

文章编号: 1000-0615(2001)01-0038-05

## 草鱼 $\gamma$ 样干扰素的体内诱导

邵健忠, 项黎新, 阎春兰

(浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310012)

**摘要:** 采用细胞病变抑制等方法, 在植物凝集素(Phytoagglutinin, PHA) 诱导的草鱼血清中检测到一种干扰素。理化 and 生物学性质鉴定表明, 它不同于病毒诱导的  $\alpha/\beta$  干扰素, 表现在对 56℃、pH2 和 0.1% SDS 敏感, 其活性不能被  $\alpha/\beta$  干扰素抗体所中和, 其诱生剂为非病毒性质的有丝分裂原, 诱生作用受佛波酯(PMA) 和白细胞介素-2 (IL-2) 的调节, 这些特性与人类和高等脊椎动物中报道的  $\gamma$  干扰素相符, 表明是一种  $\gamma$  样性质的干扰素。草鱼  $\gamma$  样干扰素的体内诱导受环境温度、诱导时间、PHA 剂量等因素的影响, 25℃或 30℃水温诱导的干扰素活性明显高于 15℃或 8℃。高剂量(每尾 0.5~0.8mg) PHA 诱导的干扰素活性明显大于低剂量(每尾 0.1~0.3mg), 且达到活性高峰所需要的时间短, 为 3d 而低剂量为 5d。PMA 和 IL-2 能促进草鱼  $\gamma$  样干扰素的诱生。

**关键词:** 草鱼; 植物凝集素;  $\gamma$  样干扰素; 体内诱导

中图分类号: S917 文献标识码: A

### *In vivo* induction of interferon- $\gamma$ like activity from *Ctenopharyngodon idellus* by phytoagglutinin

SHAO Jianzhong, XIANG Lixin, YAN Chunlan

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

**Abstract:** An interferon factor was detected in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) serum, induced *in vivo* with phytoagglutinin by cell pathological effect inhibition technique. Study on its biochemical and biological characteristics showed that it was different from the interferon- $\alpha/\beta$  induced by virus. It was sensitive to heat (56℃), pH2 and 0.1% SDS, and its activity could not be neutralized by the antibody against interferon- $\alpha/\beta$ . It proved that the inducer was mitogen but with non-virus character, and the production could be modulated significantly by the phorbol myristate ester and interleukin-2. All these were consistent with the interferon- $\gamma$  in human, which indicated it was interferon- $\gamma$  like activity. The induction was influenced by the temperature, inducing time and dosage of phytoagglutinin. The activity was higher at the temperature of 25℃ or 30℃ and at phytoagglutinin dosage of 0.5-0.8 mg per fish than that at 8℃ or 15℃ and at that of 0.1-0.3 mg per fish. The inducing time when the activity was the highest was 3 days at high dosage of phytoagglutinin, which was shorter than that of 5 days at low dosage. The interferon induction could be promoted by the phorbol myristate ester and interleukin-2.

**Key Words:** *Ctenopharyngodon idellus*; phytoagglutinin; interferon- $\gamma$  like activity; *in vivo* induction

收稿日期: 2000-07-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39400100, 39970589); 浙江省自然科学基金资助项目(397300)

第一作者: 邵健忠(1963-), 男, 浙江嘉兴人, 博士, 教授, 主要从事鱼类细胞与免疫生物学研究。Tel: 0571-8273287, E-mail: lscshaoj@mail-hz.zj.cn

干扰素(Interferon, IFN)是一种具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等多种生物学功能的细胞因子,在人类和高等脊椎动物中已发现存在 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\omega$ 等不同型别,并开展了深入研究。但鱼类IFN的研究尚处于起步阶段,60年代以来,国内外学者虽曾在鲮(*Pimephales promelas*)、虹鳟(*Salmon gairdneri*)、牙鲮(*Paralichthys olivaceus*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)等鱼类中诱生出IFN<sup>[1-10]</sup>,但所采用的诱生剂大多为病毒,所产生的IFN性质与人类和高等脊椎动物的IFN- $\alpha/\beta$ 相一致。对于鱼类中是否存在其它性质的IFN?近年来,作者对用非病毒诱生剂体内诱导IFN- $\gamma$ 进行了探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验鱼

1~2龄草鱼250余尾,鱼体长15~25cm,体重35~270g,购自杭州市水产研究所,实验前置水簇箱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、肾细胞系CIK、胚胎细胞系CP80、人羊膜细胞株WISH和三角帆蚌肾原代细胞系HcK94由作者实验室保存,猪肾细胞系PK15和鸡胚肾细胞系CEK由浙江省农科院病毒研究所提供,分别按常规法用含10%胎牛血清的TG-199或RPMI-1640培养液培养。

### 1.3 病毒

草鱼出血病病毒(GCHV)、草鱼小RNA病毒(GCPV)、三角帆蚌瘟病病毒(HcPV)、人滤泡性口炎病毒(VSV)、鸡传染性支气管炎病毒(IBV)和马立克氏病疱疹病毒(MDHV)由作者实验室保存;猪水泡病病毒(SVDV)和口蹄疫病毒(FMDV)由浙江省农科院病毒研究所提供,分别在ZC7901、CP80、HcK94、WISH、PK15和CEK细胞上增殖传代,按Reed-Muench法测定滴度TCID<sub>50</sub>。

### 1.4 草鱼 $\gamma$ 样 IFN 的诱导方法

从实验鱼背鳍处皮下注射终浓度为 $0.8\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的纯化植物凝集素(PHA-P, Sigma产品)和 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 佛波酯(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, PMA, Sigma产品)或 $1000\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 重组人白细胞介素2(Interleukin 2, IL-2, Sigma产品),25℃诱导3d,用0.01%高锰酸钾体表消毒后入无菌室,从心脏或尾动脉采血,4℃静置过夜,收集血清样品,-70℃保存备用。同时设注射空白PBS组为对照。

### 1.5 草鱼 $\gamma$ 样 IFN 的活性测定方法

采用半数细胞病变抑制法<sup>[11]</sup>。将细胞接种于96孔板,待生长至单层后除去培养液,加2倍稀释度的血清IFN样品0.1mL,每稀释度接种3孔,27℃过夜,用PBS洗净样品,加100TCID<sub>50</sub>病毒攻击,待病毒对照孔出现细胞病变效应(CPE)后,观察IFN孔的CPE抑制作用。以能抑制50%病变的最高稀释度作为IFN活性单位,用Log<sub>2</sub>CPEI<sub>50</sub>/0.1mL表示。

### 1.6 草鱼 $\gamma$ 样 IFN 的理化和生物学性质测定

#### 1.6.1 理化因子对 $\gamma$ 样 IFN 活性的影响

参照文献[9]的方法进行。测定 $\gamma$ 样IFN经离心、透析、56℃、pH2、0.1%SDS、氯仿、胰蛋白酶、DNase iv、RNase A、葡糖苷酶、NaIO<sub>4</sub>、磷酸酯酶处理前后的活性变化。

#### 1.6.2 DNA 抑制剂对 $\gamma$ 样 IFN 活性的影响

在测定 $\gamma$ 样IFN活性前,先用 $10^{-9}\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 放线菌素D(Act D)预处理细胞8h,然后加入IFN,测定

活性,并与未经 ActD 处理的细胞作比较。

### 1.6.3 草鱼 $\gamma$ 样 IFN 作用的细胞与病毒特异性

参照文献[9]的方法进行。测定草鱼  $\gamma$  样 IFN 在鱼类、人类、哺乳类、鸟类和贝类等细胞和病毒系统中的活性。

### 1.6.4 草鱼 IFN- $\alpha/\beta$ 抗体对 $\gamma$ 样 IFN 活性的中和作用

在  $\gamma$  样 IFN 样品中加入病毒诱导的 IFN- $\alpha/\beta$  兔抗体(作者制备,效价 1:250),37℃温育 1h 后测定活性变化。

## 1.7 草鱼 $\gamma$ 样 IFN 的部分诱生条件

### 1.7.1 PHA 剂量对 $\gamma$ 样 IFN 诱生的影响

将实验鱼分为 5 组,每组 8 尾,分别注射 0.1mg、0.3mg、0.5mg、0.8mg 和 1.0mg PHA-P,25℃各诱导 3d 后测定 IFN 活性。

### 1.7.2 不同 PHA 剂量下 $\gamma$ 样 IFN 诱生的动态测定

将实验鱼分为 4 组,每组 8 尾,分别注射 0.1mg、0.3mg、0.5mg 和 0.8mg PHA-P,25℃分别诱导 1、3、5、7d,测定 IFN 活性。

### 1.7.3 环境温度对 $\gamma$ 样 IFN 诱生的影响

将实验鱼分为 4 组,每组 10 尾,分别饲养在 8℃、15℃、25℃和 30℃水中,注射 0.8mg PHA-P,3d 后测定 IFN 活性。

### 1.7.4 PMA、IL-2 对 $\gamma$ 样 IFN 诱生的影响

实验鱼分 3 组,每组 10 尾,第一组每尾注射 0.8mg PHA-P 和 1 $\mu$ g PMA,第二组每尾注射 0.8mg PHA-P 和 1000U IL-2,第三组每尾只注射 0.8mg PHA-P,25℃分别诱导 3d,比较各组的 IFN 活性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PHA 诱导后草鱼血清中 IFN 的活性测定

从 PHA 诱导的血清样品中,随机抽取 20 份,分别测定其在 ZC7901 和 CIK 细胞中对 GCHV 和 GCPV 的抑制作用。结果显示,所测样品均出现明显的 IFN 保护活性,平均滴度达 7.63  $\pm$  0.54 以上。而未经 PHA 诱导的对照组样品,均未检测到 IFN 活性。表明 PHA 注射草鱼后能有效地诱导 IFN 的合成(表 1)。

表 1 PHA 诱导的草鱼血清 IFN 活性测定

Tab.1 Assay of IFN activity from grass carp serum induced by PHA

病毒	被感染细胞*	干扰素滴度**	
		PHA 诱导组	对照组
GCHV	ZC7901	8.16 $\pm$ 0.63	0
GCHV	CIK	7.94 $\pm$ 0.41	0
GCPV	ZC7901	8.09 $\pm$ 0.46	0
GCPV	CIK	7.63 $\pm$ 0.54	0

注: \* 用 100 TCID<sub>50</sub> GCHV (TCID<sub>50</sub>= 10<sup>5.9</sup>/0.1mL) 和 GCPV (TCID<sub>50</sub>= 10<sup>6.2</sup>/0.1mL) 感染; \*\* X  $\pm$  SD, n= 20,

### 2.2 PHA 诱导的草鱼血清 IFN 的理化和生物学性质

结果显示,PHA 诱导的草鱼 IFN 经 10<sup>5</sup>  $\times$  g 离心不沉降,对 PBS 透析效价不受影响,对胰蛋白酶、糖苷酶、糖氧化剂、热、酸和 0.1% SDS 敏感,对磷酸酯酶、DNase、RNase 和脂溶剂不敏感;用 DNA 抑制剂 ActD 处理细胞,活性消失;在不同的鱼类细胞和病毒系统中具有抗病毒活性,但在人、哺乳类、鸟类和贝类细胞中无抑制病毒作用;用病毒诱导的 IFN- $\alpha/\beta$  抗体进行中和试验,活性无显著变化(表 2~ 4)。这些性质说明 PHA 诱导的草鱼干扰素是一种对酸、热、SDS 等敏感的糖蛋白分子,其抗病毒作用依赖于细胞内 RNA 和蛋白质的合成,即对病毒的抑制机制涉及细胞的转录和转译,具有相对的种属特异性和抗病毒的广谱性,与人类和高等脊椎动物的 IFN- $\gamma$  相符合<sup>[12-13]</sup> 表明是一种  $\gamma$  样性质的干扰素。

表 2 理化因子对 PHA 诱导的草鱼 IFN 活性的影响

Tab. 2 Influence of some physico-chemical factors on the activity of grass carp IFN induced by PHA

理化因子	处理条件	干扰素滴度*	t 检验**
对照		8.15 ± 0.39	
超速离心	100 000g 4℃ 2h	8.12 ± 0.28	$P > 0.05$
透析	PBS 4℃ 12h	8.14 ± 0.23	$P > 0.05$
热	56℃ 2h	3.15 ± 0.62	$P < 0.01$
HCl	pH2.0 4℃ 24h	3.06 ± 0.17	$P < 0.01$
SDS	0.1% SDS 25℃ 1h	3.91 ± 0.25	$P < 0.01$
脂溶剂氯仿	25℃ 1h	8.11 ± 0.35	$P > 0.05$
胰蛋白酶	0.1mg·mL <sup>-1</sup> 37℃ 2h	0	$P < 0.01$
DNase I	0.1mg·mL <sup>-1</sup> 37℃ 2h	8.12 ± 0.29	$P > 0.05$
RNase A	0.1mg·mL <sup>-1</sup> 37℃ 2h	8.10 ± 0.21	$P > 0.05$
$\alpha$ -葡萄糖苷酶	300U·mL <sup>-1</sup> 37℃ 2h	5.37 ± 0.45	$P < 0.01$
糖氧化剂 NaIO <sub>4</sub>	0.02mol·mL <sup>-1</sup> 4℃ 24h	5.02 ± 0.31	$P < 0.01$
碱性磷酸酶	0.15mg·mL <sup>-1</sup> 37℃ 2h	8.14 ± 0.25	$P > 0.05$
酸性磷酸酶	0.15mg·mL <sup>-1</sup> 37℃ 2h	8.10 ± 0.16	$P > 0.05$

注: \* 为  $\bar{X} \pm SD$ , n = 5, 测定系统为 ZC7901-GCHV; \*\* 为与对照组比较。

## 2.3 草鱼 $\gamma$ 样 IFN 部分诱生条件的研究

### 2.3.1 PHA 剂量对 $\gamma$ 样 IFN 诱生的影响

结果显示, 每尾 PHA 剂量为 1.0mg 时对草鱼有毒性, 注射 1d 后实验鱼死亡。而在该剂量以下, 随着 PHA 浓度的增高,  $\gamma$  样 IFN 活性也升高, 说明在致死剂量以下提高 PHA 浓度能促进  $\gamma$  样 IFN 的诱生 (表 5)。

表 3 PHA 诱导的草鱼 IFN 在不同细胞中的  
抗病毒活性测定

Tab. 3 Assay of antiviral activity of grass carp  
IFN induced by PHA in different cell lines

病毒	被感染细胞*	干扰素滴度**
GCHV	ZC7901	8.07 ± 0.44
GCHV	CP80	8.11 ± 0.29
GCHV	CIK	7.89 ± 0.48
GCPV	ZC7901	8.11 ± 0.32
GCPV	CP80	7.93 ± 0.50
GCPV	CIK	7.71 ± 0.36
VSV	WISH	0
SVDV	PK15	0
FMDV	PK15	0
IBV	CEK	0
MDHV	CEK	0
HcPV	HcK94	0

注: \* 用 100 TCID<sub>50</sub> GCHV (TCID<sub>50</sub> = 10<sup>5.9</sup>/0.1mL)、GCPV (TCID<sub>50</sub> = 10<sup>6.2</sup>/0.1mL)、VSV (TCID<sub>50</sub> = 10<sup>8.2</sup>/0.1mL)、SVDV (TCID<sub>50</sub> = 10<sup>7.4</sup>/0.1mL)、FMDV (TCID<sub>50</sub> = 10<sup>7.6</sup>/0.1mL)、IBV (TCID<sub>50</sub> = 10<sup>6.2</sup>/0.1mL)、MDHV (TCID<sub>50</sub> = 10<sup>7.0</sup>/0.1mL) 和 HcPV (TCID<sub>50</sub> = 10<sup>5.4</sup>/0.1mL) 感染; \*\* 为  $\bar{X} \pm SD$ , n = 5。

表 4 PHA 诱导的  $\gamma$  样 IFN 与病毒诱导的  
IFN- $\alpha/\beta$  的抗原特异性分析

Tab. 4 Antigenic characteristic analysis between IFN- $\gamma$   
induced by PHA and IFN- $\alpha/\beta$  induced by virus

IFN 种类	诱生剂	IFN 滴度*		t 检验**
		中和反应前	中和反应后	
IFN- $\gamma$	PHA	8.12 ± 0.21	8.09 ± 0.20	$P > 0.05$
IFN- $\alpha/\beta$	GCHV	10.94 ± 0.26	1.62 ± 0.28	$P < 0.01$

注: \*  $\bar{X} \pm SD$ , n = 5; \*\* 中和反应前后相比较。

表 5 PHA 剂量对  $\gamma$  样 IFN 诱生的影响

Tab. 5 Influence of PHA concentrations on the induction  
of interferon- $\gamma$  like activity

PHA 剂量(mg·尾 <sup>-1</sup> )	IFN 活性*
0.1	3.12 ± 0.56
0.3	5.13 ± 0.29
0.5	6.40 ± 0.31
0.8	7.22 ± 0.19
1.0	death

注: \*  $\bar{X} \pm SD$ , n = 8, 测定系统为 ZC7901-GCHV。

### 2.3.2 不同 PHA 剂量条件下 $\gamma$ 样 IFN 诱生的动态变化

$\gamma$  样 IFN 的诱生活性不仅与 PHA 剂量有关,而且还与诱导时间有关(表 6)。低剂量(0.1~0.3mg) PHA 诱生所需的时间长,5d 达到高峰,而 PHA 剂量增高至 0.5~0.8mg,诱导时间缩短,3d 达到高峰。

### 2.3.3 环境温度对 $\gamma$ 样 IFN 诱生的影响

结果表明,25℃和 30℃水温下诱导的  $\gamma$  样 IFN 活性明显高于 8℃和 15℃,说明较高的环境温度有利于  $\gamma$  样 IFN 的诱生(表 7)。

### 2.3.4 PMA、IL-2 对 $\gamma$ 样 IFN 诱生的影响

PHA 和 PMA 或 IL-2 联合注射组的  $\gamma$  样 IFN 活性均明显高于未联合注射的对照组,说明 PMA 和 IL-2 对  $\gamma$  样 IFN 的诱生有促进作用(表 8)。

## 3 结语

作者等曾用病毒作为诱生剂,在草鱼及其培养细胞中诱生出  $\alpha/\beta$  性质的干扰素<sup>[9-10]</sup>,本文则以 PHA 为诱生剂,体内诱导草鱼产生了  $\gamma$  样干扰素。两种不同诱生剂诱导的干扰素在理化和抗原性质上存在很大差异,表明是两类不同的干扰素。研究结果对深入探讨鱼类干扰素的性质与功能以及干扰素的分子进化具有理论意义。

本研究承蒙毛树坚教授大力指导,谨致谢忱。

## 参考文献:

- [1] Gravell M, Malsberger R G. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Ann N Y Acad Sci, 1965, 126: 555-565.
- [2] Beasley A R, Sigel M M, Clem L W. Latent infection in marine fish cell tissue cultures [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1966, 121: 1169-1174.
- [3] Oie H K, Loh P C. Reovirus type 2: Induction of viral resistance and interferon production in Fathead minnow cells [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1971, 136: 369-373.
- [4] De-Kinkelin P, Dorson M. Interferon production in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus [J]. J Gen Viral, 1973, 19: 125-127.
- [5] Roge+Gaillard C, Chilmonczyk S, De-Kinkelin P. *In vitro* induction of interferon-like activity from Rainbow trout leucocytes stimulated by Egtved virus [J]. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3(5): 383-394.
- [6] Tamai T, Shirahata S, Sato N, et al. Purification and characterization of interferon-like antiviral protein derived from flatfish (*Paralichthys olivaceus*) lymphocytes immortalized by oncogenes [J]. Cytotechnology, 1993, 11(2): 121-131.
- [7] 江育林, 李正秋. 病毒诱导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.
- [8] 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.
- [9] 邵健忠, 钱凯先, 项黎新, 等. 病毒诱导草鱼产生干扰素活性因子的研究 [J]. 病毒学报, 1998, 18(4): 135-145.
- [10] 邵健忠, 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): 350-360.
- [11] 侯云德. 病毒基因工程原理与方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 245-247.
- [12] Sidney P. Methods in Enzymology (Vol. 78) [M]. New York: Academic Press, 1981. 3-8.
- [13] 侯云德. 分子病毒学 [M]. 北京: 学苑出版社, 1990. 598-647.

表 6 不同 PHA 剂量下  $\gamma$  样 IFN 诱生的动态变化

Tab. 6 Kinetic determination of IFN- $\gamma$  like activities at different concentrations of PHA

诱导时间 (d)	PHA (mg)			
	0.1	0.3	0.5	0.8
1	2.33±0.21	3.94±0.23	5.42±0.18	5.96±0.41
3	3.09±0.17	5.15±0.30	6.48±0.21	7.23±0.25
5	3.78±0.32	6.05±0.25	5.40±0.22	6.78±0.27
7	3.76±0.23	5.94±0.33	4.98±0.32	5.86±0.34

注: \* X±SD, n=8, 测定系统为 ZC7901-GCHV。

表 7 环境温度对  $\gamma$  样 IFN 诱生的影响

Tab. 7 Influence of temperature on the induction of IFN- $\gamma$  like activity

温度(℃)	8	15	25	30
IFN 活性*	5.02±0.31	5.42±0.27	7.19±0.36	7.12±0.44

注: \* X±SD, n=10, 测定系统为 ZC7901-GCHV。

表 8 PMA、IL-2 对  $\gamma$  样 IFN 诱生的影响

Tab. 8 Influence of PMA and IL-2 on the induction of IFN- $\gamma$  like activity

组别	IFN 活性*	T 检验**
对照(PHA)	7.11±0.15	
PHA+PMA	8.21±0.20	P<0.01
PHA+IL-2	8.14±0.16	P<0.01

注: \* X±SD, n=10, 测定系统为 ZC7901-GCHV; \*\* 为与对照组比较。