNA expression level of *mx1*, *ifn* and *irf3* antiviral relative genes in stably transfected *pr* or *Olirf2* FHM; 1-3. *mx1*, *ifn* and *irf3*

的转录、对 IFN α/β 激活的 ISGF3 起反作用^[31]。此外, 虽然 IRF2 被认为是 IRF1 的转录抑制剂和拮抗剂, 但 IRF2 也可激活基因的转录。PKR 是干扰素介导的抗病毒免疫反应的主要调节因子, 用 poly I : C 刺激 CIK 细胞, IRF2 能够下调 PKR 激活蛋白 PKRRA 表达, 同时增强其抑制蛋白 TARBP2 的表达^[8]。TLR3 介导宿主对多种病毒的防御, 如乙型肝炎病毒^[32]。IRF1 和 IRF2 都是 IFN 刺激或病毒感染诱导 TLR3 转录所必需的^[33], 而 IRF2 是维持 TLR3 基础表达水平所必需的^[27,34]。在 HeLa 细胞中, IFN-I 诱导表达的 TRIM14 在抗病毒防御中发挥重要作用, IRF2 与 IRF1 均可与 ISRE 结合, 激活 TRIM14 的转录, 同时 IRF2 也可维持非 IFN α 诱导的 TRIM14 的基本表达水平^[35]。

我们也发现, 在 FHM 中稳定的过表达 *Olirf2* 可提高细胞的抗病毒能力。实验结果显示, 稳定转染 *Olirf2* 的 FHM 感染 SVCV 后, TCID₅₀ 以及 SVCV 的关键基因 *svc-v-g* 的表达都低于对照组。这可能是由于 FHM 中抗病毒相关基因 *mx1*、*ifn* 和 *irf3* 的表达水平显著升高所致。有报道显示, 青鳉中持续过表达 IFN 导致 IFN 脱敏, 其诱导表达的 STAT1b、STAT2、IRF9 以及 RLR 信号分子的表达水平下调, 从而增加对神经坏死病毒感染的易感性^[36]。在哺乳动物中长期和过度的 IFN 刺激会导致对 IFN 信号的脱敏。例如, 在人类成纤维细胞中, IFN 处理 2 h 导致 IFN 信号通路的最

大激活, 而持续的刺激导致脱敏, 同时 ISGs 的转录降低到预处理水平^[37]。因此, 我们推测 *Olirf2* 的持续过表达激活鱼类中一个功能性的 RLR 和 RLR 触发的 IFN 信号通路^[38], 从而增强鱼体抗病毒能力。

综上所述, 实验鉴定了 *Olirf2*, 发现在 FHM 中瞬时转染 *Olirf2* 具有促进病毒增殖的功能, 但是持续过表达 *Olirf2* 反而促进细胞产生抗病毒能力, 这可能与免疫应答相关的抗病基因 *mx1*、*ifn* 和 *irf3* 的上调有关。在病毒感染过程中, 包括 *irf2* 在内的干扰素调节因子的表达量和持续时间对于机体的抗病毒效果有很大的影响, 这为通过基因编辑或者转基因手段来构建抗病毒的鱼类提供了理论基础。

参考文献 (References):

- [1] Zou J, Secombes C J. Teleost fish interferons and their role in immunity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1376-1387.
- [2] Zou J, Gorgoglione B, Taylor N G H, *et al.* Salmonids have an extraordinary complex type I IFN system: characterization of the IFN locus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals two novel IFN subgroups[J]. *The Journal of Immunology*, 2014, 193(5): 2273-2286.
- [3] Zhang Y B, Gui J F. Molecular regulation of interferon antiviral response in fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 38(2): 193-202.
- [4] Hayashi H, Kohno T, Yasui K, *et al.* Characterization of dsRNA-induced pancreatitis model reveals the regulatory role of IFN regulatory factor 2 (*Irf2*) in *trypsinogen 5* gene transcription[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(46): 18766-18771.
- [5] Zhao G N, Jiang D S, Li H L. Interferon regulatory factors: at the crossroads of immunity, metabolism, and disease[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2015, 1852(2): 365-378.
- [6] Fujita T, Sakakibara J, Sudo Y, *et al.* Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements[J]. *EMBO Journal*, 1988, 7(11): 3397-3405.
- [7] Suzuki Y, Yasuike M, Kondo H, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of interferon regulatory

- factor 10 (IRF10) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 67-76.
- [8] Huang K, Qi G Q, Sun Z C, *et al.* *Ctenopharyngodon idella* IRF2 and ATF4 down-regulate the transcriptional level of *PRKRA*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 64: 155-164.
- [9] Lace M J, Anson J R, Haugen T H, *et al.* Interferon regulatory factor (IRF)-2 activates the HPV-16 E6-E7 promoter in keratinocytes[J]. *Virology*, 2010, 399(2): 270-279.
- [10] Tanaka N, Kawakami T, Taniguchi T. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system[J]. *Cellular and Molecular Biology*, 1993, 13(8): 4531-4538.
- [11] Veals S A, Schindler C, Leonard D, *et al.* Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins[J]. *Cellular and Molecular Biology*, 1992, 12(8): 3315-3324.
- [12] Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I inteferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors[J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 349-360.
- [13] Takahasi K, Suzuki N N, Horiuchi M, *et al.* X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2003, 10(11): 922-927.
- [14] Oshima S, Nakamura T, Namiki S, *et al.* Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of interleukin-7 in human intestinal epithelial cells[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(14): 6298-6310.
- [15] Xi H K, Blanck G. The IRF-2 DNA binding domain facilitates the activation of the class II transactivator (CIITA) type IV promoter by IRF-1[J]. *Molecular Immunology*, 2003, 39(11): 677-684.
- [16] Chen H R, Sun C G, Liu W Q, *et al.* Promoter analysis and transcriptional regulation of a *Gig2* gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 249-255.
- [17] Collet B, Hovens G C J, Mazzoni D, *et al.* Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interferon regulatory factor 1 and 2 (IRF-1 and IRF-2)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003, 27(2): 111-126.
- [18] Sun B J, Chang M X, Chen D L, *et al.* Gene structure and transcription of IRF-2 in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with the finding of alternative transcripts and microsatellite in the coding region[J]. *Immunogenetics*, 2006, 58(9): 774-784.
- [19] Jia W Z, Guo Q L. Gene structures and promoter characteristics of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2 and IRF-7 from snakehead *Channa argus*[J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(8): 2419-2428.
- [20] Zhan F B, Liu H, Lai R F, *et al.* Expression and functional characterization of interferon regulatory factors (*irf2*, *irf7* and *irf9*) in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 67: 239-248.
- [21] Gan. X N, Chen Z, Wang X Z, *et al.* Molecular cloning and characterization of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2 and IRF-5 in the chondrosteian paddlefish *Polyodon spathula* and their phylogenetic importance in the Osteichthyes[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 36(1): 74-84.
- [22] Tamura T, Yanai H, Savitsky D, *et al.* The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis[J]. *Annual Review of Immunology*, 2008, 26: 535-584.
- [23] Pan Q H, Xue T, Xia B L, *et al.* *Gonadal*, not maternal, acquisition of duplicated *pax6* orthologs in *Megalobrama amblycephala*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(7): 1710.
- [24] Bergan V, Kileng Ø, Sun B J, *et al.* Regulation and function of interferon regulatory factors of Atlantic salmon[J]. *Molecular Immunology*, 2010, 47(11-12): 2005-2014.
- [25] Antoncezyk A, Krist B, Sajek M, *et al.* Direct inhibition of irf-dependent transcriptional regulatory mechanisms associated with disease[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1176.
- [26] Shi Y, Zhao Z, Yin J K, *et al.* Interferon regulatory factor-2 in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): gene, inductive expression pattern and subcellular localization[J]. *Comparative Biochemistry and*

- [Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology](#), 2010, 155(2): 110-117.
- [27] Ren G, Cui K R, Zhang Z Y, *et al.* Division of labor between IRF1 and IRF2 in regulating different stages of transcriptional activation in cellular antiviral activities[J]. [Cell & Bioscience](#), 2015, 5(1): 17.
- [28] Sherry B. The role of interferon regulatory factors in the cardiac response to viral infection[J]. [Viral Immunology](#), 2002, 15(1): 17-28.
- [29] Wang Y, Liu D P, Chen P P, *et al.* Negative feedback regulation of IFN- γ pathway by IFN regulatory factor 2 in esophageal cancers[J]. [Cancer Research](#), 2008, 68(4): 1136-1143.
- [30] Günthner R, Anders H J. Interferon-regulatory factors determine macrophage phenotype polarization[J]. [Mediators of Inflammation](#), 2013, 2013: 731023.
- [31] Hida S, Ogasawara K, Sato K, *et al.* CD8⁺ T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon- α/β signaling[J]. [Immunity](#), 2000, 13(5): 643-655.
- [32] Karimi-Googheri M, Arababadi M K. TLR3 plays significant roles against hepatitis B virus[J]. [Molecular Biology Reports](#), 2014, 41(5): 3279-3286.
- [33] Sun L, Jiang Z F, Acosta-Rodriguez V A, *et al.* HCFC2 is needed for IRF1-and IRF2-dependent *Tlr3* transcription and for survival during viral infections[J]. [Journal of Experimental Medicine](#), 2017, 214(11): 3263-3277.
- [34] Nhu Q M, Cuesta N, Vogel S N. Transcriptional regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced Toll-like receptor (TLR) expression in murine macrophages: role of interferon regulatory factors 1 (IRF-1) and 2 (IRF-2)[J]. [Journal of Endotoxin Research](#), 2006, 12(5): 285-295.
- [35] Cui J G, Xu X, Li Y T, *et al.* TRIM14 expression is regulated by IRF-1 and IRF-2[J]. [FEBS Openbio](#), 2019, 9(8): 1413-1420.
- [36] Maekawa S, Aoki T, Wang H C. Constitutive overexpressed type I interferon induced downregulation of antiviral activity in medaka fish (*Oryzias latipes*)[J]. [Developmental & Comparative Immunology](#), 2017, 68: 12-20.
- [37] Sarasin-Filipowicz M, Wang X Y, Yan M, *et al.* Alpha interferon induces long-lasting refractoriness of JAK-STAT signaling in the mouse liver through induction of USP18/UBP43[J]. [Cellular and Molecular Biology](#), 2009, 29(17): 4841-4851.
- [38] Biacchesi S, LeBerre M, Lamoureux A, *et al.* Mitochondrial antiviral signaling protein plays a major role in induction of the fish innate immune response against RNA and DNA viruses[J]. [Journal of Virology](#), 2009, 83(16): 7815-7827.

Dual characters of overexpressed Medaka (*Oryzias latipes*) interferon regulatory factor 2 gene during virus infection

JIANG Zhengzheng¹, LUO Junzhi¹, SHEN Ping¹, WANG Zhi¹, PANG Lianhui¹,
PAN Qihua^{1,2}, LIU Hong¹, CHEN Tiansheng^{1,2*}

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Interferon (IFN)-mediated antiviral signaling pathway is a very important part of fish innate immune response, and interferon regulatory factor 2 (IRF2) can affect fish immunity by regulating the expression of IFN. Therefore, this experiment studied the role of medaka *irf2* (*Olirf2*) in the antiviral signal pathway, which may provide a theoretical basis for antiviral fish through gene editing or genetic modification. In this study, the *Olirf2* was cloned, and RNA expression was detected in adult tissues. Moreover, the plasmid pTol2/CMV-IRF2/IE1-pr was constructed by cloning the coding sequence of *Olirf2* for eukaryotic expression. In fish cell line FHM, transient expression of *Olirf2* promoted the replication of spring viremia of carp virus (SVCV) and reduced the expression of *mx1*, *ifn* and *irf3* significantly. Further studies by luciferase reporter assay showed that *Olirf2* inhibited promoter activities of SVCV-induced NF- κ B and ISRE, indicating that *Olirf2* may promote the replication of SVCV by inhibiting cellular innate immune response. However, constant overexpression of *Olirf2* enhanced the antiviral ability in FHM and increased the expression levels of *mx1*, *ifn* and *irf3*. Therefore, the current research suggested that the *Olirf2* has double effect to regulate the antiviral effect based on the duration of expression.

Key words: interferon regulator factor 2; *Oryzias latipes*; fish cell line; spring viremia of carp virus (SVCV); dual characters

Corresponding author: CHEN Tiansheng. E-mail: tiansheng.chen@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31771648, 31672653); Scientific Research Foundation of Jimei University (ZQ2020003); National Key Basic Research Program of China (2013CB967700)