

草鱼干扰素诱生条件的研究

邵健忠 项黎新 李亚南

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

摘要 草鱼干扰素(IFN)诱生条件与规律的研究结果显示,病毒侵染草鱼后能迅速诱导IFN的合成,24h即可在血清中检测到IFN活性,3d后活性达到高峰。草鱼IFN的合成受温度、病毒种类、病毒剂量、鱼体营养状况等因素的影响。25℃水温下诱生的IFN活性明显高于15℃和8℃。RNA病毒的诱生能力高于DNA病毒,其中以双链RNA病毒GCHV的诱生能力最强。在急性致死剂量以下提高病毒感染剂量以及维持鱼体的正常营养状况,有利于提高IFN的产量。用适量IFN或灭活GCHV预注射草鱼,作起动或预诱导处理,能显著促进IFN的诱生。病毒活性、鱼龄大小对IFN的诱生无显著影响。

关键词 草鱼,干扰素,诱生条件

干扰素(Interferon, IFN)是机体细胞经病毒等诱导而产生的一种重要的细胞功能调节因子,具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等功能,是现代生物学研究中一个十分活跃的领域。但目前对IFN的研究主要见诸人类和高等脊椎动物,鱼类中的工作尚处于起步阶段。60年代以来,国外曾报道了黑头软头鲈(*Pimephales promelas*)、虹鳟和牙鲮等鱼类产生IFN的研究[Gravell和Malsberger 1965, Oie和Loh 1971, De-Kinkel和Dorson 1973, Graham和Secombes 1990, Rogel-Gaillard和Chilmonczyk 1993, Tamai等1993],国内也曾在草鱼性腺细胞中检测到IFN因子[江育林和李正秋1991],但未见其诱生条件等研究报道。近年来,作者在发现草鱼血清IFN的基础上,开展了其诱生条件与规律的研究,本文报道该研究结果。

1 材料和方法

1.1 实验鱼

一龄草鱼500余尾,体重 24.2 ± 3.1 g;二龄草鱼20余尾,体重 765 ± 15.2 g;三龄草鱼10余尾,体重 1350 ± 75.5 g,购自杭州市水产研究所,实验前置水族箱中于25℃饲养2周,确证健康后使用。

1.2 细胞

草鱼吻端组织细胞株ZC7901和胚胎细胞系CP80引自浙江省淡水水产研究所;人羊膜细胞株WISH引自美国印地安那大学Taylor实验室;鸡胚成纤维细胞系CEF由浙江省农科院病

国家自然科学基金资助项目(草鱼非特异性免疫因子——干扰素的研究),39400100号和浙江省自然科学基金资助项目(草鱼干扰素的免疫调节功能及其对鱼类病害的防治研究),397300号。

收稿日期:1998-02-17

毒研究所提供;三角帆蚌肾原代细胞系 HcK94 由作者实验室建立。以上细胞按常规法用含 10%胎牛血清的 TC199 或 RPMI1640 培养液培养。

1.3 病毒

草鱼出血病病毒(GCHV)、草鱼小 RNA 病毒(GCPV)和三角帆蚌瘟病病毒(HcPV)由作者实验室分离;滤泡性口炎病毒(VSV)引自美国印地安那大学 Taylor 实验室;鸡传染性支气管炎病毒(IBV)、马立克氏病疱疹病毒(MDHV)和传染性腔上囊病病毒(IBDV)由浙江农业大学免疫研究所提供。以上病毒分别在 ZC7901、CP80、HcK94、WISH 和 CEF 等细胞上增殖传代,按 Reed-Muench 法测定滴度 $TCID_{50}$ 。

1.4 草鱼干扰素的制备与活性测定方法

实验鱼经皮下注射病毒诱生剂并按设定的条件诱生 IFN 后,从尾动脉采血,制备血清,经 pH2 处理 24h 灭活病毒,得到血清 IFN 样品。IFN 活性采用半数细胞病变抑制法测定[侯云德 1985],即将 ZC7901 细胞接种于 96 孔板,待生长至单层后除去培养液,加入 2 倍稀释度的干扰素样品 0.1mL,每稀释度接种 3 孔,27℃作用 12h 后用 PBS 洗净样品,加 100 $TCID_{50}$ 病毒攻击,待病毒对照孔 CPE 完全后,观察干扰素孔的 CPE 抑制作用。以能抑制 50%病变的最高稀释度作为一个干扰素活性单位,用 $Log_2CPEI_{50}/0.1mL$ 表示。

1.5 不同环境温度下草鱼 IFN 合成的动态测定

将一龄实验鱼分为三组,每组 20 尾,分别饲养于 25℃、15℃和 8℃水温中,在注射 $2 \times 10^4 TCID_{50}$ 剂量 GCHV 后的第 1、3、6、9 和 12 天,测定 IFN 活性的动态变化。

1.6 不同种类的病毒诱生剂对草鱼 IFN 的诱生作用

将一龄实验鱼分为七组,每组 12 尾,分别注射 $2 \times 10^4 TCID_{50}$ 剂量的 VSV、IBV、MDHV、IBDV、HcPV、GCPV 和 GCHV,25℃水温下诱导 3 天后测定各病毒组的 IFN 活性。

1.7 病毒剂量对草鱼 IFN 诱生的影响

将一龄实验鱼分为六组,每组 15 尾,分别注射 10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 和 $10^6 TCID_{50}$ 剂量的 GCHV,25℃水温下诱导 3 天后测定各剂量组的 IFN 活性。

1.8 鱼龄对草鱼 IFN 诱生的影响

取一龄、二龄和三龄实验鱼各 12 尾,分别感染 $2 \times 10^4 TCID_{50}$ 剂量的 GCHV,25℃诱导 3 天后测定 IFN 活性,比较各鱼龄组的 IFN 诱生能力。

1.9 鱼体营养状况对 IFN 诱生的影响

将一龄实验鱼分为三组,一组正常喂食,另两组分别禁食一个月和两个月,然后注射 $2 \times 10^4 TCID_{50}$ 剂量的 GCHV,25℃诱导 3 天后测定各实验组的 IFN 活性。

1.10 病毒活性对草鱼 IFN 诱生的影响

将滴度为 10^4 TCID₅₀/0.1mL 的 GCHV 分别置 56℃ 灭活 2、4、6、8 和 10 小时, 然后注射一龄实验鱼, 每组 10 尾, 25℃ 诱导 3 天后测定和比较各实验组的 IFN 活性。

1.11 IFN 预注射对草鱼 IFN 诱生的起动作用

将一龄实验鱼分为 15 组, 每组 6 尾, 分别预注射剂量为 1、10、10²、10³ 和 10⁴ 单位的草鱼 IFN 并作用 1、2 和 3d 后, 感染 2×10^4 TCID₅₀ GCHV, 25℃ 诱导 3 天后测定并分析 IFN 活性变化。

1.12 病毒预诱导对草鱼 IFN 诱生的影响

将一龄实验鱼分为三组, 每组 8 尾, 分别用 10^4 TCID₅₀剂量的灭活 GCHV 在 25℃ 预诱导 1、2 和 3d, 然后再感染 10^4 TCID₅₀ GCHV 诱导, 3 天后测定并分析 IFN 活性变化。

2 结果

2.1 不同环境温度下草鱼 IFN 合成的动态变化规律

实验结果显示, 病毒感染草鱼后能迅速诱导 IFN 的合成, 三种水温下诱生的 IFN 活性呈现相似的动态变化规律: 即 24 小时内, 鱼体中均出现明显的 IFN 保护活性, 第 3 天活性达到高峰, 3 天后活性逐渐下降, 并维持 12 天以上。

但三种水温下草鱼 IFN 的诱生产量随着温度的升高而增高, 25℃ 水温下诱导的 IFN 滴度明显高于 15℃ 和 8℃, 表明温度是影响草鱼 IFN 合成的重要因素(图 1)。

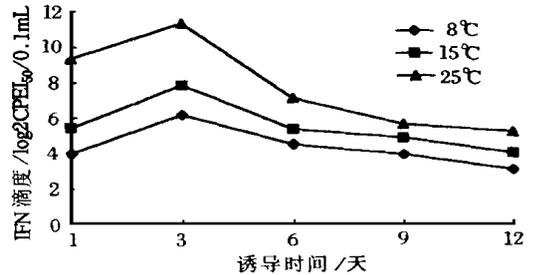


图 1 不同温度下草鱼 IFN 合成的动态曲线
Fig.1 Kinetics of production of grass carp IFN at different temperatures

2.2 不同种类的病毒诱生剂对草鱼 IFN 的诱生作用

研究结果显示, 七种不同的病毒诱生剂均能有效地诱导草鱼合成 IFN(表 1), 说明 IFN 的合成是草鱼经不同病毒侵染后出现的一种普遍的应答反应。其中 RNA 病毒的诱生能力较 DNA 病毒强; 而在 RNA 病毒中, 具有 dsRNA 基因组的 GCHV 和 IBDV 的诱生能力比单链 RNA 病毒强; 具有脂质囊膜结构的 VSV、IBV 和 HcPV 的诱生能力则又比无囊膜结构的 GCPV 强。

表 1 不同病毒诱生剂对草鱼 IFN 的诱生作用

Tab. 1 Effects of different viral inducers on grass carp interferon induction

| 病毒诱生剂 | 核酸类型 | 脂质囊膜 | 干扰素滴度 * | 病毒诱生剂 | 核酸类型 | 脂质囊膜 | 干扰素滴度 * |
|-------|-------|------|------------|-------|-------|------|------------|
| MDHV | dsDNA | + | 8.42±0.49 | GCPV | ssRNA | - | 9.13±0.17 |
| IBV | ssRNA | + | 10.10±0.29 | VSV | ssRNA | + | 10.30±0.41 |
| HcPV | ssRNA | + | 10.46±0.54 | IBDV | dsRNA | - | 10.84±0.26 |
| GCHV | dsRNA | - | 11.29±0.19 | | | | |

* X±SD

2.3 病毒剂量对草鱼 IFN 诱生的影响

实验结果表明, 10^6 TCID₅₀/尾病毒注射剂量能导致实验鱼在短期(72h)内急性死亡,在该急性致死剂量以下,草鱼 IFN 的诱生作用随病毒剂量的增加而增强。F 检验表明,病毒剂量对草鱼 IFN 的诱生具有极显著的影响(表 2)。

表 2 病毒剂量对草鱼 IFN 诱生的影响

Tab. 2 Influence of virus dosage on the induction of grass carp interferon

| 病毒剂量 (TCID ₅₀ /尾) | 干扰素滴度 | F 检验 |
|---------------------------------|------------|-------------------------------------------------|
| 10 | 5.15±0.20 | F _{0.95} (4, 55)=2.54<901.80 P<0.01 |
| 10 ² | 7.10±0.24 | |
| 10 ³ | 9.07±0.41 | |
| 10 ⁴ | 11.13±0.36 | |
| 10 ⁵ | 11.23±0.33 | |
| 10 ⁶ | fish dead | |

2.4 鱼龄和鱼体营养状况对草鱼 IFN 诱生的影响

分别对不同生长阶段和不同营养状况的草鱼进行诱导,结果表明,一龄、二龄和三龄草鱼间的 IFN 诱生滴度未呈现显著差异,而正常喂养组与饥饿组间则出现极显著差异。说明草鱼 IFN 的诱生不受鱼龄影响,而受鱼体营养状况的影响(表 3)。

表 3 鱼龄和鱼体营养状况对草鱼干扰素诱生的影响

Tab. 3 Influence of grass carp ages and nutrient condition on the induction of interferon

| 实验项目 | 鱼 龄 | | | 营养状况 | | |
|-------|-----------------------------------------------|------------|------------|------------------------------------------------|------------|-----------|
| | 一 龄 | 二 龄 | 三 龄 | 喂 养 | 禁食一月 | 禁食二月 |
| 干扰素滴度 | 11.21±0.29 | 11.27±0.39 | 11.19±0.41 | 11.25±0.32 | 10.40±0.55 | 9.85±0.21 |
| F 检验 | F _{0.95} (2, 33)=3.29>0.16 P>0.05 | | | F _{0.99} (2, 31)=5.36<20.52 P<0.01 | | |

2.5 病毒活性对草鱼 IFN 诱生的影响

实验结果表明, GCHV 经 56℃灭活不同时间后其活性逐渐下降,但各灭活组病毒对草鱼 IFN 的诱生无显著影响(表 4)。说明不同灭活程度的病毒均能诱导草鱼 IFN 的合成。

表 4 GCHV 活性对草鱼 IFN 诱生的影响

Tab. 4 Influence of GCHV activity on the induction of grass carp interferon

| 灭活时间 (h) | 病毒滴度 | IFN 滴度 | F 检验 |
|-------------|-------------------|------------|------------------------------------------------|
| 0 | 10 ^{4.0} | 11.18±0.11 | F _{0.95} (5, 66)=2.25>0.418 P>0.05 |
| 2 | 10 ^{2.5} | 11.16±0.32 | |
| 4 | 10 ^{1.3} | 11.17±0.20 | |
| 6 | 10 ^{1.2} | 11.13±0.21 | |
| 8 | 0 | 11.08±0.16 | |
| 10 | 0 | 11.07±0.18 | |

2.6 IFN 预注射对草鱼 IFN 诱生的起 动作用

表 5 结果显示,草鱼 IFN 对其自身的合成具有起动(priming)调节作用,用 10²U 的 IFN 预注射草鱼 2 天后再感染病毒,即可提高 IFN 的诱生活性,并且 IFN 的这种起动作用随着注射剂量的增加而增强,起动所需要的时间则随剂量的增加而缩短。实验中曾考虑到鱼体可能会因注射了 IFN 而在其血清中出现本底,从而造成实验误差,因此选择高剂量(10⁴U)注射组进行 IFN 本底测定。结果未发现明显的 IFN 保护活性,说明可以排除 IFN 本底的干扰问题。

表 5 IFN 预注射对草鱼 IFN 诱生的起动作用

Tab. 5 Priming effect of IFN pre-inoculation on the induction of grass carp IFN

| 剂 量(U) | 对照组 | 预注射组(d)IFN 滴度 | | |
|-----------------|------------|---------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 11.25±0.02 | | | |
| 1 | — | 11.20±0.10 | 11.26±0.08 | 11.29±0.31 |
| 10 | — | 11.21±0.31 | 11.30±0.29 | 11.28±0.30 |
| 10 ² | — | 11.24±0.23 | 11.42±0.31* | 11.49±0.22* |
| 10 ³ | — | 11.56±0.31* | 11.96±0.21* | 11.92±0.23* |
| 10 ⁴ | — | 12.05±0.20* | 12.02±0.29* | 11.94±0.18* |

*t 检验, P< 0.01, 与对照组比较

2.7 病毒预诱导对草鱼 IFN 诱生的影响

实验结果显示, 草鱼经 10⁴TCID₅₀GCHV 预诱导 3 天后, 再感染相同剂量的 GCHV 所产生的 IFN 活性与注射 2×10⁴TCID₅₀GCHV 的对照相比较, 存在极显著差异, 说明病毒预诱导适当的时间, 能促进草鱼 IFN 的诱生(表 6)。

3 讨论

研究结果表明, 鱼类 IFN 的许多诱生规律与高等脊椎动物是相一致的, 如双链 RNA 病毒可作为高效的诱生剂、提高病毒剂量可以增加 IFN 的诱生产量、病毒活性对 IFN 的诱生无显著影响、IFN 对其诱生有起动作用等, 反映出 IFN 的基因表达与代谢调控在不同物种间存在共同的规律[Sidney 1981, 侯云德 1990]。但鱼类 IFN 的诱生规律也有其特殊性, 如环境温度的调节作用, 这与鱼类是低等脊椎动物这一特殊进化地位有关。已有不少研究表明, 鱼类的免疫反应受环境温度的影响, 低温能抑制鱼类的免疫水平, 目前认为其机理与 IgM 的合成和 T 淋巴细胞转化等受到抑制有关[江育林等 1991]。草鱼 IFN 的诱生结果表明, 低温也能抑制鱼类 IFN 的合成, 说明低温下 IFN 合成的抑制也是导致鱼类免疫水平低下的原因之一。

由于鱼类是低等脊椎动物, 其特异性免疫机制尚不完善, 非特异性免疫占有重要地位。而 IFN 作为一种高效的非特异性免疫因子, 它的合成很可能作为对鱼类特异性免疫反应不足的一种补充, 在鱼体的抗感染免疫中发挥重要的作用。因此, 对草鱼 IFN 诱生条件与规律的研究, 对人们更好地认识和利用鱼类 IFN 具有指导意义。

杨汝春同志参加部分工作, 钱凯先、毛树坚教授予以大力指导, 谨此致谢。

表 6 病毒预诱导对草鱼 IFN 诱生的影响

Tab. 6 Effect of virus pre inducing on the induction of grass carp interferon

| 组别 | IFN 滴度 | t 检验* |
|---------|------------|---------|
| 对照组 | 11.21±0.14 | |
| 预诱导 1 天 | 11.15±0.12 | P> 0.05 |
| 预诱导 2 天 | 11.24±0.27 | P> 0.05 |
| 预诱导 3 天 | 11.94±0.14 | P< 0.01 |

*与对照组比较

参 考 文 献

- 江育林, 李正秋. 1991. 病毒感染的草鱼细胞产生类干扰素物质的研究. 病毒学报, 7(1): 30~35
- 江育林, 李 燕, 于 平. 1991. 草鱼免疫应答的初步研究. 水生生物学报, 15(4): 321~326
- 侯云德. 1985. 病毒基因工程原理与方法. 北京: 人民卫生出版社. 245~247
- 侯云德. 1990. 分子病毒学. 北京: 学苑出版社. 620~622
- De-Kinkelin P, Dorson M. 1973. Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with egdved virus. J Gen Virol, 19: 125~127
- Graham S, Secombes C J. 1990. Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma? J Fish Biol, 36(4): 563~573
- Gravell M, Malsberger R G. 1965. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Ann N Y Acad Sci, 126: 555~565
- Oie H K, Loh P C. 1971. Reovirus type 2: Induction of viro resistance and interferon production in fathead minnow cells. Proc Soc Exp Biol Med, 136: 369~373
- Rogel-Gaillard C, Chilmocznyk S. 1993. In vitro induction of interferon-like activity from rainbow trout leucocytes stimulated by Egdved virus. Fish Shellfish Immunol, 3(5): 383~394
- Sidney P. 1981. Methods in Enzymology (Vol. 78). Academic Press, New York, USA. 64~66
- Tamai T, Shirahata S, Sato N, et al. 1993. Purification and characterization of interferon-like antiviral protein derived from flatfish (*Panulichthys olivaceus*) lymphocytes immortalized by oncogenes. Cytotechnology, 11(2): 121~131

STUDIES ON THE CONDITIONS FOR INDUCING OF INTERFERON FROM *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

SHAO Jian-Zhong, XIANG Li-Xin, LI Ya-Nan

(College of Life Science, Zhejiang University, 310012)

ABSTRACT In the present paper, the conditions for the induction of interferon from grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* were described. The results showed that the interferon of grass carp could be induced rapidly following experimental infection with the viruses. After the virus being inoculated for 24 hours, the interferon activity in serum sample exhibited obviously. Maximum yields of serum interferon were observed after the virus being inoculated for 3 days. The production of grass carp interferon was influenced by the environmental temperature, different viral inducers, virus dosages as well as the nutrient conditions of the fish. The induction of grass carp interferon was shown to be temperature-dependant. Titers of interferon induced at 25 °C was higher than that at 15 °C and 8 °C. Among seven viral inducers, the interferon inducing ability of six RNA viruses was higher than that of DNA virus. And the GCHV which was of the genome of dsRNA possessed the highest interferon-inducing ability. High virus dosages and good nutrient conditions for the fish were advantageous to the production of interferon. The production of grass carp interferon could also be enhanced by priming the fish with interferon or pre-inducing the fish with inactivated GCHV for appropriate time. However, the influence of virus infectious activity and the ages of fish on the induction of interferon had not been observed.

KEYWORDS *Ctenopharyngodon idellus*, Interferon, Condition for inducing