



中华鲟 IFN α 2 的抗病毒天然免疫作用

李由申¹, 丁广义¹, 张书环², 郭慧芝¹, 周江¹, 罗凯^{1*}, 许巧情^{1*}

(1. 长江大学中华鲟病害研究所, 湖北 荆州 434020;

2. 贵州中医药大学, 鲟鱼健康养殖与药用价值研究中心, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为探究中华鲟干扰素 α 2 (AsIFN α 2) 的免疫调控作用, 本实验通过原核表达获得了重组中华鲟干扰素 α 2 蛋白 (rAsIFN α 2), 并分析其对抗病毒相关基因的影响及其抗病毒活性。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 结果显示, rAsIFN α 2 能显著激活中华鲟鳃细胞中干扰素刺激基因 (IFN-stimulated genes, ISGs) 的表达, 如 *Mx*、*PKR*、*Viperin* 和 *ADAR4*。此外, rAsIFN α 2 还能通过激活 *IRFs* 和 *IFNs* 基因的表达, 从而帮助宿主细胞迅速建立抗病毒状态。在鲤春病毒血症病毒 (SVCV) 感染鲤上皮细胞 (EPC) 模型中, rAsIFN α 2 能够诱导 EPC 细胞中 *Mx*、*PKR* 和 *Viperin* 的表达, 并降低 EPC 细胞中 SVCV 病毒 *G*、*N* 和 *P* 基因的表达, 减少病变效应的产生。研究表明, AsIFN α 2 在宿主抗病毒天然免疫反应中发挥作用。本研究为深入了解中华鲟的干扰素免疫系统以及治疗病毒性疾病提供理论依据。

关键词: 中华鲟; 干扰素; 抗病毒; 鲤春病毒血症病毒; 免疫调控

中图分类号: S 942.1

文献标志码: A

干扰素 (interferon, IFN) 是 II 类 α 螺旋细胞因子家族中重要的成员, 在脊椎动物先天性免疫防御系统中扮演着非常重要的角色^[1-2]。脊椎动物 IFN 可分为 4 种主要类型, 即 I、II、III 和 IV 型^[3]。其中 I 型 IFN 被认为是宿主中参与抗病毒免疫反应中最为重要的细胞因子之一, 通过 IFN α 受体 1 (IFNAR1) 和 IFNAR2 结合形成的复合物诱导 JAK 激酶 (janus kinase 1, JAK1) 和酪氨酸激酶 2 (tyrosine kinase 2, TYK2) 发生磷酸化^[4-5]。活化的激酶进一步促进 STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) 和 STAT2 的磷酸化, 并招募干扰素调节因子 9 (interferon regulatory factor 9, IRF9) 组装形成复合物干扰素刺激基因因子 3 (interferon-stimulated gene factor, ISGF3)。随后 ISGF3 复合物迁移到细胞核中, 与 ISGs 启动子中的

干扰素刺激响应元件 (interferon-stimulated response element, ISREs) 结合, 启动多种干扰素刺激基因的转录^[5-7], 从而建立宿主细胞抗病毒状态。

与哺乳动物类似, 在硬骨鱼中也存在一系列 I 型干扰素, 并参与病毒免疫反应。硬骨鱼类 I 型干扰素根据形成二硫键的半胱氨酸数目、结合的受体、系统进化关系等可分为 I 和 II 组, I 组 (IFN- α , IFN- ϵ , IFN- δ , IFN- h) 和 II 组 (IFN- β , IFN- c , IFN- i , IFN- f) 也可进一步分为 4 个亚组^[8-13]。在哺乳动物中, I 型干扰素已经被证实为具有抗病毒作用的细胞因子^[4]。在鱼类中, I 型干扰素也参与了宿主抗病毒天然免疫, 如青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) IFN β 能刺激 EPC 细胞抵御 SVCV 和草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 的感染。大西洋鲑 (*Salmo salar*) IFN β 和 IFN γ 能诱导

收稿日期: 2023-11-02 修回日期: 2024-03-13

资助项目: 国家自然科学基金 (32260925); 贵州省科技厅项 (黔-ZK[2022] 507)

第一作者: 李由申 (照片), 从事鱼类免疫学研究, E-mail: leeyoushen@163.com

通信作者: 罗凯, 从事鱼类免疫学研究, E-mail: luokaiyxj@yangtzeu.edu.cn;

许巧情, 从事鱼类免疫学研究, E-mail: xuqiaoqing@yangtzeu.edu.cn



抗病毒基因的表达来抵御鲑鱼甲病毒 (salmonid alphavirus 3, SAV3) 的感染^[14-15]。此外, 不同种类的 I 型干扰素还存在相互调控的功能^[16-17]。在鱼类中, I 型 IFN 可以促进 IRF3 和 IRF7 的磷酸化, 从而导致 IFN 的级联放大效应^[17-19]。大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 和 鳊 (*Siniperca chuatsi*) 的 IFNc 和 IFNh 都能诱导其自身和其他 I 型 IFNs 的表达, 以及 *IRF3*、*IRF7* 和下游抗病毒基因 *Mx* 与 *Viperin* 的表达^[17, 20]。

中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 是我国一级濒危保护动物, 目前关于中华鲟的研究主要集中在养殖、繁殖、生态学及遗传学等方面^[21-24]。中华鲟作为八倍体生物, 具有较高的免疫力^[25], 但近年来大多种疾病暴发造成中华鲟死亡^[26-27]。2016 年 12 月, 人工繁殖的子 2 代中华鲟幼鱼出现快速、持续、不明缘故的死亡, 解剖发现鱼体脾脏充血, 实验利用发病中华鲟脾脏进行转录组测序, 发现了 3 种 I 型干扰素 *IFNe* (*IFNe1*~*IFNe3*) 基因, 而在其他多个中华鲟转录组中均未发现 *IFN*^[28-30]。因此, 研究患病中华鲟中 *IFNe* 尤为重要。本实验室之前的研究表明, 同其他 *IFNe* 基因相比, 中华鲟在受到 poly I:C 刺激后 *IFNe2* 的上调表达倍数最高且持续时间较长, 在抗病毒免疫过程中可能发挥重要作用^[31]。本实验主要研究中华鲟 *IFNe2* 的抗病毒活性及其对 IFN 信号通路的影响, 以期深入了解中华鲟的干扰素免疫系统, 并为治疗病毒性疾病提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华鲟鳍细胞由本实验室建立并保存, 鲤上皮细胞 (epithelioma papulosum cyprini, EPC) 保存于本实验室。中华鲟鳍细胞和 EPC 细胞分别使用含有 10% 胎牛血清 (Gibco, 美国) 和 1% 青霉素-链霉素 (5 000 U/mL, Gibco, 美国) 的 M199 和 MEM 培养, 于 28 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。鲤春病毒血症病毒 (spring viraemia of carp virus, SVCV) 由本实验室保存。本研究获得了长江大学实验动物管理和使用伦理委员会批, 实验过程中操作人员严格遵守长江大学伦理规范, 并按照长江大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 载体构建

根据中华鲟 *IFNe2* 序列 (GenBank: MH645442)

设计特异性引物 *AsIFNe2*-F/R (表 1), 以中华鲟 cDNA 为模板扩增 *AsIFNe2* 全长序列, 使用琼脂糖凝胶回收试剂盒 [宝生物工程 (大连) 有限公司] 回收。回收产物与 pET-32a 质粒使用 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性核酸内切酶 (New England Biolabs®, 英国) 酶切后进行胶回收, 使用 T4 DNA 连接酶 (New England Biolabs®, 英国) 连接载体与 *AsIFNe2* 片段。连接产物转化进入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞, 经过 PCR 验证后送至武汉擎科生物科技有限公司进行测序确定。

1.3 rAsIFNe2 重组蛋白的表达和纯化

将构建成功的重组 pET-32a-*AsIFNe2* 质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞后, 挑取单克隆于 10 mL 含氨苄青霉素的液体 LB 培养基, 37 °C 下 200 r/min 培养过夜。次日以体积比为 1 : 100 的比例扩大培养至 OD₆₀₀ 值 0.6~0.8, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 于 18 °C、160 r/min 摇床中诱导 12 h。诱导结束后收集菌体进行超声波破碎, SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白表达。使用 Ni Sepharose 6 Fast Flow 填料 (Cytiva, 中国) 对重组蛋白进行纯化并使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒 [宝生物工程 (大连) 有限公司] 检测蛋白含量。

1.4 rAsIFNe2 诱导中华鲟鳍细胞 *IRFs*、*IFNs* 和 *ISGs* 表达

在 6 孔板中加入 2 mL 含 10% FBS 的 M199 培养基培养中华鲟鳍细胞系, 培养细胞至形成致密的单层细胞后加入 1 μ g/mL rAsIFNe2 或等体积的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 继续培养, 在 3、6、12 和 24 h 时使用 PBS 清洗细胞 2 次。收集细胞至无 RNA 酶的 EP 管中保存于 -80 °C, 用于检测 *IRFs*、*IFNs* 以及 *ISGs* 的表达变化。

1.5 rAsIFNe2 的抗病毒作用

将 EPC 细胞按每孔 2×10^6 个细胞接种于 6 孔板中, 使用 2 mL 含 10% FBS 的 MEM 培养基培养细胞至形成致密的单层细胞后, 加入 1 μ g/mL rAsIFNe2 或等体积的 PBS 继续培养。在 3、6、12 和 24 h 时使用 PBS 清洗 2 次后, 收集细胞至无 RNA 酶的 EP 管中保存于 -80 °C, 用于检测 EPC 细胞中抗病毒基因 *Mx*、*PKR* 和 *Viperin* 的转录水平。

将 EPC 细胞按每孔 2×10^6 个细胞接种于 6 孔

表 1 载体构建及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 引物信息

Tab. 1 The primers and their designated applications in vector construction and RT-qPCR

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	用途 usage
<i>AsIFNe2</i> -F/R	<u>CGCGGATCC</u> CAGAATTCAGT/ <u>CCCCTCGAGT</u> TATGCATTGGT	载体构建
<i>CcMx</i> -qF/R	ATCTGGTGGATAAGGGAAC/ CATCCTCTGTTAATGTGGC	RT-qPCR
<i>CcPKR</i> -qF/R	ACCTGAAGCCTCCAAAACATA/ GCATTCGCTCATCATTGTC	RT-qPCR
<i>CcViperin</i> -qF/R	GCAAAGCGAGGGTTACGAC/ CTGCCATTACTAACGATGCTGAC	RT-qPCR
<i>Ccβ-actin</i> -qF/R	GCTATGTGGCTCTTGACTTCGA/ CCGTCAGGCAGCTCATAGCT	RT-qPCR
SVCV-G-qF/R	GCTACATCGCATTCCTTTTGC/ GCTGAATTACAGGTTGCCATGAT	RT-qPCR
SVCV-N-qF/R	AACAGCGGCTTTACATGC/ CTAAGGCGTAAGCCATCAGC	RT-qPCR
SVCV-P-qF/R	TGAGGAGGAATGGGAATCAG/ AGCTGACTGTCGGGAGATGT	RT-qPCR
<i>AsIFNe1</i> -qF/R	GCTGCTGCTCATCGCTAGGAT/ TGTTCCATGCTGTCACCGAGTC	RT-qPCR
<i>AsIFNe2</i> -qF/R	AACCTTCACCGCACGACTTCT/ TGACGCTTCAGACTCCTGTTCT	RT-qPCR
<i>AsIFNe3</i> -qF/R	GGTAGCCGTGAGCCAGAGTT/ GGTAGCAGTTGCAGGACTCAGT	RT-qPCR
<i>AsIRF1</i> -qF/R	CCACAGCCGACAGCACAAAC/ TCAGGAAACCTTTGCCATTA	RT-qPCR
<i>AsIRF2</i> -qF/R	TCATCAGCAACCCCCCGAC/ TTGCCTTTGTGTCGTCATCG	RT-qPCR
<i>AsIRF3</i> -qF/R	ACCCCTCCCCCTTGCTTGATA/ GGTTGGTGTGTAATCTCCG	RT-qPCR
<i>AsIRF7</i> -qF/R	ACTCCTCTGCCTGATTTGA/ GTGTCCCGTAGATGCCCTTT	RT-qPCR
<i>AsMx</i> -qF/R	GGAATAGCCAGAAATCCAGTGGGA/ GTTTCGTTAGCACAGCCAGAGTTC	RT-qPCR
<i>AsViperin</i> -qF/R	TAAAAGACTCAGGCATGGAGAAG/ GACACTGCCAAAATGTCCAGGTA	RT-qPCR
<i>AsPKR</i> -qF/R	GAGAGACTCGGACAAGGATG/ GCGTACAATGTTGTCATGCTCA	RT-qPCR
<i>AsADAR4</i> -qF/R	ATCTGCCAGTATCTGTACAAGTC/ CATGAGCTCCCTCTTCTTGTCG	RT-qPCR
<i>Asβ-actin</i> -qF/R	CCTTCTGGGTATGGAATCTTGC/ CAGAGTATTTACGCTCAGGTGGG	RT-qPCR

注: 下划线部分分别为 *Bam*H I 和 *Xho* I 的酶切位点。

Notes: Underlined are the restriction sites of *Bam*H I and *Xho* I, respectively.

板中, 使用 2 mL 含 10% FBS 的 MEM 培养基培养细胞至形成致密的单层细胞后, 加入 1 μg/mL *rAsIFNe2* 或等体积的 PBS 继续培养 2 h。用 PBS 清洗 2 次后, 将测定好病毒滴度的 SVCV 用不含血清的 MEM 培养基稀释后按感染复数 (MOI) 为 1 的剂量感染细胞, 2 h 后换成含 2% FBS 的 MEM 培养基培养, 观察细胞的病变效应。在 24 和 48 h 时, 细胞用 PBS 清洗 2 次后收集至无 RNA 酶的 EP 管中, 保存于 -80 °C, 用于检测细胞中 SVCV 病毒的 *G*、*N* 和 *P* 基因的表达量。

1.6 RT-qPCR

利用 Primer premier 5 软件设计 RT-qPCR 引物 (表 1), 使用 TRIzol 法提取收集样品的总 RNA, 并使用定量 PCR 专用反转录试剂 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser [宝生物工程 (大连) 有限公司] 将 RNA 反转录成 cDNA, 以 *β-actin* 作为内参基因进行 RT-qPCR, 并以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 的方法计算定量结果。RT-qPCR 检测的反应体系: KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix 10 μL, 上下

游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, cDNA 4 μL, 无菌水 5 μL; 反应程序: 在 Step-one Plus real-time PCR system (ABI) 仪器设置 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 20 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。

1.7 数据分析

实验结果采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和最小显著差异法 (LSD) 比较不同数据组间的差异。所有结果均以平均值±标准差 (mean±SD) 表示。

2 结果

2.1 *rAsIFNe2* 蛋白表达及纯化

重组 pET-32a-*AsIFNe2* 质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 使用 IPTG 诱导蛋白表达。SDS-PAGE 电泳检测发现, 与未加 IPTG 诱导组相比, 加 IPTG 诱导组出现明显的目标蛋白表达条带, 大小与预测一致约为 33 ku (图 1-a)。此外, *rAsIFNe2* 主要以可溶性表达为主, 并且可以通过 Ni

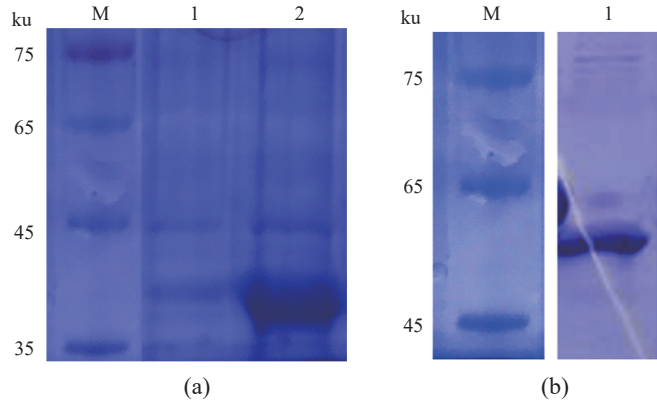


图1 rAsIFNe2 蛋白表达及纯化结果

(a) rAsIFNe2 蛋白小量表达结果, M. 蛋白 marker, 1. 未加 IPTG 诱导组, 2. 加 IPTG 诱导组; (b) rAsIFNe2 蛋白纯化结果, M. 蛋白 marker, 1. 纯化的 rAsIFNe2 蛋白。

Fig. 1 Expression and purification results of rAsIFNe2

(a) small-scale expression of rAsIFNe2 protein, M. protein marker, 1. uninduced group, 2. IPTG-induced group; (b) purification results of rAsIFNe2 protein, M. protein marker, 1. purified rAsIFNe2 protein.

亲和层析的方法获得较纯的 rAsIFNe2 蛋白 (图 1-b)。

2.2 rAsIFNe2 诱导中华鲟 ISGs 表达变化

为了验证 AsIFNe2 蛋白的生物活性, 在中华鲟细胞系中添加终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 rAsIFNe2, 通过 RT-qPCR 检测了是否影响 ISGs (*ADAR4*、*PKR*、*Viperin* 和 *Mx*) 的表达 (图 2)。结果显示, 中华鲟细胞在受到 rAsIFNe2 处理后, *Viperin* 和 *Mx* 的表达从 3~24 h 都表现出显著上调 ($P < 0.05$), 并且都在 24 h 达到峰值, 分别上调 669.01 倍 ($P < 0.01$) 和 460.95 倍 ($P < 0.01$)。此外, rAsIFNe2 也上调了 *PKR* 和 *ADAR4* 的表达, 其中 *PKR* 在处理后的 6 h 表达上调最高 (42.76 倍, $P < 0.01$)。

2.3 rAsIFNe2 诱导中华鲟 IRFs 和 IFNes 的表达变化

为了验证 rAsIFNe2 蛋白是否影响 IRFs 的表达, 在中华鲟细胞中添加终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 rAsIFNe2 后, RT-qPCR 检测 IRFs 的表达 (图 3)。结果显示, 添加 rAsIFNe2 后中华鲟细胞中 *IRF1* 和 *IRF2* 都在 3 h 时开始显著上调表达 (分别为 5.31 倍和 2.26 倍, $P < 0.05$), 在 6 h 达到最高表达水平 (分别为 11.56 倍和 3.08 倍, $P < 0.001$) (图 3)。IRF3 和 IRF7 的表达在 rAsIFNe2 处理后表现出相同的趋势, 在 3 h 后出现显著上调并且一直持续到 24 h, 不同的是, IRF7 的表达量在受到 rAsIFNe2 诱导后的 6 h 上调了 1 083.07 倍 ($P < 0.001$), 而 IRF3 仅上调 9.72 倍 ($P < 0.001$) (图 3)。

为了进一步验证 rAsIFNe2 蛋白是否能够诱

导 IFNes (*IFNe1*、*IFNe2* 和 *IFNe3*) 的表达变化, 利用 RT-qPCR 检测了 rAsIFNe2 孵育后中华鲟细胞中 IFNes 的表达 (图 4)。结果显示, 当中华鲟细胞受到 rAsIFNe2 刺激后, 细胞中 *IFNe2* 的表达在 6 h 时先出现下调, 随后在 12 h 极显著上调 (119.15 倍, $P < 0.01$), 在 24 h 后恢复到正常水平。rAsIFNe2 刺激不仅能在鲟细胞中上调其自身表达, 还能在早期阶段上调细胞中 *IFNe1* 和 *IFNe2* 的表达 ($P < 0.01$), 随即在 6 h 后恢复到正常水平。

2.4 rAsIFNe2 抗 SVCV 病毒的活性

为验证 rAsIFNe2 蛋白的抗病毒活性, 实验选择 EPC 作为宿主细胞来研究 rAsIFNe2 能否抵抗 SVCV 感染。通过 RT-qPCR 检测, 发现 rAsIFNe2 能显著上调 EPC 细胞中 *Mx*、*PKR* 和 *Viperin* 的表达 (图 5), 表明 EPC 细胞可以作为 AsIFNe2 抗病毒活性的研究模型。

为了进一步确定 rAsIFNe2 的抗病毒活性, 实验比较了正常 EPC 细胞和受到 rAsIFNe2 处理后的 EPC 细胞应对 SVCV 病毒侵染的变化。结果显示, 正常 EPC 细胞在 24 h 和 48 h 时出现明显病变效应, 而 rAsIFNe2 孵育后的 EPC 细胞在受 SVCV 感染 24 h 后未出现明显病变效应, 在 48 h 出现轻微病变效应 (图 6-a)。同时通过 RT-qPCR 对 SVCV 病毒的 *G*、*N* 和 *P* 基因的定量结果发现, 与对照组相比, rAsIFNe2 处理组中 SVCV 病毒的 *G*、*N* 和 *P* 基因的表达量都显著下调 (图 6-b), 说明 rAsIFNe2 能有效保护 EPC 细胞抵抗 SVCV 病

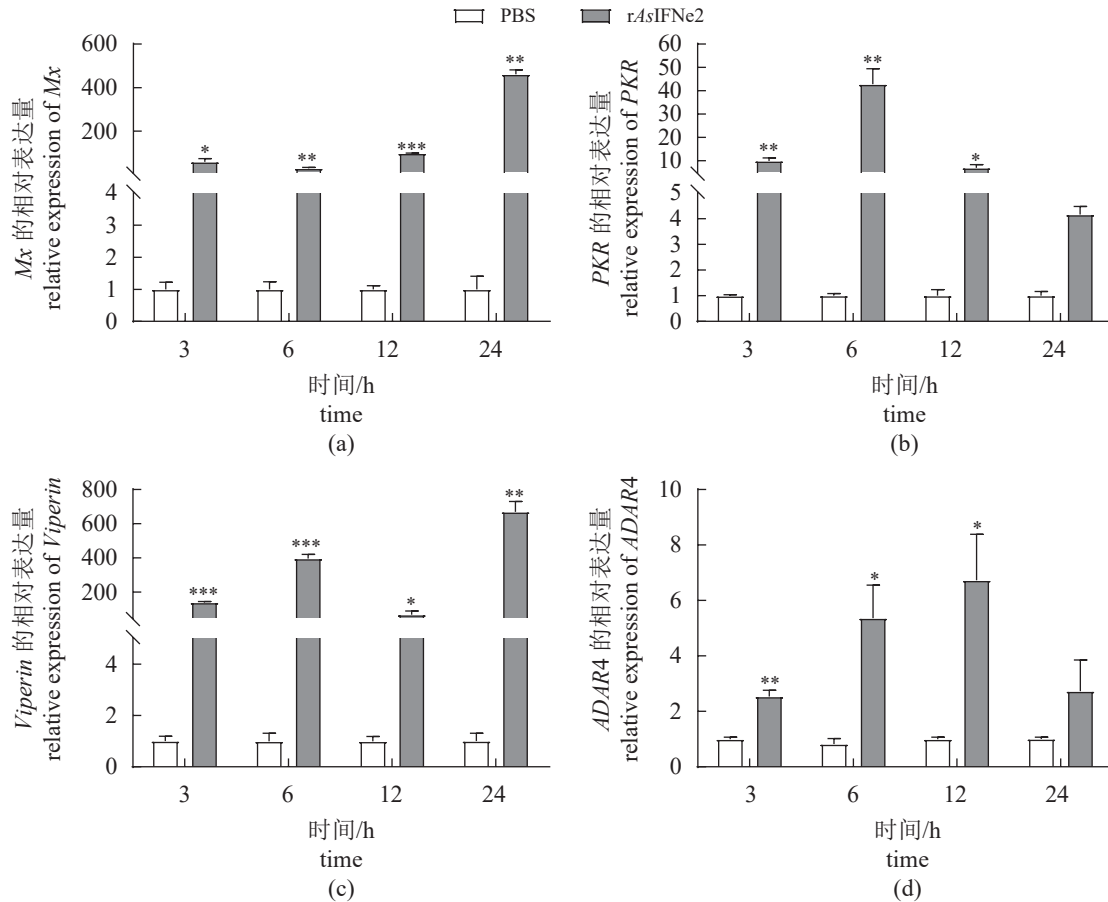


图 2 rAsIFNe2 蛋白诱导中华鲟鳍细胞中 ISGs 的表达变化

(a) *Mx*, (b) *PKR*, (c) *Viperin*, (d) *ADAR4*; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$; 下同。

Fig. 2 Expression of ISGs in fin cells of *A. sinensis* induced by rAsIFNe2

(a) *Mx*; (b) *PKR*; (c) *Viperin*; (d) *ADAR4*; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$; the same below.

毒的侵染。

3 讨论

IFNs 是一种具有抗病毒特性的细胞因子，在病毒感染后诱导宿主细胞产生免疫应答。干扰素的抗病毒功能已经在鱼类中进行了深入的研究。在金鱼 (*Carassius auratus auratus*) 中，IFNa2 和非糖基化突变体 IFNa2-N177Q 对 SVCV 和 GCRV 具有相似的抵抗能力。在大西洋鲑中，重组 IFNa、IFNb 和 IFNc 均能诱导细胞内抗病毒活性，而只有 IFNb 和 IFNc 对 SAV3 感染有保护作用。在大黄鱼中，过表达 IFNc、IFNd 和 IFNh 都能诱导石斑鱼脾细胞 (grouper spleen cells, GS) 中 *Mx*、*PKR* 和 *ISG15* 等抗病毒基因的表达，并且对石斑鱼虹彩病毒 (singapore grouper iridovirus, SGIV) 的复制增殖具有干扰作用^[15, 17, 32-33]。在受到 rAsIFNe2 的刺激之后，EPC 细胞中 *Mx*、*PKR* 和 *Viperin* 基因

的表达均显著上调表达，说明 *AsIFNe2* 能诱导 EPC 细胞的抗病毒活性并作为抗病毒研究的模型。在研究 *AsIFNe2* 抗病毒活性中，实验结果与大黄鱼和 大西洋鲑 IFNs 的结果一样，病变效应和 SVCV 病毒的增殖在 rAsIFNe2 孵育后的 EPC 细胞中都显著降低，表明重组 *AsIFNe2* 蛋白可以帮助 EPC 细胞抵御 SVCV 的感染，具备抗病毒活性。

中华鲟 IFNe2 的抗病毒活性在中华鲟鳍细胞中也有体现。在受到 rAsIFNe2 刺激后，中华鲟鳍细胞中 ISGs (*Mx*、*Viperin* 和 *PKR*) 的表达均显著上调，这与大黄鱼 IFNd 和 IFNh 诱导大黄鱼肾细胞 *Mx* 和 *PKR* 表达上调^[17]，大西洋鲑胞内 IFNa1/a2 诱导 *Mx* 表达上调一致^[34]。干扰素调节因子作为重要的转录因子可以调控 IFN 的转录，许多研究也表明 IFN 可以诱导 *IRFs* 的表达，同时促进 *IRF3* 和 *IRF7* 的磷酸化以扩大 IFN 的反应。例如 Sun 等^[18] 在异育银鲫 (*C. auratus gibelio*) 中过表达 IFN 导致 *IRF3* 在 12 h 和 24 h 时上调表达，并鉴

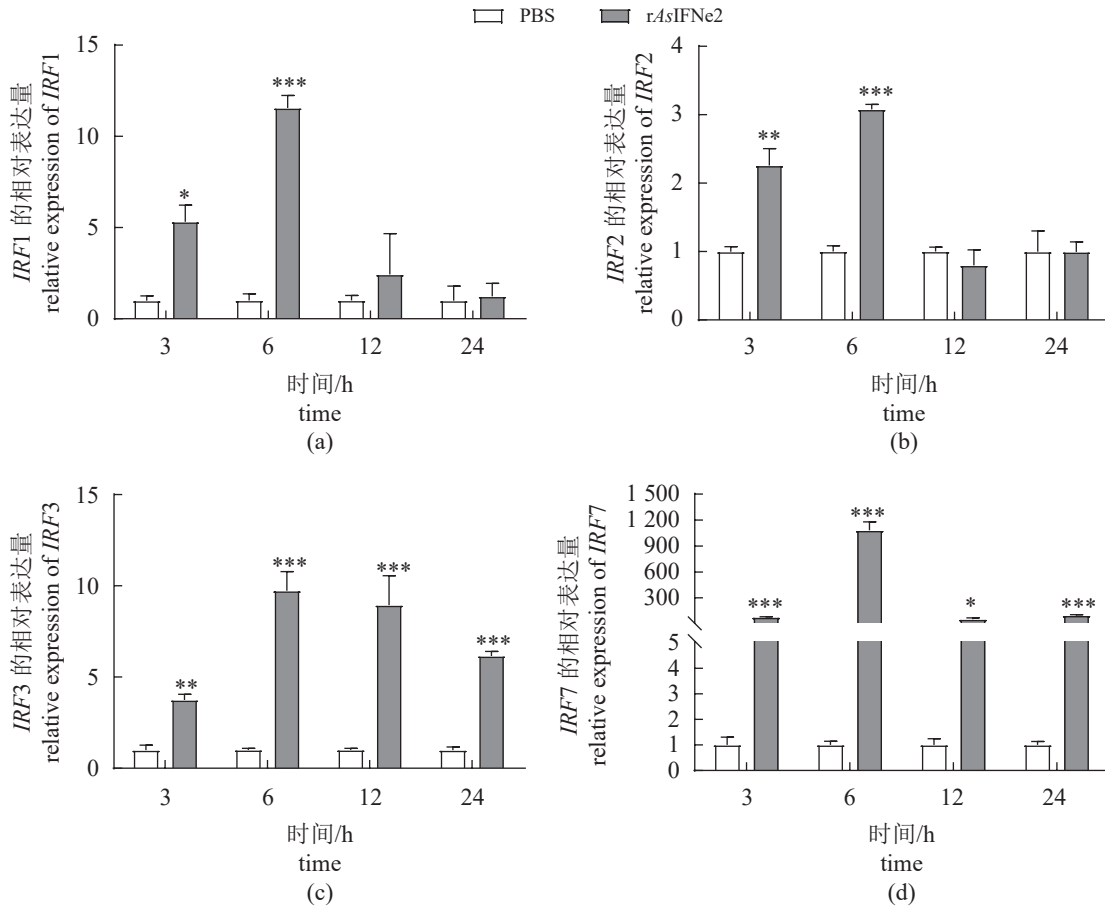


图 3 rAsIFNe2 诱导中华鲟鳍细胞中 IRFs 的表达变化

Fig. 3 Expression of IRFs in fin cells of *A. sinensis* induced by rAsIFNe2

(a) IRF1; (b) IRF2; (c) IRF3; (d) IRF7.

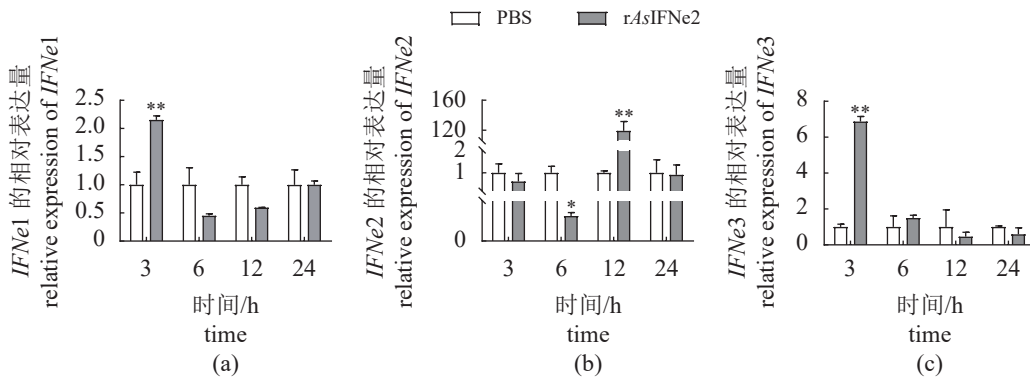


图 4 rAsIFNe2 蛋白诱导中华鲟鳍细胞中 IFNes 的表达变化

Fig. 4 Expression of IFNes in fin cells of *A. sinensis* induced by IFNe2 protein

(a) IFNe1; (b) IFNe2; (c) IFNe3.

定出 IRF3 不仅作为转录因子, 还作为一个典型的 ISG 而存在, 同时 IFN 也能够诱导异育银鲫 IRF3 磷酸化。在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中也发现重组 IFN 能在诱导后 24 h 上调 IRF1 的表达^[35]。在本研究中 rAsIFNe2 诱导 IRF1 和 IRF2 的早期表达,

这可能是在不同的鱼类物种中表现的表达差异。同时也发现, 与大黄鱼 IFNd 能刺激 IRF3 和 IRF7 的表达以及磷酸化相似^[17], 在受 rAsIFNe2 刺激后, 中华鲟鳍细胞中 IRF3 和 IRF7 持续上调表达至 24 h。以往的研究表明, 哺乳动物 IFN β 能调控其

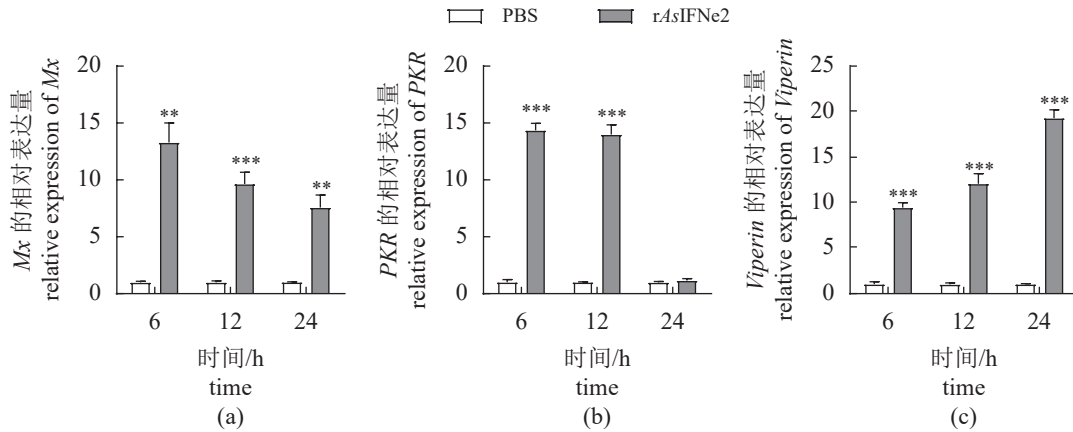


图 5 rAsIFNe2 蛋白诱导 EPC 细胞中 ISGs 的表达

Fig. 5 Expression of ISGs in EPC cells induced by rAsIFNe2

(a) *Mx*, (b) *PKR*, (c) *Viperin*.

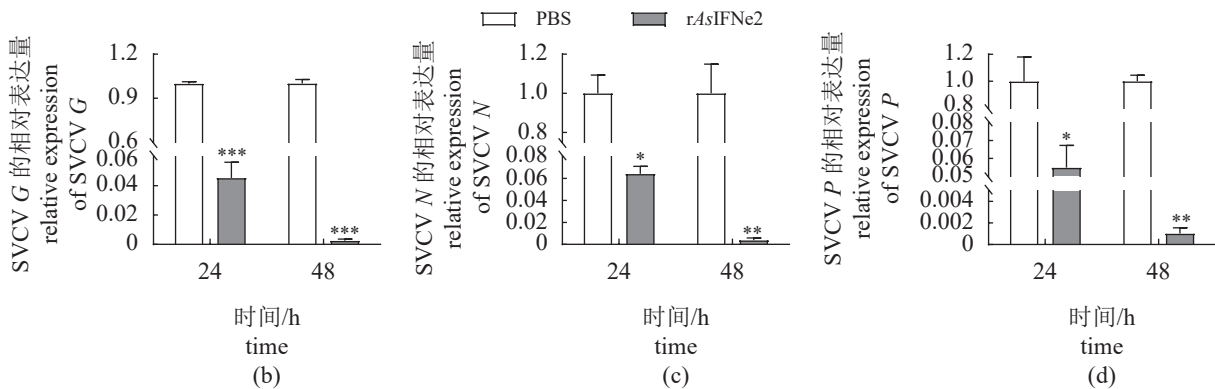
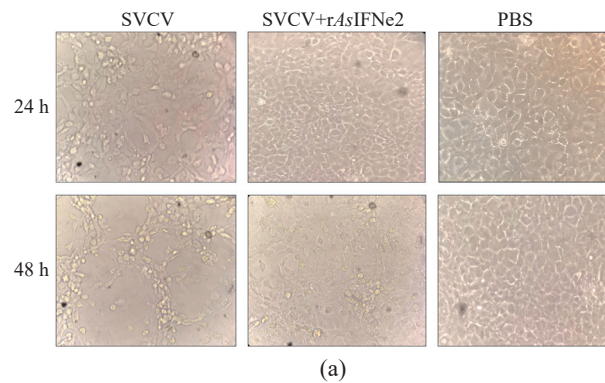


图 6 rAsIFNe2 的抗病毒活性 (×200)

(a) rAsIFNe2 的抗病毒活性, (b) SVCV-G, (c) SVCV-N, (d) SVCV-P.

Fig. 6 Antiviral activity of rAsIFNe2 (×200)

(a) antiviral activity of rAsIFNe2, (b) SVCV-G, (c) SVCV-N, (d) SVCV-P.

他 I 型 IFNs, 但不能直接诱导自身表达^[36-38]。而在鱼类中却发现 I 型 IFNs 可以显著诱导自身和其他 IFN 基因的表达, 例如在大黄鱼中, IFNd 能诱导 *IFNd* 本身和 *IFNh* 的表达, IFNc 也能诱导自身表达以及 *IFNd* 和 *IFNh* 的表达^[10, 16-17, 32]。此外, 鱼类 I 型 IFNs 不仅能诱导 *IRFs*、*ISGs* 等的表达, 还能显著上调一些模式识别受体 (如 *TLR*、*RIG-I*、

MDA5 和 *LGP2* 等) 的表达^[34]。与这些报道一样, rAsIFNe 诱导了其本身的表达, 并且在早期阶段诱导 *IFNe1* 和 *IFNe3* 的表达。上述研究表明, 鱼类 I 型 IFNs 可能通过刺激 *IRF* 的表达正反馈调节 IFNs 的免疫应答, 快速诱导 *Mx*、*Viperin* 和 *PKR* 等抗病毒基因的表达, 从而帮助宿主细胞快速建立抗病毒状态。

总之, 本实验发现 rAsIFNe2 可以刺激中华鲟细胞中 *Mx*、*PKR* 和 *Viperin* 的表达, 同时上调 IRFs, 尤其是 *IRF7* 的表达, 还能诱导其自身和其他 *IFNs* 的表达。rAsIFNe2 蛋白能够诱导 EPC 细胞的抗病毒状态并且保护 EPC 细胞抵抗 SVCV 的感染。综上表明, ① *AsIFNe2* 可能通过诱导 *IRF3* 和 *IRF7* 的表达而调控 IFN 的应答反应; ② rAsIFNe2 蛋白具备抗病毒活性。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Li S F, Gong M J, Zhao F R, *et al.* Type I interferons: distinct biological activities and current applications for viral infection[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 51(5): 2377-2396.
- [2] Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, *et al.* Type I interferons in anticancer immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(7): 405-414.
- [3] Chen S N, Gan Z, Hou J, *et al.* Identification and establishment of type IV interferon and the characterization of interferon- ν including its class II cytokine receptors IFN- ν R1 and IL-10R2[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 999.
- [4] Platanias L C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(5): 375-386.
- [5] Stark G R, Darnell J E Jr. The JAK-STAT pathway at twenty[J]. *Immunity*, 2012, 36(4): 503-514.
- [6] Paul A, Tang T H, Ng S K. Interferon regulatory factor 9 structure and regulation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1831.
- [7] Rengachari S, Groiss S, Devos J M, *et al.* Structural basis of STAT2 recognition by IRF9 reveals molecular insights into ISGF3 function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(4): E601-E609.
- [8] Chen J J, Guan Y Y, Guan H X, *et al.* Molecular and structural basis of receptor binding and signaling of a fish type I IFN with three disulfide bonds[J]. *The Journal of Immunology*, 2022, 209(4): 806-819.
- [9] Huang B, Wang Z X, Liang Y, *et al.* Identification of four type I IFNs from Japanese eel with differential expression properties and *Mx* promoter inducibility[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 91: 62-71.
- [10] López-Muñoz A, Roca F J, Meseguer J, *et al.* New insights into the evolution of IFNs: zebrafish group II IFNs induce a rapid and transient expression of IFN-dependent genes and display powerful antiviral activities[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(6): 3440-3449.
- [11] 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.
- [12] Liu F G, Bols N C, Pham P H, *et al.* Evolution of IFN subgroups in bony fish-1: group I -III IFN exist in early ray-finned fish, with group II IFN subgroups present in the holostean spotted gar, *Lepisosteus oculatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 95: 163-170.
- [13] Ding G Y, Yu P P, Deng D, *et al.* Functional characterization of group II interferon, IFN ν in the acipenseriform fish, Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024, 144: 109240.
- [14] Wu H, Liu L Q, Wu S Z, *et al.* IFN ν of black carp functions importantly in host innate immune response as an antiviral cytokine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 1-9.
- [15] Chang C J, Jenssen I, Robertsen B. Protection of Atlantic salmon against salmonid alphavirus infection by type I interferons IFN α , IFN β and IFN γ [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 57: 35-40.
- [16] Chang M X, Nie P, Collet B, *et al.* Identification of an additional two-cysteine containing type I interferon in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* provides evidence of a major gene duplication event within this gene family in teleosts[J]. *Immunogenetics*, 2009, 61(4): 315-325.
- [17] Ding Y, Ao J Q, Huang X H, *et al.* Identification of two subgroups of type I IFNs in perciforme fish large yellow croaker *Larimichthys crocea* provides novel insights into function and regulation of fish type I IFNs[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 343.
- [18] Sun F, Zhang Y B, Liu T K, *et al.* Characterization of fish IRF3 as an IFN-inducible protein reveals evolving regulation of IFN response in vertebrates[J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 185(12): 7573-7582.

- [19] Sun F, Zhang Y B, Liu T K, *et al.* Fish MITA Serves as a mediator for distinct fish IFN gene activation dependent on IRF3 or IRF7[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(5): 2531-2539.
- [20] Laghari Z A, Chen S N, Li L, *et al.* Functional, signalling and transcriptional differences of three distinct type I IFNs in a perciform fish, the mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 84: 94-108.
- [21] Zhang H, Wei Q W, Du H, *et al.* Present status and risk for extinction of the Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) in the Yangtze River watershed: a concern for intensified rehabilitation needs[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2011, 27(2): 181-185.
- [22] 郭柏福, 常剑波, 肖慧, 等. 中华鲟初次全人工繁殖的特性研究 [J]. *水生生物学报*, 2011, 35(6): 940-945.
- Guo B F, Chang J B, Xiao H, *et al.* The reproductive biology of first filial generation of acipenser sinensis growing up in the freshwater environment[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(6): 940-945 (in Chinese).
- [23] Ye H, Chen X H, Wei Q W, *et al.* Molecular and expression characterization of a *nanos1* homologue in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*[J]. *Gene*, 2012, 511(2): 285-292.
- [24] Zhang S H, Luo H, Du H, *et al.* Isolation and characterization of twenty-six microsatellite loci for the tetraploid fish Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*)[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2013, 5(2): 409-412.
- [25] 张四明, 晏勇, 邓怀, 等. 几种鲟鱼基因组大小、倍体的特性及鲟形目细胞进化的探讨 [J]. *动物学报*, 1999, 45(2): 200-206.
- Zhang S M, Yan Y, Deng H, *et al.* Genome size, ploidy characters of several species of sturgeons and paddlefishes with comment on cellular evolution of Acipenseriformes[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1999, 45(2): 200-206 (in Chinese).
- [26] Xie M, Deng D, Li Q, *et al.* Pathogenicity and detection method based on interferon release assay of *Mycobacterium marinum* isolated from sturgeon[J]. *Aquaculture*, 2023, 577: 739965.
- [27] Deng D, Mu Z Z, Lv X Y, *et al.* Pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* and *Citrobacter freundii* isolated from the endangered Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 173: 105818.
- [28] Yue H M, Li C G, Du H, *et al.* Sequencing and *De Novo* assembly of the gonadal transcriptome of the endangered Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0127332.
- [29] Zhu R, Du H J, Li S Y, *et al.* *De novo* annotation of the immune-enriched transcriptome provides insights into immune system genes of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 699-716.
- [30] Luo K, Di J, Han P P, *et al.* Transcriptome analysis of the critically endangered Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) head kidney response to *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 83: 249-261.
- [31] Xu Q Q, Luo K, Zhang S H, *et al.* Sequence analysis and characterization of type I interferon and type II interferon from the critically endangered sturgeon species, *A. dabryanus* and *A. sinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 390-403.
- [32] Ding Y, Guan Y Y, Huang X H, *et al.* Characterization and function of a group II type I interferon in the perciform fish, large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 152-159.
- [33] Yan J, Peng L Z, Chi M D, *et al.* IFN α 2 of triploid hybrid of gold fish and allotetraploid is an intracellular antiviral cytokine against SVCV and GCRV[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 62: 238-246.
- [34] Chang M X, Zou J, Nie P, *et al.* Intracellular interferons in fish: a unique means to combat viral infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(11): e1003736.
- [35] Feng H, Zhang Y B, Zhang Q M, *et al.* Zebrafish IRF1 regulates IFN antiviral response through binding to IFN ϕ 1 and IFN ϕ 3 promoters downstream of MyD88 signaling[J]. *The Journal of Immunology*, 2015, 194(3): 1225-1238.
- [36] Takaoka A, Mitani Y, Suemori H, *et al.* Cross talk between interferon- γ and $-\alpha/\beta$ signaling components in caveolar membrane domains[J]. *Science*, 2000, 288(5475): 2357-2360.
- [37] Deonarain R, Alcamí A, Alexiou M, *et al.* Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(7): 3404-3409.

- [38] Kawai T, Sato S, Ishii K J, *et al.* Interferon- α induction of IRF7 with MyD88 and TRAF6[J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(10): 1061-1068.

Antiviral innate immune function of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) IFNe2

LI Youshen¹, DING Guangyi¹, ZHANG Shuhuan², GUO Huizhi¹,
ZHOU Jiang¹, LUO Kai^{1*}, XU Qiaoqing^{1*}

(1. Institute of Chinese Sturgeon Disease, Yangtze University, Jingzhou 434020, China;

2. Sturgeon Healthy Breeding and Medicinal Value Research Center,

Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract: Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) is a critically endangered fish species found in the Yangtze River of China, for which there is scarce immunological research. Type I interferons (IFNs) are widely recognized as pivotal cytokines in the host's antiviral immune response. Therefore, the present study aimed to investigate the immune function of interferon e2 in *A. sinensis* (rAsIFNe2). The recombinant *A. sinensis* interferon e2 protein (rAsIFNe2) was expressed through prokaryotic expression, and its effects on antiviral-related genes and its antiviral activity were analyzed. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) results showed that rAsIFNe2 significantly activated the expression of interferon-stimulated genes (ISGs) in *A. sinensis* fin cells, such as *Mx*, *Viperin*, *PKR*, and *ADAR4* with 460.95-fold and 669.01-fold changes at 24 h, a 42.76-fold change at 6 h, and 6.72 fold change at 12 h of incubation, respectively. Furthermore, rAsIFNe2 also helped host cells establish an antiviral state by activating the expression of *IRF1*, *IRF2*, *IRF3*, *IRF7*, *IFNe1*, *IFNe2* and *IFNe3* genes with increases by 11.56, 3.08, 9.72 and 1 083.07 times at 6 h, a 2.15-fold change at 3 h, a 119.15-fold change at 12 h, and a 6.88 fold change at 3 h of incubation, respectively. In the spring viremia of carp virus (SVCV)-infected carp epithelial cells (EPC) model, rAsIFNe2 induced the expression of *Mx*, *PKR*, and *Viperin* in EPC cells with 13.29-fold and 14.36-fold changes at 6 h, and a 19.25-fold change at 24 h of infection. The SVCV virus *G*, *N*, and *P* genes in EPC cells were significantly downregulated by rAsIFNe2 with 388.50, 259.74 and 979.91-fold changes after 24 h, thereby reducing the lesions. These results indicate that AsIFNe2 plays a role in the host's antiviral innate immune response, providing a theoretical basis for understanding the interferon immune system of *A. sinensis* and treating viral diseases.

Key words: *Acipenser sinensis*; interferon; antiviral activity; spring viremia of carp virus; immunoregulation

Corresponding authors: LUO Kai. E-mail: luokaiyxj@yangtzeu.edu.cn;

XU Qiaoqing. E-mail: xuqiaoqing@yangtzeu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32260925); Guizhou Provincial Department of Science and Technology Project (Qian-ZK[2022] 507)