维普资讯 http://www.cqvip.com

⑦ 163-169

第15卷第2期 中国病毒学 Vol.15 No.2
2000年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 2000

鲫鱼囊胚细胞干扰素的诱导及部分特性*

S943.117
Q511

张义兵，王铁辉，李戈强，贾方钧，俞小牧
（中国科学院水生生物研究所，武汉 430072）

摘要：用紫外线灭活的草鱼呼肠孤病毒(GCRV)诱导鲫鱼囊胚细胞(CAB)能产生一种高滴度的抗病毒物质。这种物质在56℃及pH 2～11稳定；对胰蛋白酶敏感；抗病毒活性受被保护细胞的密度、培养温度及保护时间的影响；不能被GCRV的特异性抗体中和；无直接杀病毒作用；抗病毒机制依赖于细胞内RNA和蛋白质的合成；在多种鱼类培养细胞中具有抑制病毒作用。这些特性与哺乳类α/β干扰素一致，是一种鲫鱼干扰素。

关键词：CAB细胞系；草鱼呼肠孤病毒；鲫鱼干扰素
中图分类号：S943.117 **文献标识码**：A **文章编号**：1003－5125(2000)02－0163－07

自1957年发现干扰素(Interferon, IFN)后，陆续有关于鱼类干扰素的报道[1~9]。干扰素是一种细胞因子，不仅有广泛的抗病毒活性，而且还有明显的免疫调节等功能。鱼类培养细胞[1~3]和鱼体[4,5]接种病毒后都能诱导产生干扰素。利用鱼类干扰素基因或相关基因进行基因工程抗病毒病育种，是解决鱼类抗病育种的一条途径，为此我们开展了鱼类干扰素的研究，发现经紫外线灭活的草鱼呼肠孤病毒(GCRV)是一种高效诱导剂，能诱导几种鲤科鱼类细胞产生高滴度的抗病毒活性物质[10]，对从鲫鱼囊胚细胞(CAB)中诱导的抗病毒物质的主要生物学特性、理化特性及抗病毒机制进行了研究，表明是鲫鱼干扰素。本文报道这一研究结果。

1 材料与方法

1.1 细胞

鲫鱼囊胚细胞系(CAB)[11]、草鱼囊胚细胞系(GCB)、稀有鮈鲫胚胎细胞系(GRE)、草鱼肾细胞系(GCK)、甲鱼蹼细胞(CTW)均由本实验室建立；草鱼肾细胞系(CIK)[12]由中国科学院长江水产研究所建立。细胞用10%新生牛血清(杭州四季青产品，使用时56℃灭活30 min)的TC-199(GIBCO产品)培养基置28℃培养[13]，CTW培养于30℃培养箱。

1.2 病毒

草鱼呼肠孤病毒GCRV(原称草鱼出血病病毒GCHV)[14]和甲鱼虹彩病毒STIV[15](深圳市动植物检疫局江育林研究员惠赠)分别在CIK细胞和CAB细胞上繁殖并检测病毒滴度。

1.3 抗病毒物质的诱导

紫外线灭活GCRV采用本实验室方法[10]，灭活前病毒滴度为$5\times10^9 TCID_{50}/mL$。CAB细胞按常规方法

收稿日期：1998－12－18，修回日期：1999－06－07
* 基金项目：中国科学院重点项目(KY95-J1-316)；国家自然科学基金资助项目(39870602)。
作者简介：张义兵(1969年－)，男，硕士，主要从事鱼类遗传学的研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

传代[13],28 ℃培养,4 d长成致密单层。去掉细胞培养上清液,用无血清培养基洗1次,加入紫外线灭活的GCRV(诱导病毒剂量为病毒灭活前100 $TCID_{50}$/细胞)于28 ℃吸附2 h。去掉诱导病毒液,用无血清培养基洗3次,再加入无血清培养基,28 ℃继续培养细胞2 d,收集细胞培养上清液,用35 000 r/min超离心去除残余的诱导病毒,以孔径为10 nm的微孔滤器过滤细胞碎片后即抗病毒物质样品,供抗病毒滴度的检测及其它实验用。

1.4 抗病毒物质及抗病毒滴度的检测

采用微量细胞病变(CPE)抑制法[10],除非特别说明均在CAB细胞上检测。细胞传代于96孔板(Nunc产品)24 h后,去掉培养基,加入用维持液3×系列稀释的抗病毒物质样品。每个稀释度3孔,每孔0.1 mL。8 h后加入10 000 $TCID_{50}$/孔的GCRV。同时设不加抗病毒物质样品的病毒对照与不加病毒的细胞对照。24 ℃培养2 d后,待病毒对照孔细胞CPE完全时,固定、染色。以抑制50%CPE出现的最高稀释度作为一个抗病毒单位,抗病毒物质的滴度用u/mL表示。

1.5 GCHV兔抗血清的制备

参照文献[16]方法。

1.6 抗病毒物质的理化特性分析

抗病毒物质分别经如下处理:(1)温度:56 ℃ 2 h,60 ℃ 1 h,65 ℃ 1 h,70 ℃ 1 h;(2)pH 2和pH 11处理72 h,4 ℃;(3)冻融处理:1次,3次,6次,9次;(4)乙醚处理4 ℃,30 min;(5)酶处理:分别用DNase 100 μg/mL,RNase 100 μg/mL,Trypsin 500 μg/mL,在37 ℃处理2 h;(6)紫外线室温处理30 min,然后检测抗病毒活性。

1.7 DNA抑制剂对抗病毒物质抗病毒效应的影响

用ActD处理96孔板单层细胞10 h后加入抗病毒物质样品,设加ActD的正常细胞对照与加ActD和GCRV的病毒对照,结果与未加ActD的样品作比较,观察抗病毒物质的抗病毒滴度变化。

2 结果

2.1 抗病毒物质的诱导

GCRV在紫外线照射5 min后全部失活[10]。灭活的GCRV诱导CAB细胞的培养上清液,经35 000 r/min超速离心、过滤去除残余病毒和细胞碎片后,能诱导多种鲤科鱼类培养细胞CAB、CIK、GCB、GRE对GCRV的抗性,其中对CAB、GCB、GRE细胞的保护作用尤为明显(表1),表明灭活的GCRV能诱导CAB细胞产生高滴度的抗病毒活性物质。抗病毒物质的诱导产量受诱导温度、细胞日龄、血清及病毒诱导剂量等因素的影响,ActD具有超诱导作用,诱导产生的抗病毒物质具有启动效应[10]。

表1 抗病毒物质在几种鲤科鱼类培养细胞中对GCRV的抑制作用

Table 1 Activity of antiviral substance to GCRV in several cultured fish cell lines

细胞系 Cell line	CAB	CIK	GCB	GRE
抑制滴度 Inhibition titer (u/mL)	8 875	14	4 992	14 061

2.2 几种因素对抗病毒活性的影响

实验中发现,当所获得的抗病毒物质浓度(在CAB细胞上的最初效价为2 500 u/mL)和攻击病毒剂量(10 000 $TCID_{50}$/孔)一定时,抗病毒物质的抗病毒活性受细胞密度、细胞培养温度及与受体细胞混合培养时间的影响。

2.2.1 细胞密度

在96孔板中,细胞密度高于2×10^4细胞/孔,能铺成致密、光滑的单层。细胞密度过高,细胞培养液的pH容易过酸,影响抗病毒物质的抗病毒活性(表2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2　不同细胞密度对抗病毒物质活性的影响

Table 2　Effect of CAB cell density on the activity of antiviral substance

细胞密度 Cell density (× 10^4 cells/well)	2.5	5	7.5	10
抑制滴度 Inhibition titer (u/mL)	1 950	2 100	2 020	860

2.2.2　培养温度

图 1 表明,培养温度高于 24 ℃时,抗病毒物质对细胞的保护作用显著降低,由于本实验室鱼类细胞培养的最适温度为 28 ℃,因此在检测抗病毒物质的抗病毒活性时细胞培养温度改为 24 ℃。

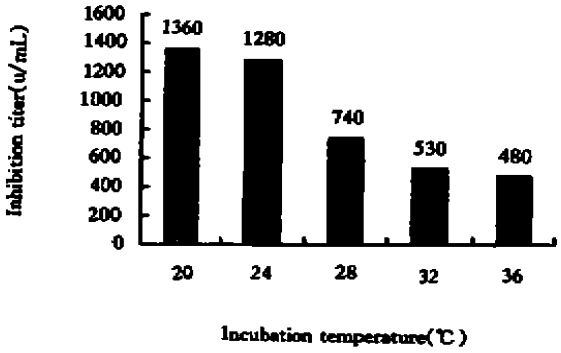

图 1　细胞培养温度对抗病毒物质活性的影响

Fig. 1　Effect of incubation temperature on the activity of antiviral substance in CAB cells

2.2.3　保护细胞的时间

加入 GCRV 前,抗病毒物质与细胞共同培养 9 h,对细胞的保护作用逐步增加,16 h 后趋于稳定。这表明抗病毒活性是随着抗病毒物质对细胞诱导时间的延长而增加,细胞必须经一段时间诱导后,才处于最佳抗病毒状态(图 2)。

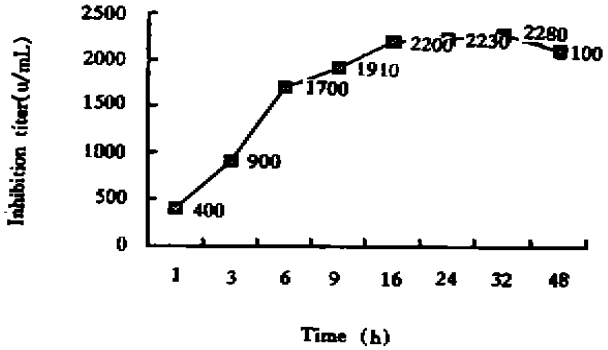

图 2　抗病毒物质与 CAB 细胞共同培养时间对其抗病毒活性的影响

Fig. 2　Effect of incubation time of antiviral substance with CAB cells before GCRV challenge on the activity of antiviral substance

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 抗病毒物质的理化特性分析

抗病毒物质经各种理化因子处理后，其抗病毒活性如表3。结果表明，这种抗病毒物质不受DNase 1、RNase的破坏，对Trypsin敏感，因此是一种蛋白质。耐强酸、强碱，56 ℃处理2h抗病毒活性不降低，4 ℃下存放20个月，其抗病毒活性仍保持最初的10%，对温度有一定稳定性。同时抗病毒活性也不受乙醚和紫外线照射等影响。

表3 几种理化因子对抗病毒物质活性的影响

Table 3 Influence of some physiochemical factors on the activity of antiviral substance

处理方法 Treatment	抑制滴度 Inhibition titer (u/mL)	
	实验组 Test group	对照组 Control group
56 ℃, 2h	1 773	1 773
60 ℃, 1 h	561	1 773
65 ℃, 1 h	561	1 773
70 ℃, 1 h	178	1 773
4 ℃, 20 months	178	1 773
pH 2, 4 ℃, 3 d	1773	1 773
pH 11, 4 ℃, 3 d	1 773	1 773
Freezing-thawing 1, 3, 6, 9 times	1 773	1 773
DNase 1, 37 ℃, 2 h	1 773	1 773
RNase, 37 ℃, 2 h	1 773	1 773
Trypsin, 37 ℃, 2 h	0	1 773
Ether, 4 ℃, 30 min	1 773	1 773
Ultraviolet, 30 min	1 773	1 773

2.4 GCRV兔抗血清对抗病毒物质活性的影响

抗病毒物质(在CAB细胞上的最初效价1 773 u/mL)与抗GCRV兔血清(在CAB细胞上的效价为3 380 u/mL)等体积混合，置28 ℃、4 h后检测抗病毒活性。实验表明，GCRV特异性抗体不能中和该物质的抗病毒活性(表4)。

表4 GCRV兔抗血清对抗病毒物质活性的影响

Table 4 Effect of rabbit anti-GCRV serum on activity of antiviral substance

处理方法 Treatment	抑制滴度 Inhibition titer (u/mL)
200 μL antiviral substance + 200 μL anti-GCRV serum	560
200 μL antiviral substance + 200 μL TC-199	560

2.5 抗病毒物质对病毒滴度的直接影响

以往的研究表明，干扰素保护细胞并非直接杀伤病毒，而是诱导宿主细胞处于抗病毒状态，抑制病毒在宿主细胞中的复制[17]。本实验中，将抗病毒物质(在CAB细胞上的最初效价为1 773 u/mL)与等体积的GCRV(滴度为1 000 000 $TCID_{50}$/mL)混合，置28 ℃，48 h后测定病毒滴度。结果表明滴度只有轻微降低(表5)，证实抗病毒物质的抗病毒作用并非直接灭活病毒或中和病毒活性。但是抗病毒物质与病毒同时加入，又能诱导CAB细胞对GCRV一定程度的抗性。

2.6 DNA抑制剂对抗病毒物质抗病毒效应的影响

干扰素的一个重要特性是其对病毒的抑制作用通过对细胞内转录和转译水平的调控途径来完成[4,17~19]。ActD是一种DNA抑制剂，它通过与细胞内DNA结合而抑制依赖于DNA的

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 5　抗病毒物质对病毒滴度的直接影响

Table 5　Direct effect of antiviral substance on GCRV titers

处理方法 Treatment	病毒滴度 Viral titer ($TCID_{50}$/mL)
200 μL antiviral substance + 200 μL GCRV	$10^{5.5}$
200 μL TC-199 + 200 μL GCRV	$10^{5.8}$

RNA 合成,低浓度的 ActD 对细胞无毒性,对病毒在细胞中增殖引起的 CPE 无明显的抑制作用。细胞经不同浓度的 ActD 处理 10 h,再加入抗病毒物质(效价为 1 773 u/mL),结果其抗病毒活性全部消失或滴度显著降低(表 6)。这表明抗病毒物质的抗病毒机制依赖于细胞内 RNA 和蛋白质的合成。

表 6　ActD 对抗病毒物质活性的影响

Table 6　Effect of ActD on activity of antiviral substance

ActD 浓度	ActD concentration (μg/mL)	0.1	0.01	0.001	0.0001
抑制滴度	Inhibition titer (u/mL)	0	0	<5	<5

7　抗病毒物质对不同细胞和病毒的作用

GCRV 是一种 RNA 病毒[14],STIV 是一种 DNA 病毒[15]。抗病毒物质能不同程度地诱导多种鲤科鱼类培养细胞对 GCRV 的抗性,也能诱导 CAB、GCB 对 STIV 的抗性,表明在鱼类培养细胞对 DNA 病毒和 RNA 病毒都有抑制作用。但不能抑制 STIV 在 CTW 细胞中的繁殖。两种草鱼肾脏细胞 CIK 和 GCK 对抗病毒物质表现出不同的敏感性(表 7)。

表 7　抗病毒物质对不同细胞和病毒的作用

Table 7　Activity of antiviral substance to different virus in different cell lines

细胞系 Cell line	攻击病毒 Virus	抑制滴度 Inhibition titer (u/mL)
CAB	GCRV	8 875
GRE	GCRV	14 061
GCB	GCRV	4 992
CIK	GCRV	14
GCK	GCRV	561
CTW	STIV	0
CAB	STIV	500
GCB	STIV	997

3　讨论

干扰素系统在生物界普遍存在。哺乳类干扰素分为 3 种:α、β 和 γ 干扰素,其中 α 和 β 干扰素有相同的起源统称为 Ⅰ 类干扰素,γ 干扰素为 Ⅱ 类干扰素[17]。当用病毒等诱导剂诱导时,鱼类也可以产生干扰素。体外培养的 FHM 细胞[1]、虹鳟性腺细胞 RTG-2[9]、虹鳟鱼[5]受病毒感染后能产生干扰素。深入研究表明,这些诱导产生的干扰素耐酸、耐热,分子量在 26～94 kDa、等电点在 5.4～7.1 之间[20,21]。鱼类干扰素的这些理化特性、产生机制以及诱导细胞的起源与高等脊椎动物的 Ⅰ 类干扰素相似[2,6]。除此之外,Graham[6]等认为鱼类还存在 Ⅱ 类干扰素,他们从用 ConA 诱导的虹鳟白细胞上清液中发现巨噬细胞因子(MAF)和干扰素活性(在细胞上的抗病毒活性)同时存在和消失,证明 MAF 和干扰素活性物质实际上是同一种蛋白质,并且不耐酸(pH2),对温度敏感(60 ℃),而所有这些特性与哺乳类 γ 干扰素一致。

近年来,我国江育林等[18]用大马哈鱼呼肠孤病毒(CSV)从草鱼性腺细胞(CO)以及邵建

维普资讯 http://www.cqvip.com

忠等[19]用草鱼呼肠孤病毒(GCRV)从人工诱变的抗草鱼呼肠孤病毒细胞株 AHZC88 中分别诱导出抗病毒活性的类干扰素物质;Murakami 等[8]从人工转化的牙鲆白细胞中诱导、纯化出干扰素并克隆出干扰素基因;Snegaroff[7]发现多种病毒都具有从虹鳟白细胞中诱导干扰素的能力。所有这些都表明,鱼类干扰素确实存在,且分为不同种类,当细胞与机体受病毒感染时就会产生。

呼肠孤病毒是一种高效的干扰素诱导剂。紫外线灭活的呼肠孤病毒感染细胞后,在细胞内降解释放 dsRNA,从而诱导干扰素的产生[22]。我们用紫外线灭活的 GCRV 从 CAB 等五种鲤科鱼类细胞中能诱导出高滴度的抗病毒物质,也可能有类似机理,诱导时 ActD 的超诱导现象和抗病毒物质的启动作用等与哺乳类干扰素产生机制一致[10]。我们对 CAB 中诱导产生的抗病毒物质的深入研究表明,该物质是一种蛋白质,在多种鱼类培养细胞中对 GCRV 及 STIV 有抑制作用,但在 CTW 细胞中对 STIV 无抑制作用。GCRV 特异性抗体不能中和其抗病毒活性,其保护细胞并非直接杀伤病毒,而是诱导细胞成为抗病毒状态,即抗病毒机制依赖于受体细胞 RNA 和蛋白质的合成,所有这些特性和诱导机制、抗病毒机制表明,这种用病毒诱导产生的抗病毒物质是一种鲫鱼干扰素。由于鲫鱼干扰系诱导于囊胚细胞,对温度不敏感,活性在 pH2～11 稳定,又与哺乳类 α/β 干扰素特性一致。

干扰素的抗病毒作用离不开细胞膜上的特异性受体,有实验表明对干扰素不敏感的细胞是因为缺少高亲和性的干扰素受体[17]。CIK 细胞对鲫鱼干扰素不敏感,尤其是对自身来源的干扰素,检测滴度为 0(结果未列出),是否因为 CIK 细胞在本实验室传代十多年,干扰素受体发生了变异,还有待进一步研究。我们用获得的鲫鱼干扰素在草鱼鱼体中的抗 GCRV 感染作用表明,干扰素对防治草鱼出血病具有一定的效果(结果另文报道)。因此,无论是运用干扰素防治还是利用干扰素基因进行抗病育种,对防治乃至根治鱼类病毒病都有诱人的应用前景。

参 考 文 献

[1] Gravell M, Marlsberger RG. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Annals of the New York Academy of Science, 1965, 126:555～565

[2] Beasley AR, Sigel MM, Clem LW. Latent infection in marine fish cell tissue cultures [J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1966, 121:1169～1174

[3] Oie HK, Loh PC. Reovirus Type 2: Induction of viral resistance and interferon production in fathead minnow cells [J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1971, 136:369～373

[4] de Kinkelin P, Dorson M. Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus [J]. Journal of General Virology, 1973, 125～127

[5] de Kinkelin P, Dorson M, Hattenberger-Baudouy AM. Interferon synthesis in trout and carp after viral infection [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1982, 2(suppl), 167～174

[6] Graham S, Secombes CJ. Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma [J]. Journey of Fish biology, 1990, 36:563～573

[7] Snegaroff J. Induction of interferon synthesis in rainbow trout leukocytes by various homeotherm viruses [J]. Fish and Shellfish Immunology, 1993, 3:191～198

[8] Murakami H, Tamai T, Shirahata S. Immortalization of fish lymphocytes and fish interferon gene [J]. Fish Pathology, 1995, 30(2):175～180

[9] Okamoto N, Shirakura T, Nagakura Y, *et al*. The mechanism of interferon with fish viral infection in the RTG-2 cell line

维普资讯 http://www.cqvip.com

[J]. Fish Pathology, 1983, 18:7～12
[10] 王铁辉,张义兵,李戈强,等.鱼类培养细胞干扰素的诱导[J].病毒学报,1999,15(1):43～49
[11] 陈敏容,陈宏溪,易咏兰.鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性[J].水产学报,1985,9(2):121～130
[12] 左文功,钱华鑫,许映芳,等.草鱼肾脏组织细胞系CIK的建立[J].淡水渔业,1984,(2):38～39
[13] 邓初夏,杨兴棋,陈宏溪.几种鱼类细胞对草鱼呼肠孤病毒敏感性的研究[J].水生生物学报,1985,9(4):351～358
[14] 柯丽华,方勤,蔡宜权.一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性[J].水生生物学报,1990,14(2):153～159
[15] 陈在贤,郑坚川,江育林.从患红脖子病甲鱼体内分离到一株虹彩病毒[J].中国兽医学报,1998,18(2):135～139
[16] 闵淑琴,洪世雯,蔡宜权.鱼呼肠孤病毒(FRV)抗血清的制备及其应用[J].水产学报,1986,10(4):383～387
[17] Joklik WK. Interferon [M]. In: Fields BN, Knipe DM, *et al*. Virology, Second edition. New York: Raven Press Ltd, 1990.383～410
[18] 江育林,李正钦.病毒感染的草鱼细胞产生类干扰素物质的研究[J] 病毒学报,1991,7(1):30～35
[19] 邵建忠,项黎新,李亚南,等.从草鱼细胞分离到一种抗出血病病毒蛋白因子的研究[J].病毒学报,1993,9(4):352～362
[20] DeSena J, Rio GJ. Partial purification and characterization of RTG-2 fish cell interferon [J]. Infection and Immunity. 1975, 11:815～822
[21] Dorson M, Brade A, de Kinkelin P. Egtved virus induced rainbow trout serum interferon: some physicochemical proprieties [J]. Ann Microbiol (Institute Pasteur), 1975, 126B:485～589
[22] Lai MT, Jokilik WK. The induction of interferon by temperature-sensitive mutants of reovirus, UV-irradiated reovirus, and subviral reovirus particles [J]. Virology, 1973, 51:191～204

Induction and Partial Characterization of CAB Fish Cell (Blastulae Embryonic Cell Line of Crucian Carp) Interferon

ZHANG Yi-bing, WANG Tie-hui, LI Ge-qiang, JIA Fang-jun, YU Xiao-mu
(*Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072, *China*)

Abstract: The Antiviral substance was induced from blastulae embryonic cell line of crucian carp (CAB) by ultra-violet inactivated grass carp reovirus (GCRVuv). This substance was sensitive to trypsin and stable at 56 ℃ pH 2—11. The activity of this substance was influenced by target cell density, incubation temperature and time with CAB cells, but not decreased by treatment of the special antibody of GCRV. This substance couldn't kill virus directly, but showed anti-GCRV and anti-STIV activity in various cultured fish cells. Inhibition of viral replication in cells was dependent on the process of cellular RNA transcription and protein synthesis. These characteristics consist with IFN alpha/beta of mammals, and the substance is a kind of crucian carp interferon.
Key words: CAB cell line; Grass carp reovirus; Crucian carp interferon