

中华鲟 IFN- γ 的免疫调控作用郑楚文¹, 袁汉文¹, 田光明¹, 李 骞¹,
张书环², 许巧情^{1*}, 危起伟^{2*}

(1. 长江大学动物科学学院, 湖北荆州 434020;

2. 农业部淡水生物多样性保护重点实验室, 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北武汉 430223)

摘要: 为了解中华鲟 IFN- γ 的免疫调控作用, 实验通过中华鲟转录组获得 IFN- γ cDNA 序列, 构建重组表达质粒 pTRI-st-IFN γ , 原核表达 IFN- γ 蛋白, 检测其在病毒和细菌感染过程中的免疫调控作用。SDS-PAGE 显示中华鲟 IFN- γ 重组蛋白大小为 19.17KD, 以可溶性表达为主, 浓度为 0.998 mg/mL; 荧光定量 PCR 表明: IFN- γ 蛋白能够诱导中华鲟肾脏细胞中下游相关抗病毒基因 Mx、Viperin 和 CXCL 家族中 CXCL11-L1、CXCL11-L2 表达; 与 EPC 细胞共孵育能够有效抑制鲤春病毒血症病毒 (spring viraemia of carp virus, SVCV) 的引起的细胞病变和增殖, 并对 SVCV 病毒的 G、P、N 三个基因的表达量呈现出极显著性下调; 在体外能够调控抑制嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、中间产气单胞菌 (*Aeromonas intermedia*) 和维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 并对其生长表现出明显的抑制作用。本研究结果为进一步深入研究中华鲟 IFN- γ 的生物学功能提供理论参考。

关键词: 中华鲟; IFN- γ ; 免疫调控; 生物学功能**中图分类号:** S 917.4**文献标志码:** A

中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 属于软骨硬鳞鱼类, 介于软骨鱼类和硬骨鱼类之间, 是生物免疫系统进化树上重要的分支点, 是研究鱼类和脊椎动物进化的活化石, 在鱼类乃至整个脊椎动物进化史上占有极其重要的地位^[1-2]。近些年由于过度捕捞、水利工程建设及水体污染等原因使其濒临灭绝, 被《世界自然保护联盟》(IUCN) 列入濒危物种红色名录“极度濒危”。为此政府采取了全江禁捕和限制科研用鱼、开展中华鲟科研、人工增殖放流等一系列保护措施, 其中疾病是造成中华鲟死亡最大的原因之一^[3-6]。干扰素作为重要的免疫分子, 在中华鲟免疫防御中发挥着重要的作用^[7,8]。

干扰素具有非常广泛的生物活性, 在抗感染、癌症、炎症和自身免疫过程中发挥着重要

的作用^[7-9]。分为 3 种类型, I 型干扰素 (IFN- α/β)、II 型干扰素 (IFN- γ)、III 型干扰素 (IFN- λ)。I 型和 III 型具有的抗病毒功能, II 型代表一种免疫调节因子可针对协调病毒和细胞内细菌感染的先天免疫和获得性免疫^[7,8,10-14]。在大多数鱼类中 II 型干扰素功能与高等脊椎动物类似, 与细胞表面特异性受体结合激活下游 JAK-STAT 信号通路, 诱导多种抗病毒基因表达 (如 Mx、Viperin、ISG15 等), 从而发挥其生物学功能, 增强宿主免疫状态^[14-16]。此外, 趋化因子 CXCL9、CXCL10、CXCL11 是非 ELR CXC 趋化因子亚群中结构和功能的关键性分子, 主要活化 CD4+Th1 细胞、CD8+T 细胞和 NK 细胞。一般在正常生理条件下大多数非淋巴组织中检测不到, 但在感染损伤或免疫炎症过程中会受到细胞因子, 特别 IFN- γ

收稿日期: 2020-07-29 修回日期: 2020-08-25

资助项目: 农业部淡水生物多样性保护重点实验室开放基金课题项目 (LFBC 1007)

通信作者: 许巧情, E-mail: xuqiaoqing@yangtzeu.edu.cn; 危起伟, E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

强烈诱导^[17-20]。

目前 IFN- γ 的功能已在斑马鱼 (*Danio rerio*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、金鱼 (*Carassius auratus Linnaeus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) 等鱼类中进行了初步的探索, 对多种细菌、病毒具有一定的免疫调控作用^[21-26]。在虹鳟中, IFN- γ 可促进抗病毒基因 (Mx、Viperin、ISG15) 等和下游基因 CXCL11 表达, 并且能够体外抑制鲤春病毒血症病毒 (spring viraemia of carp virus, SVCV) 复制^[6,24]; 腹腔注射重组 IFN- γ 可提高迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 感染牙鲈的存活率, 但其具体作用机制尚不清楚^[27]。由于中华鲟是濒危物种对其 IFN- γ 的功能并未进行深入研究。为此我们对中华鲟 IFN- γ 的抗菌、抗病毒的免疫调控作用进行了初步的研究, 检测了中华鲟下游抗病毒基因 (Mx、Viperin)、CXCL 家族中 CXCL11-L1、CXCL11-L2 基因和鲤春病毒血症病毒 (SVCV) G、P、N 三个基因的表达, 以及体外验证了 IFN- γ 对嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)、中间产气单胞菌 (*A. intermedia*) 和维氏气单胞菌 (*A. veronii*) 的免疫调控作用, 可为深入解析中华鲟 IFN- γ 生物学功能提供参考和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中华鲟来自长江水产研究所太湖基地 (中国荆州); 中华鲟 IFN- γ cDNA 序列 (GenBank: MH645437.1); 中华鲟肾细胞、EPC 细胞、C43 大肠杆菌感受态菌株为本实验室保存; 原核表达质粒 pTRI-st-IFN γ 购自 GENEWIZ 公司, 鲤春病毒血症病毒 (spring viraemia of carp virus, SVCV) 由华中农业大学刘学芹教授所赠; 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、中间产气单胞菌 (*Aeromonas intermedia*) 及维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 由长江所张书环老师从患病的中华鲟中分离鉴定。

1.2 重组质粒 pTRI-st-IFN γ 的转化与鉴定

将购自 GENEWIZ 公司重组质粒 pTRI-st-IFN γ 1:10 转入 BL21 感受态菌株中, 均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板培养 12~14 h, 挑取单菌落接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中 37 °C 振荡培养 4 h, 取 1 μ L 进行 PCR 鉴定。将 PCR

鉴定为阳性克隆的产物, 一部分送往公司测序。

1.3 重组质粒 pTRI-st-IFN γ 的诱导表达与纯化

将鉴定为阳性的菌液接种于 5 mL 含氨苄青霉素的液体 LB 中, 37 °C 振荡培养至对数期。实验组加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 对照组不加诱导剂, 37 °C 220 rpm 振荡培养 4 h, 4 °C, 12 000 rpm/min 离心, 收集沉淀, 超声破碎, SDS-PAGE 电泳和 western blotting 分析目的蛋白。

接种于 1 mL 经 western blotting 鉴定的表达菌, 接种于 100 mL 含氨苄青霉素液体 LB 培养基中, 诱导方法同上, 收集上清和沉淀, 分别 SDS-PAGE 电泳进行蛋白可溶性鉴定, 最后根据 HIS 标签蛋白亲和纯化试剂盒说明书对上清蛋白进行纯化。

1.4 蛋白定量

根据 BCA Protein Quantification Kit BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 测定蛋白浓度。

1.5 IFN- γ 对中华鲟肾细胞系下游免疫基因的调控作用

将中华鲟肾细胞接种于 6 孔板之中, 待细胞形成致密的单层细胞后; 实验组加入重组蛋白 IFN- γ 至终浓度为 100 ng/mL, 对照组加入 PBS, 继续培养; 分别在 1 h, 8 h, 24 h, 48 h 时, 弃培养基, 加入 1 mL TRIzol 溶液, 室温静置 5 min, 收集于无 RNA 酶 EP 管中, 提取总 RNA, qPCR 定量检测。特异性引物见表 1。

1.6 IFN- γ 诱导 EPC 细胞抗 SCVC 病毒的活性验证

将 EPC 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞形成致密的单层细胞后; 实验组加入重组蛋白 IFN- γ 至终浓度为 100 ng/mL, 对照组加入 PBS, 继续培养 2 h, 弃培养基, PBS 清洗 2~3 次后, 将测定好滴度的 SCVC 病毒用不含血清和双抗 DMEM (不含血清, 双抗) 稀释至合适浓度感染细胞, 继续培养 2 h, 将病毒稀释液换成 2% FBS 的 DMEM 培养基将继续培养并观察病变效应; 在 12 h, 24 h, 36 h, 48 h 时, 弃培养基, 加入 1 mL TRIzol 溶液, 室温静置 5 min, 收集于无 RNA 酶 EP 管中, 提取总 RNA, qPCR 定量检测。

1.7 IFN- γ 对细菌免疫调控作用的验证

将从中华鲟分离出来嗜水气单胞菌、中间

表 1 引物碱基序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of primers

引物 primers	序列 5'-3' Sequence 5'-3'
ASMx-qF/R	GGAATAGCCAGAAATCCAGTGGGA/GTTTCGTTAGCACAGCCAGAGTTC
ASViperin-qF/R	TAAAAGACTCSGGCATGGAGAAG/GACACTGCCAAAATGTCCAGGTA
AS β -actin-qF/R	CCTTCTTGGGTATGGAATCTTGC/CAGAGTATTTACGCTCAGGTGGG
CXCL11-L1-qF/R	CATCCTGTGCCTTGCTGTCTT/ACTTGGATTTGGGATTGAGGC
CXCL11-L2-qF/R	GCACTTACCCTGCTTCTTGTACTG/CTCTTGACCCACGGTGATTTG
SCVC-G-qF/R	GCTACATCGCATTCTTTTGC/GCTGAATTACAGGTTGCCATGAT
SCVC-N-qF/R	AACAGCGCGTCTTACATGC/CTAAGGCGTAAGCCATCAGC
SCVC-P-qF/R	TGAGGAGGAATGGGAATCAG/AGCTGACTGTCGGGAGATGT
β -actin-qF/R	GCTATGTGGCTCTTGACTTCGA/CCGTCAGGCAGCTCATAGCT

产气单胞菌和维氏气单胞菌分别培养至 OD₆₀₀=0.6 时, 吸取 200 μ L 到 96 孔板中, 实验组添加终浓度为 100 ng/mL 的 IFN- γ 蛋白, 对照组添加相同体积的 PBS, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱继续培养, 在 1 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h 时分别测 OD₆₀₀ 的值。

2 结果

2.1 中华鲟 IFN- γ 蛋白的原核表达及纯化

将中华鲟重组质粒 pTRI-st-IFNg 转入 BL21

大肠杆菌感受态后培养, 加入终浓度为 1 mM IPTG 37 $^{\circ}$ C 小量诱导, 诱导组出现明显蛋白表达条带, 大小约为 19.17 KD, 空白组和未诱导组均未出现明显条带 (图 1);

重组蛋白大量诱导表达, 低温离心破碎后, 收集上清和沉淀进行蛋白可溶性鉴定, 目的蛋白主要为可溶性表达 (图 2-a); 然后根据 HIS 标签蛋白亲和纯化试剂盒说明书对上清蛋白进行纯化, 为得到较纯的重组 IFN- γ 蛋白进一步通过 superdex75 制备级柱纯化, 收集目的蛋白, 取 10 μ L

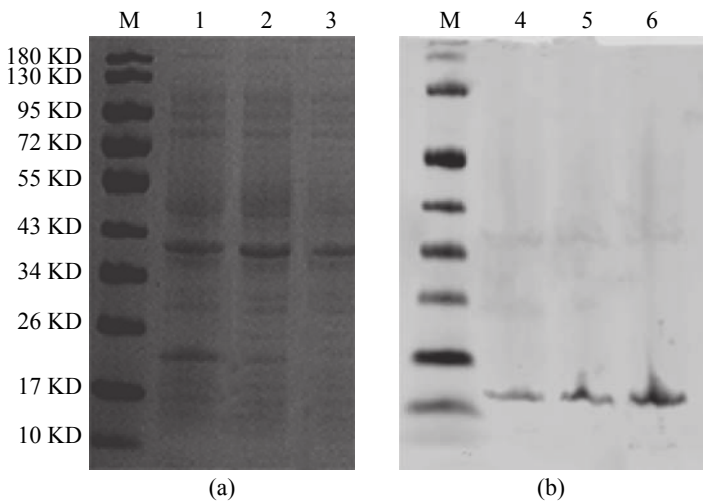


图 1 IFN- γ 小量诱导 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 分析

(a) IFN- γ 小量诱导 SDS-PAGE 结果: M: 180KD protein marker; 1: 加 IPTG 诱导组; 2: 不加 IPTG 未诱导组; 3: 不加 IPTG 空载体对照。(b) IFN- γ 小量诱导 Western blotting 结果: 4: 空载体对照; 5: 未诱导组; 6: 诱导组。

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting analysis of small amount of IFN- γ induced

(a)Result of small amount of SDS-PAGE induced by IFN- γ : M: 180KD protein marker; 1: Induced group with IPTG added; 2: Non-induced group without IPTG added; 3:No IPTG empty vector control was added.(b) Western blotting results of small amount of IFN- γ induction: 4: empty vector control; 5: uninduced group; 6: induced group.

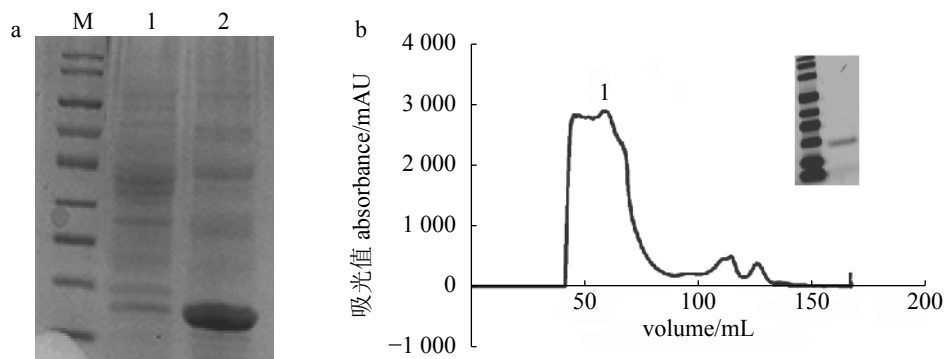


图2 IFN- γ 重组蛋白可溶性鉴定与纯化

(a) IFN- γ 重组蛋白可溶性鉴定结果: 1: 包涵体沉淀表达结果; 2: 上清表达结果。(b) IFN- γ 蛋白纯化及 western blotting 鉴定结果。

Fig. 2 Soluble identification and purification of IFN- γ recombinant protein

(a) The results of soluble identification of IFN- γ recombinant protein were as follows: 1. The precipitation expression of inclusion body; 2. The expression of supernatant. (b) Purification and identification of IFN- γ protein by Western blotting.

进行 western blotting 鉴定, 条带明显且单一(图2-b), 利用 Bradford 法定量, 浓度为 0.998 mg/mL。

2.2 IFN- γ 对中华鲟肾细胞系下游免疫基因的调控作用

为了验证 IFN- γ 蛋白对中华鲟肾细胞下游免疫基因是否具有调控作用, 用终浓度为 100 ng/mL 中华鲟 IFN- γ 蛋白体外刺激中华鲟肾脏细胞系, 分别在 1 h、8 h、24 h 和 48 h 时收集细胞, 通过实时荧光定量法分别检测对照组和实验组下游相关免疫基因 Mx、Viperin 和 CXCL11 家族中 CXCL11-L1、CXCL11-L2 的表达变化(图3、4)。Mx 和 Viperin 的表达 1 h 到 48 h 都呈现显著性上调趋势且在 8 h 达到峰值, 分别上调 91 倍和 49 倍; CXCL 家族中, 在 48 h 内 CXCL11-L1 在 24 h 时达到峰值, CXCL11-L2 在 48 h 达到峰值, 分别上调 29 倍和 26 倍。

2.3 IFN- γ 诱导 EPC 细胞抗 SCVC 病毒的活性验证

为了验证中华鲟 IFN- γ 蛋白是否具有抵抗病毒侵染的功能, 以 EPC 细胞为宿主细胞来研究 IFN- γ 蛋白对 SCVC 病毒是否具有抵御作用。用 IFN- γ 蛋白孵育 EPC 细胞 2 h 后用 SCVC 病毒感染 EPC 细胞。结果显示相比于对照组, 未用 IFN- γ 处理组在 24 h 和 48 h 均出现明显的病变效应(CPE), 处理组 24 h 未出现明显的病变效应, 48 h 出现轻微病变效应, (图5); 分别在 12 h、24 h、36 h、48 h 收集细胞并且通过荧光实时定量法检测 SCVC 病毒的 P 蛋白、G 蛋白、N 蛋白的表达, 结果显示对照组并未出现明显的上调或者下调的现象, 处理组与未处理组相比 SVCV 病毒的 P、G、N 三个基因都出现了极显著性下调(图5), 说明中华鲟 IFN- γ 蛋白能够有效的抵御 SCVC 病毒

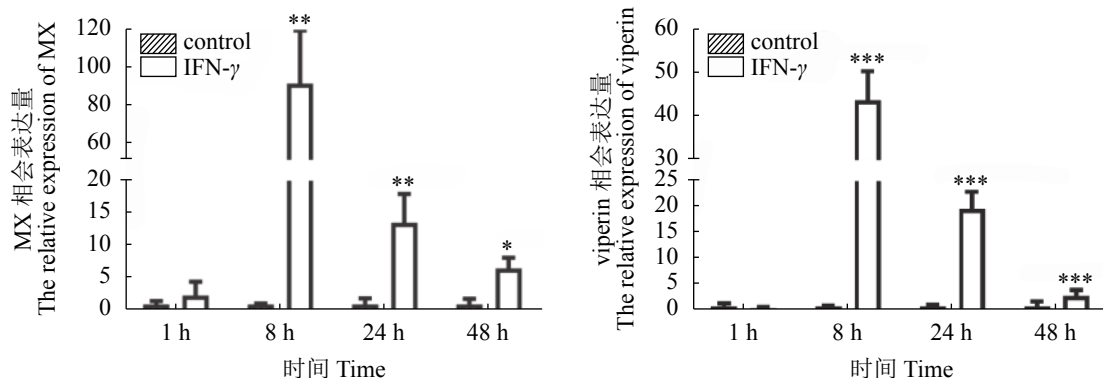


图3 IFN- γ 诱导中华鲟肾脏细胞系抗病毒基因 Mx、Viperin 表达。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Fig. 3 The expression of antiviral genes Mx and Viperin in kidney cells of the Chinese sturgeon was induced by IFN- γ .

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

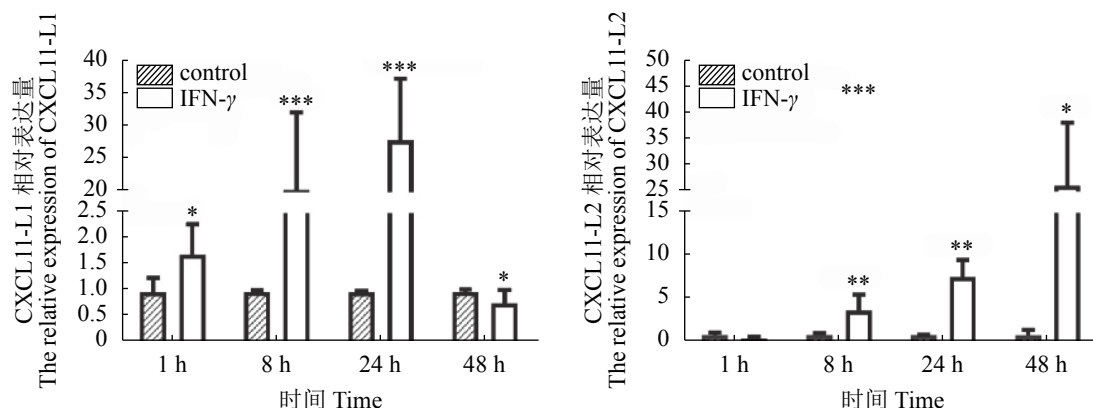


图4 IFN- γ 诱导中华鲟肾脏细胞系 CXCL 家族中 CXCL11-L1、CXCL11-L2 的表达。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Fig. 4 The expression of CXCL11-L1, CXCL11-L2 in CXCL family in kidney cell of the Chinese sturgeon was induced by IFN- γ . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

侵染 EPC 细胞。

2.4 IFN- γ 对细菌的免疫调控作用

为了验证中华鲟 IFN- γ 蛋白对细菌是否具有免疫调控作用, 实验组组分别添加终浓度为 100 ng/mL 的 IFN- γ 蛋白至 OD₆₀₀=0.6 的嗜水气单胞菌、中间产气单胞菌和维氏气单胞菌中进行孵育; 对照组添加相同体积的 PBS。分别在 1 h、6 h、8 h、12 h、24 h、48 h 时测量 OD₆₀₀ 值, 结果显示与对照组相比, 处理组对嗜水气单胞菌、中间产气单胞菌和维氏气单胞菌都表现显著性的抑制作用(图 6), 说明中华鲟 IFN- γ 蛋白对嗜水气单胞菌、中间产气单胞菌和维氏气单胞菌具有一定的免疫调控作用。

3 讨论

IFN- γ 属于 II 型干扰素家族, 是一种多功能细胞因子, 具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等功能^[17,21,26]。在开发天然抗感染生物药物中具有广阔的前景, 可解决病原对常规抗感染药物(如抗生素)和抗病毒药物的抗药性问题^[28-30]。IFN- γ 免疫调控作用已经在多种低等脊椎动物(如斑马鱼 (*Danio rerio*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon Idella*)、金鱼 (*Carassius auratus Linnaeus*)、大西洋鲑 (*salmo salar*) 等) 中进行了深入的研究尤其病毒调控作用, IFN- γ 能够诱导宿主免疫细胞抗病毒基因显著性表达(如 MX、Viperin、ISG15、RSAD2 等), 并且在体外能够抑制病毒(包括鲤春病毒血症病毒 (SVCV)、

草鱼呼肠孤病毒 (GCRV)、病毒性出血败血症病毒 (VHSV)、鲫鱼造血坏死病毒 (CHNV) 等) 增殖^[31-34]。在斑马鱼、大西洋鲑和虹鳟中重组 IFN- γ 不仅能够激活宿主细胞激活 JAK-STAT 信号通路, 并在体外对 SVCV、GCRV 病毒的增殖具有调控作用; 此外虹鳟中还能强烈的诱导 CXCL11-L1 基因表达^[18-20,24-26,34]。在研究中华鲟 IFN- γ 抗病毒活性时, 参照 Kerry^[17], Cai^[18] 等以终浓度 100 ng/mL 诱导中华鲟肾细胞系 1 h、8 h、24 h、48 h, 发现 IFN- γ 可刺激中华鲟肾细胞系下游相关免疫调控基因 Mx、Viperin 和 CXCL11 家族中 CXCL11-L1、CXCL11-L2 显著性表达。不同倍体硬骨鱼类具有不同的免疫活性, 三倍体鱼类对病原体入侵具有更强的活性, 中华鲟作为八倍体生物也具有较强的免疫活性, 在养殖或者自然状态下几乎没有出现病毒性感染, 目前国内没有分离出相应的病毒毒株, 因此选择 EPC 细胞作为宿主细胞来研究中华鲟 IFN- γ 对鲤春病毒血症病毒 (spring viraemia of carp virus, SVCV) 的免疫调控作用, 与斑马鱼和大西洋鲑 IFN- γ 的结果一致, 显著的抑制了 SCVC 病毒引起的细胞病变效应和 P、G、N 三个基因的表达, 说明中华鲟 IFN- γ 蛋白具有较好的抗病毒活性。

IFN- γ 除了参与抗病毒反应外, 可能具有抗菌作用。IFN- γ 在宿主抗细菌感染起特别重要的作用, 能够诱导一氧化氮合酶 (iNO) 基因表达, 促进 NO 合成, 增强免疫相关细胞的吞噬活性, 但其作用机制尚不清楚^[36-39]。有研究报道, 在敲除小鼠 IFN- γ , 发现 IFN- γ ^{-/-} 小鼠对幽门螺杆菌

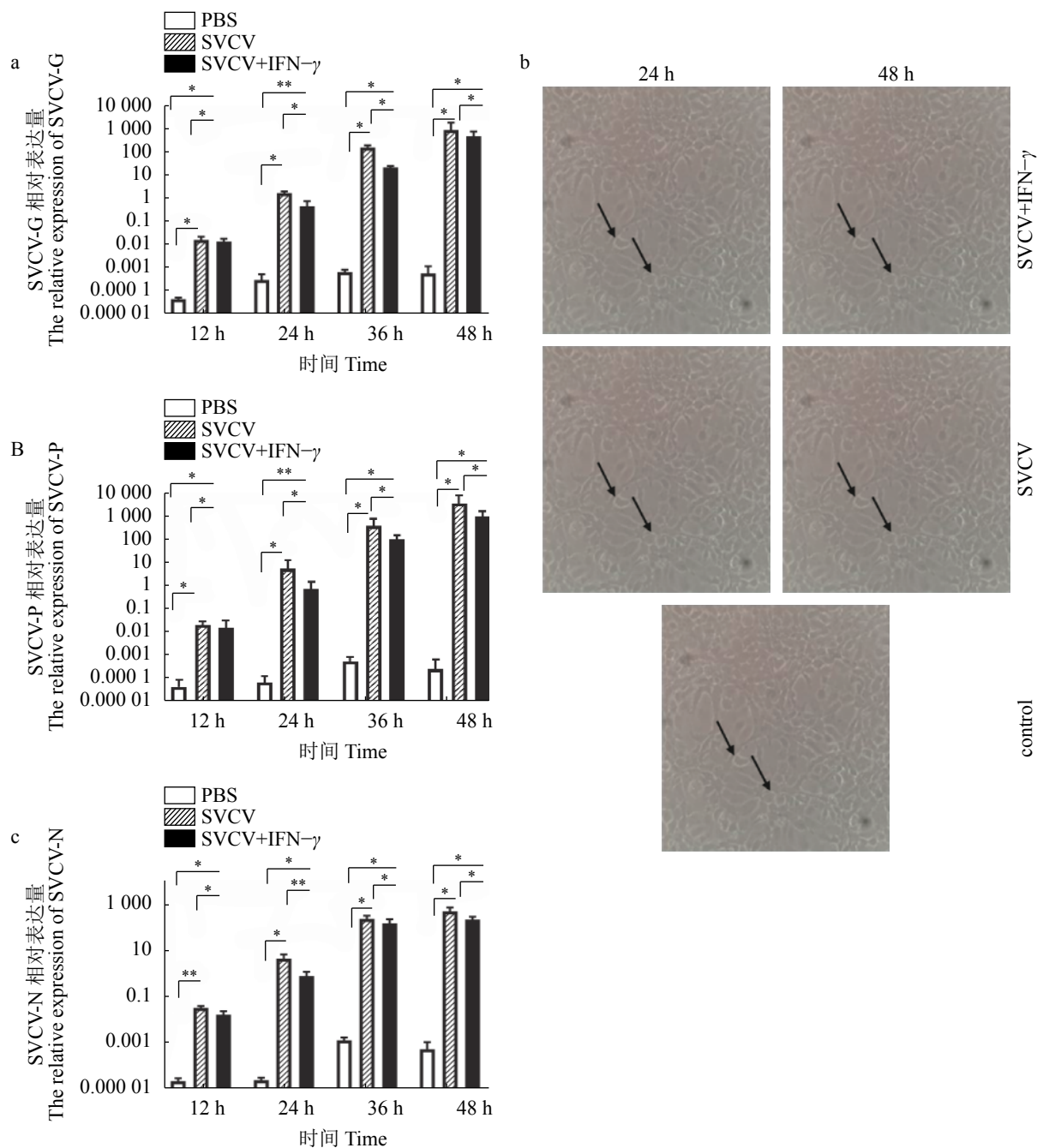


图 5 IFN- γ 诱导 EPC 细胞抗 SCVC 病毒结果

(a)RT-qPCR 检测 SCVC-G 表达结果；(b)RT-qPCR 检测 SCVC-P 表达结果；(c)RT-qPCR 检测 SCVC-N 表达结果；(d)EPC 细胞病变结果 (箭头处代表细胞 CPE 效应)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Fig. 5 Results of IFN- γ -induced EPC cells against SCVC virus

(a) RT-qPCR detection of SCVC-G expression; (b) RT-qPCR detection of SCVC-P expression; (c) RT-qPCR detection of SCVC-N expression; (d) Results of EPC cell pathology(The arrow represents CPE effect). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

(*Helicobacter pylori*) 和单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes* bacteria Lister) 敏感性更高, 同样在斑马鱼中敲除 (IFN- γ 1/IFN- γ rel 和 IFN- γ 2/IFN- γ) 显著增加了斑马鱼幼虫对里氏耶尔森氏菌 (*Yersinia Ruckeri*) 感染的敏感性^[40]; 腹腔注射

重组 IFN- γ 可提高迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 感染牙鲈的存活率达 60%, 并且能上调炎症因子 IL-1 β 表达高达 16 倍^[27]; 此外在大西洋鲑中 IFN- γ 可在体外 TLR9 介导的天然免疫反应中发挥作用^[41], 在本实验中采用体外孵育嗜水气单

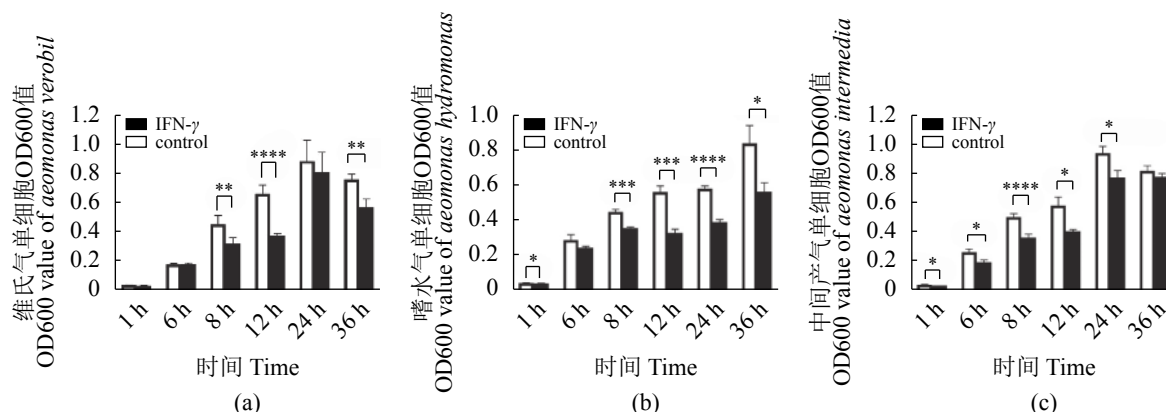


图6 IFN- γ 蛋白抗嗜水气单胞菌、中间产气单胞菌、维氏气单胞菌结果。

Fig. 6 results of IFN- γ protein against *Aeromonas hydrophila*, *A. intermedia* and *A. veronii*

胞菌、中间产气单胞菌和维氏气单胞菌, 结果发现中华鲟 IFN- γ 重组蛋白对三种细菌的生长和活性存在一定的抑制作用, 初步说明中华鲟 IFN- γ 对三种细菌可能具有免疫调控作用, 因为 IFN- γ 主要通过诱导干扰素刺激基因表达来发挥作用, 因此还需要进一步进行活体实验来验证其抗菌活性。整体来说大多数鱼类 IFN- γ 对相应的细菌病原体有免疫调节作用, 同时也能受到 LPS 或者细菌的诱导显著性的上调, 说明 IFN- γ 具有一定的抗菌功能。

总之, 中华鲟 IFN- γ 重组蛋白能够在 BL21 大肠杆菌中高效表达, 能够诱导中华鲟肾细胞系下游抗病毒基因 Mx、Viperin 和 CXCL 家族中 CXCL11-L1、CXCL11-L2 表达和保护 EPC 细胞抵抗 SCVC 病毒感染, 具备抗病毒活性; 对嗜水气单胞菌、中间产气单胞菌、维氏气单胞菌三种细菌体外具有一定的免疫抑制作用。目前只对中华鲟 IFN- γ 免疫调控作用进行了初步的研究, 还需要对其生物功能进行深入研究, 为中华鲟的保护提供更全面的理论依据。

参考文献 (References):

- [1] Mugetti D, Pastorino P, Menconi V, *et al.* The Old and the New on Viral Diseases in Sturgeon[J]. *Pathogens*, 2020, 9(2): 146.
- [2] Hung S S O. Recent advances in sturgeon nutrition[J]. *Animal Nutrition*, 2017, 3(3): 191-204.
- [3] Ellen K P, Phaendra D, Liz L, *et al.* Status, trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries[J]. *Fish & Fisheries*, 2005, 6(3): 233-265.
- [4] Phaendra D, Elizabeyh A, Babcock, Ellen K. Pikitch, *et al.* Management and Recovery Options for Ural River Beluga Sturgeon[J]. *Conservation Biology*, 2010, 24(3): 769-777.
- [5] Giuliana P, Genciana T, Laura G, *et al.* Current status and future perspectives of Italian finfish aquaculture[J]. *Reviews in Fish Biology & Fisheries*, 2014, 24(1): 15-73.
- [6] Bronzi P, Rosenthal H. Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, 30(6): 1536-1546.
- [7] Gan Z, Chen S N, Huang B, *et al.* Fish type I and type II interferons: Composition, receptor usage, production and function[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(2): 773-804.
- [8] 孙杰, 郭雅娜, 戴彩姣, 等. 黑头软口鲶上皮瘤细胞 ifn-1 基因的表达及抗病毒活性研究[J]. *水产学报*, 2020, 24(7): 1-9.
- [9] Sun J, Guo Y N, Dai C J, *et al.* Expression and Antiviral Activity Study of IFN-1 Gene in *Epithelioma papulosum cyprini* cells[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 24(7): 1-9(in Chinese).
- [10] 李振洋, 侯晋. I型干扰素在抑制肿瘤发生发展中的作用机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(1): 83-88.

- [11] Teijaro J R. Type I interferons in viral control and immune regulation[J]. *Current Opinion of Virology*, 2016, 16: 31-40.
- [12] Chang M, Collet B, Nie P, *et al.* Expression and functional characterization of the RIG-I-like receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(16): 8403-8412.
- [13] Samuel C E. Antiviral actions of interferons[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(4): 778-809.
- [14] Robertsen B. The interferon system of teleost fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 172-191.
- [15] Wang B, Zhang Y B, Liu T K, *et al.* Fish viperin exerts a conserved antiviral function through RLR-triggered IFN signaling pathway[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 47(1): 140-149.
- [16] Robertsen B. Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(4): 351-357.
- [17] Laing K J, Bols N, Secombes C J. A CXC chemokine sequence isolated from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* resembles the closely related interferon- γ -inducible chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11[J]. *European Cytokine Network*, 2002, 13(4): 462-473.
- [18] Cai Z H, Gao C P, Zhang Y, *et al.* Functional characterization of the ELR motif in piscine ELR⁺CXC-like chemokine[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(4): 505-512.
- [19] Cai Z H, Gao C P, Zhang Y, *et al.* Cloning and bioactivity analysis of a CXC ligand in black seabream *Acanthopagrus schlegelii*: the evolutionary clues of ELR+CXC chemokines[J]. *BMC Immunology*, 2008, 9: 66.
- [20] Green D S, Young H A, Valencia J C. Current prospects of type II interferon γ signaling and autoimmunity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(34): 13925-13933.
- [21] Igawa D, Sakai M, Savan R. An unexpected discovery of two interferon γ -like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals[J]. *Molecular Immunology*, 2006, 43(7): 999-1009.
- [22] Huang Y, Zhang J, Liu J, *et al.* Fish TRIM35 negatively regulates the interferon signaling pathway in response to grouper nodavirus infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 69: 142-152.
- [23] Chen W Q, Xu Q Q, Chang M X, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of the IFN- γ related gene (IFN- γ rel) in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2010, 134(3-4): 199-207.
- [24] Zou J, Carrington A, Collet B, *et al.* Identification and bioactivities of IFN- γ in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 175(4): 2484-2494.
- [25] Furnes C, Seppola M, Robertsen B. Molecular characterisation and expression analysis of interferon- γ in Atlantic cod (*Gadus morhua*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(2): 285-292.
- [26] Mohapatra S, Chakraborty T, Miyagawa S, *et al.* Steroid responsive regulation of IFN- γ 2 alternative splicing and its possible role in germ cell proliferation in medaka[J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2015, 400: 61-70.
- [27] Jung C Y, Hikima J, Ohtani M, *et al.* Recombinant interferon- γ activates immune responses against *Edwardsiella tarda* infection in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(2): 197-203.
- [28] García-Valtánen P, Martínez-López A, Ortega-Villaizán M, *et al.* In addition to its antiviral and immunomodulatory properties, the zebrafish β -defensin 2(zfBD2) is a potent viral DNA vaccine molecular adjuvant[J]. *Antiviral Research*, 2014, 101: 136-147.
- [29] Martínez-López A, García-Valtánen P, Ortega-Villaizán M, *et al.* VHSV G glycoprotein major determinants implicated in triggering the host type I IFN antiviral response as DNA vaccine molecular adjuvants[J]. *Vaccine*, 2014, 32(45): 6012-6019.
- [30] Pereiro P, Martínez-López A, Falco A, *et al.* Protection and antibody response induced by intramuscular DNA vaccine encoding for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G glycoprotein in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(6): 1088-1094.
- [31] Nayak S K, Shibasaki Y, Nakanishi T. Immune responses to live and inactivated *Nocardia seriolae* and protective effect of recombinant interferon- γ (rIFN- γ) against nocardiosis in gibel carp, *Carassius*

- auratus langsdorfii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39: 354-364.
- [32] Velázquez J, Acosta J, Herrera N, *et al.* Novel IFN- γ homologue identified in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) links with immune response in gills under different stimuli[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 71: 275-285.
- [33] Xiang Y, Liu W, Jia P, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of interferon- γ in black seabream *Acanthopagrus schlegelii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 70: 140-148.
- [34] Rao Y, Wan Q, Yang C, Su J. Grass carp Laboratory of genetics and physiology 2 serves as a negative regulator in retinoic acid-inducible gene I- and melanoma differentiation-associated gene 5-mediated antiviral signaling in resting state and early stage of grass carp reovirus infection[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 352.
- [35] Grayfer L, Belosevic M. Molecular characterization, expression and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interferon- γ [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2009, 33(2): 235-246.
- [36] Arts J A, Tijhaar E J, Chadzinska M, *et al.* Functional analysis of carp interferon- γ : evolutionary conservation of classical phagocyte activation[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(5): 793-802.
- [37] Grayfer L, Garcia E G, Belosevic M. Comparison of macrophage antimicrobial responses induced by type II interferons of the goldfish (*Carassius auratus* L.)[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(31): 23537-23547.
- [38] Wiegertjes G F, Wentzel A S, Spaik H P, *et al.* Polarization of immune responses in fish: The 'macrophages first' point of view[J]. Molecular Immunology, 2016, 69: 146-156.
- [39] Chen R N, Su Y Q, Wang J, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of interferon- γ in the large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(2): 596-602.
- [40] Aggad D, Stein C, Sieger D, *et al.* In vivo analysis of Ifn- γ 1 and Ifn- γ 2 signaling in zebrafish[J]. Journal of Immunology, 2010, 185(11): 6774-6782.
- [41] Iliev D B, Skjæveland I, Jørgensen J B. CpG oligonucleotides bind TLR9 and RRM-containing proteins in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. BMC Immunology, 2013, 14: 12.

Immune regulation role of IFN- γ in *Acipenser sinensis*

ZHENG Chuwen¹, YUAN Hanwen¹, TIAN Guangming¹, LI Qian¹,
ZHANG Shuhuan², XU Qiaoqing^{1*}, WEI Qiwei^{2*}

(1. School of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434020, China;

2. Key Lab of Freshwater Biodiversity Conservation Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China)

Abstract: *Acipenser sinensis* belongs to the cartilaginous ichthys, which is between the cartilaginous fishes and teleost fishes. It is an important branch point in the evolutionary tree of the biological immune system. It is a living fossil for the study of the evolution of fish and vertebrates, and plays an extremely important role in the evolutionary history of fish and vertebrates. In order to understand the immunomodulatory effect of *Acipenser sinensis* IFN- γ , IFN- γ sequence was obtained by transcriptome of *Acipenser sinensis*, the recombinant plasmid of pTRI-st-IFN γ was constructed and transformed into the BL21 *Escherichia coli* for expression and expressed in competent prokaryotic cells. SDS-PAGE analysis showed that the size of IFN- γ recombinant protein was 19.17 kd, and the concentration was 0.998 mg/ml. Quantitative PCR showed that the antiviral genes Mx, Viperin, CXCL11-L1, CXCL11-L2 (CXC subfamily of chemokines) and antiviral protein Epithelioma papulosum cyprini cells (EPC) P、N、G was induced, which indicated that IFN- λ activated antiviral activity. Additionally, spring viremia of carp virus (SVCV) replication as well as the production of cytopathic effect (CPE) was significantly inhibited. Results of incubation with *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas intermedia* and *Aeromonas veronii* showed a significant inhibition on their growth and activity. In conclusion, this study provides partial theory for the understanding of IFN- γ bioactivity in *Acipenser sinensis*.

Key words: *Acipenser sinensis*; IFN- γ ; immunoregulation; biological function

Corresponding authors: XU Qiaoqing. E-mail: xuqiaoqing@163.com ; WEI Qiwei, E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

Funding projects: Fund project of Key Laboratory of freshwater biodiversity protection, Ministry of Agriculture