



大黄鱼 *ATG5* 基因的分子特征及促进病毒增殖的作用

魏祖运, 王 珊, 李婉茹, 王胜蓝, 陈玉红,
母尹楠*, 陈新华*

(福建农林大学海洋学院, 福建省海洋生物技术重点实验室, 福建 福州 350002)

摘要: 为探究大黄鱼自噬相关基因 5 (*LcATG5*) 在病毒感染中免疫应答中的作用, 本实验从大黄鱼中克隆得到了自噬相关基因 *ATG5* (*LcATG5*), 其开放阅读框 (ORF) 全长 828 个核苷酸, 编码 275 个氨基酸的蛋白质, 预测的分子量为 32.3 ku, 等电点为 5.7。氨基酸序列比对和系统进化分析结果显示, *LcATG5* 与其他物种 *ATG5* 之间的序列一致性较高, 含有 1 个高度保守的 *APG5* 结构域, 并且与棘头梅童鱼 *ATG5* 的亲缘关系最近。荧光定量 PCR 结果显示, *LcATG5* 在所检测的 11 个组织或器官中均有表达, 在血液中表达量最高, 在脾脏中表达量最低; *LcATG5* 在来源于大黄鱼头肾组织的原代粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞以及细胞系 LYCK 细胞中也均有表达, 在原代粒细胞中表达量相对较高, 而在巨噬细胞中相对较低; 病毒类似物 poly(I:C) 刺激后, 这 4 种免疫细胞中 *LcATG5* 的表达水平都显著上调, 其在 LYCK 细胞中变化最为显著, 刺激后 12 h 上调了 3.93 倍。过表达 *LcATG5* 的鲤上皮瘤 (epithelioma papulosum cyprini, EPC) 细胞受鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV) 感染 48 h 后, 细胞病变效应 (cytopathic effects, CPE) 明显高于对照组, 细胞培养上清中 SVCV 的滴度为 $10^{13.82}$ TCID₅₀/mL, 高于对照组 $10^{9.27}$ TCID₅₀/mL, 同时细胞内 SVCV 标志基因 *SVCV-G*、*SVCV-M* 和 *SVCV-P* 的表达量分别上调了 13.77 倍、15.72 倍和 11.39 倍, 表明 *LcATG5* 过表达促进了 EPC 细胞中 SVCV 病毒增殖, 上述结果为深入研究自噬和自噬相关基因在鱼类病毒感染过程中的作用及机制奠定了基础。

关键词: 大黄鱼; 自噬相关基因 5 (*ATG5*); 免疫细胞; 病毒增殖

中图分类号: S 942.3

文献标志码: A

自噬 (autophagy) 广泛存在于真核细胞中, 是细胞自我保护、存活、更新、物质再利用和维持体内平衡的重要机制^[1-2]。自噬的基本过程包括双层膜结构自噬体的形成、自噬体与溶酶体融合和自噬体降解^[3]。自噬体形成过程受到多种基因的调控, 这些基因被称为自噬相关基因 (autophagy-related gene, ATG)^[4]。到目前为止, 已经在酵母

中鉴定了 30 多种自噬特异性调控基因, 其中 *ATG5* 作为自噬泛素化过程的调节基因, 在自噬体形成早期发挥重要作用^[5]。*ATG5* 可以结合 *ATG12* 和多聚蛋白 *ATG16* 形成 *ATG12-ATG5-ATG16* 复合物, 该复合物有利于自噬小体的延伸^[6-7]。*ATG5* 复合物还能够与自噬囊泡膜结合, 促进 *LC3* (*ATG8*) 向自噬囊泡聚集^[8]。*ATG5* 蛋白水平的升高或降低

收稿日期: 2021-09-01 修回日期: 2021-10-14

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0900600); 国家自然科学基金 (U1905204, 32073007); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-47); 福建农林大学“双一流”建设科技创新能力提升培育计划 (KSYLP001)

第一作者: 魏祖运 (照片), 从事鱼类免疫学研究, E-mail: 727819095@qq.com

通信作者: 母尹楠, 从事鱼类免疫学研究, E-mail: muyinnan@163.com;

陈新华, 从事水产动物免疫学与病害控制研究, E-mail: chenxinhua@tio.org.cn



直接影响自噬通路, 敲低 ATG5 能特异性地阻断自噬体的形成^[9-10]。

自噬作为细胞维持自稳定的一种自我保护机制, 在病毒复制过程中发挥重要作用。已有研究报告, 病毒感染会导致自噬体积聚, 并利用自噬体的双层膜状结构作为“病毒工厂”^[11]。受小鼠 (*Mus musculus*) 肝炎病毒 (mouse hepatitis virus, MHV) 感染的细胞, 自噬体的双层膜中可以检测到病毒成分, 病毒 RNA 在双层膜小泡上完成了复制和转录^[12]。目前, 关于自噬在鱼类病毒感染中的功能研究仍相对较少。传染性鲑鱼贫血症病毒 (infectious salmon anaemia virus, ISAV) 感染会诱导大西洋鲑 (*Salmo salar*) 细胞发生自噬, 利用 3-甲基腺嘌呤抑制自噬显著抑制了 ISAV 的复制, 说明自噬对于 ISAV 复制具有促进作用^[13]。Liu 等^[14]研究发现, 鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV) 感染增强了宿主细胞的自噬活性, 而自噬促进了宿主细胞中 SVCV 增殖。然而, 也有研究报告自噬发挥抗病毒作用, 例如雷帕霉素诱导的自噬抑制了鲤上皮瘤 (epithelioma papulosum cyprini, EPC) 细胞内传染性造血器官坏死病毒 (infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV) 的复制和细胞外病毒的产生, 而使用抑制剂阻断自噬过程则加剧了病毒感染效应, 说明自噬在 IHNV 感染中发挥抗病毒作用^[15]。

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国重要的海水经济鱼类, 随着大黄鱼养殖业的快速发展, 由病毒、细菌和寄生虫引发的疾病频繁暴发, 给大黄鱼产业造成了巨大的经济损失^[16-17]。因此, 解析大黄鱼应对病原感染的免疫应答机制将有助于制定有效的病害防治措施。本研究克隆并鉴定了大黄鱼 ATG5 (*LcATG5*) 基因, 研究了 *LcATG5* 在正常大黄鱼组织和免疫细胞中的表达水平及该蛋白对鱼类病毒增殖的影响, 本能实验为阐明 ATG5 在鱼类病毒感染中的功能及其机制提供了基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用大黄鱼体长 (21.0 ± 1.8) cm, 体重 (105.0 ± 13.5) g 购自宁德市富发水产有限公司, 将随机挑选的大黄鱼置于 3 t 养殖桶中适应性养殖 10 d, 水温为 25 °C 左右, 使用增氧设备不间断曝气, 每天早晚各换水 1 次。采集健康大黄鱼的血液、鳃、脑、头肾、皮肤、肌肉、脾脏、肝脏、

胃、心脏、肠等组织或器官立即置于液氮中速冻, 保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。本研究获得了福建农林大学实验动物管理和使用伦理委员会批准 (PZCASFAFU2019019), 实验过程中操作人员严格遵守福建农林大学伦理规范, 并按照福建农林大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 细胞与病毒

取健康大黄鱼的头肾组织, 置于 70 μ m 细胞滤网上轻轻研磨, 用含 1% 肝素钠的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 冲洗制成细胞悬液, 再将细胞悬液添加到 34%/51% Percoll 溶液上, 4 °C, 650 \times g 离心 30 min。离心后, 吸取中间细胞层, 使用 L-15 培养基洗涤 3 次, 再使用 5 mL L-15 培养基重悬细胞, 按照每孔 2.0×10^6 个细胞接种到 6 孔板, 28 °C 培养 2 h, 分别收集悬浮的原代淋巴细胞和贴壁的原代巨噬细胞。将研磨后制成的细胞悬液加到 51% Percoll 溶液上, 4 °C, 650 \times g 离心 30 min, 收集离心管底部的大黄鱼原代粒细胞。

大黄鱼头肾细胞系 (LYCK) 和 EPC 细胞保存于本实验室, 使用 L-15 细胞培养基 (含 10% FBS) 进行培养, 培养温度为 28 °C^[18]。SVCV 原液保存于本实验室。

1.3 *LcATG5* 基因克隆

从大黄鱼基因组数据库中查找到 *LcATG5* 基因的编码序列, 根据预测序列设计引物 *LcATG5*-F 和 *LcATG5*-R (表 1), 用于扩增 *LcATG5* 基因的开放阅读框 (ORF)。以大黄鱼脾脏总 RNA 反转录得到的第一链 cDNA 为模板, 使用 EasyPfu DNA 聚合酶 (北京全式金生物技术有限公司) 进行 PCR 扩增, 反应体系: cDNA 模板 1 μ L, EasyPfu 1 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, dNTP Mix 4 μ L, 10 \times PCR Buffer 5 μ L, 无菌水 37 μ L; 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物回收后与载体 pMD20-T 连接后, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , 挑取阳性克隆进行测序。

1.4 生物信息学分析

从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中检索了其他物种 ATG5 的氨基酸序列 (表 2), 再使用 NCBI 中的 BLAST 工具进行氨基酸序列一致性分析。使用 DNAMAN 8.0 软件进行氨基酸多序列比对, 并使用 BOXSHADE 进行着色。使用 Simple

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer information

引物名称 primers name	引物序列 (5'-3') sequences (5'-3')
<i>LcATG5</i> -F	ATGGCAGATGACAAGGACGT
<i>LcATG5</i> -R	TCAGTCGGTG GGGGTC
<i>LcATG5</i> -F1	ACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTCGCCACCATGGCAGATGACAAGGACGT
<i>LcATG5</i> -R1	GGGCCCAAGCTTGGTACCGTCGGTGGGGGTCGGGATGA
RT- <i>LcATG5</i> -F	AGGACGTGGAGGAGATGTGGTTC
RT- <i>LcATG5</i> -R	GTAAGACGGTGTGGAGGCATGG
RT- <i>Lcβ-actin</i> -F	GACCTGACAGACTACCTCATG
RT- <i>Lcβ-actin</i> -R	AGTTGAAGGTGGTCTCGTGGA
RT- <i>SVCV</i> -G-F	CGACCTGGATTAGACTTG
RT- <i>SVCV</i> -G-R	AATGTTCCGTTTCTCACT
RT- <i>SVCV</i> -M-F	TACTCCTCCCACTTACGA
RT- <i>SVCV</i> -M-R	CAAGAGTCCGAGAAGGTC
RT- <i>SVCV</i> -P-F	TTGACCTGGGATAGTGA
RT- <i>SVCV</i> -P-R	CTTGCTTGGTTTGTGGG
RT-EPC- <i>actin</i> -F	TGTTCCAGCCATCCTTCTTG
RT-EPC- <i>actin</i> -R	TGATTTTCATTGTGCTGGGG

表 2 大黄鱼与其他物种 ATG5 氨基酸序列一致性分析

Tab. 2 Identities between *L. crocea* ATG5 and other known ATG5 proteins

物种名 species name	一致性/% identity	登录号 accession no.
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	100.00	XP_027142857.1
棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i>	98.55	TKS82636.1
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	96.73	XP_018531592.1
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	96.00	XP_030250223.1
鞍带石斑鱼 <i>Epinephelus lanceolatus</i>	94.55	XP_033497533.1
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	94.18	XP_003450322.1
黄鲈 <i>Perca flavescens</i>	92.73	XP_028435966.1
大西洋鲑 <i>S. salar</i>	90.18	NP_001167283.1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	89.45	XP_021414563.1
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	86.55	QEP54806.1
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	86.18	AHZ89832.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	86.18	NP_991181.2
牛 <i>Bos taurus</i>	81.52	NP_001029751.2
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	81.16	NP_001006409.1
智人 <i>Homo sapiens</i>	80.80	AAH02699.1
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	80.52	NP_001016445.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	80.43	NP_444299.1

Modular Architecture Research Tool (SMART) 分析蛋白结构域。使用 MEGA6.0 软件的邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统进化树。

1.5 *LcATG5* 在大黄鱼组织和免疫细胞中的表达分析

提取上述组织、器官或免疫细胞的总 RNA,

反转录 cDNA 为模板, 利用针对 *LcATG5* 基因的特异性引物 RT-*LcATG5*-F 和 RT-*LcATG5*-R(表 1), 并以大黄鱼 β -*actin* 基因作为内参基因, 进行荧光定量 PCR 反应, 检测 *LcATG5* 在健康大黄鱼组织、器官和免疫细胞中的表达水平。荧光定量 PCR 反应体系: 2 \times SYBR Green I 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.1 μ L, cDNA 模板 0.2 μ L, 无菌水 9.6

μL 。反应条件: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 2 min, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s, $57\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 20 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 20 s, 共 40 个循环。*LcATG5* 的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算^[19], 并用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。

将分离的大黄鱼头肾原代巨噬细胞、淋巴细胞和粒细胞以及 LYCK 细胞接种于 6 孔板内 (2.0×10^6 个/孔), $28\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 3 h 后, 使用终浓度为 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 poly(I:C)(Sigma-Aldrich, 美国) 刺激细胞, 无菌 PBS 处理的细胞作为对照, 分别于刺激后 4、8、12、24 和 48 h 收集细胞, 再利用荧光定量 PCR 分析 *LcATG5* 的表达变化。

1.6 蛋白质免疫印迹

将 *LcATG5* 的 ORF 序列插入到真核表达载体 pcDNA3.1(Invitrogen, 美国) 的 *EcoR* I 和 *Kpn* I 两个酶切位点之间, 得到重组质粒 pcDNA3.1-*LcATG5*。将 EPC 细胞 (1×10^6 个/孔) 接种于 6 孔板后过夜培养, 再使用 Fugene HD 转染试剂 (Promega, 美国) 将 $2\text{ }\mu\text{g}$ 重组质粒 pcDNA3.1-*LcATG5* 或对照质粒 pcDNA3.1 转染 EPC 细胞, 24 h 后收集细胞, 使用细胞裂解缓冲液 (碧云天生物技术, 中国) 裂解细胞, $4\text{ }^\circ\text{C}$, $14\ 000 \times g$ 离心 15 min, 收集上清液。上清内蛋白经 15% SDS-PAGE 电泳后, 转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 室温下在含有 5% (质量体积比) 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中封闭 1 h, 再与小鼠抗 6×His 标签的单克隆抗体 (1 : 2 000; Thermo Fisher, 美国) 孵育 1 h, 使用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 然后与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG(H+L) 多克隆抗体 (1 : 4 000; Thermo Fisher, 美国) 孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤后, 最后使用化学发光检测试剂 (NCM Biotech, 中国) 进行显色。

1.7 病毒感染实验

将 EPC 细胞 (1×10^6 个/孔) 接种于 6 孔板后过夜培养, 使用 Fugene HD 转染试剂将 $2\text{ }\mu\text{g}$ 重组质粒 pcDNA3.1-*LcATG5* 或 pcDNA3.1 转染 EPC 细胞, 24 h 后, 每孔加入 $1\text{ mL } 10^6\text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ SVCV 感染细胞, 1 h 后移除病毒, 加入含 10% 胎牛血清的 L-15 培养基培养细胞。分别于感染后 12 和 24 h 在显微镜下观察细胞病变效应, 并使用含 1% 结晶紫的溶液对细胞进行染色; 同时于感染后 24 h 收集细胞培养上清检测病毒滴度, 于感染后 12 和 24 h 收集细胞提取总 RNA, 采用荧光定量 PCR 检测 SVCV 糖蛋白基因 (*SVCV-G*)、基质

蛋白基因 (*SVCV-M*) 和磷蛋白基因 (*SVCV-P*) 的表达水平, 内参为鲤 β -actin 基因。

2 结果

2.1 大黄鱼 *ATG5* 基因的分子特征与进化分析

LcATG5 (GenBank 登录号: XM_027287056.1) 的 ORF 全长为 828 个核苷酸, 编码 275 个氨基酸的蛋白质 (图 1), 其预测分子量为 32.32 ku, 理论等电点为 5.7。与其他物种 *ATG5* 氨基酸序列相似, *LcATG5* 含有 1 个高度保守的 APG5 结构域 (第 79~270 位氨基酸), 并具有典型的泛素连接酶特征, 包括 2 个泛素样结构域 (ubiquitin-like domain), 分别位于第 16~105 位和第 185~273 位氨基酸, 1 个富螺旋结构域 (helix-rich domain; 第 121~171 位氨基酸) 和 1 个保守的钙蛋白酶切割位点 (calpain cleavage site; 第 188~196 位氨基酸; 图 2)。此外, *LcATG5* 序列中还发现了与 *ATG12* 结合的位点 Lys¹⁴⁹ (图 2)。序列一致性分析发现, *LcATG5* 与其他鱼类 *ATG5* 序列的一致性较高, 约为 86.18%~98.55%, 但是与哺乳类、两栖类、爬行类和鸟类同源基因的一致性相对较低, 为 80.43%~81.52% (表 2)。系统进化分析显示, 鱼类 *ATG5* 聚成一簇, 远离两栖类、鸟类和哺乳类组成的分支, 其中 *LcATG5* 与棘头梅童鱼 *ATG5* 的亲缘关系最近 (图 3)。

2.2 *LcATG5* 在大黄鱼不同组织和细胞中的表达特征

LcATG5 在所有检测的组织或器官中均有表达, 在血液中表达量最高, 在脾脏中表达量最低 (图 4-a)。此外, *LcATG5* 在所检测的免疫细胞中也都表达, 相对表达水平最高的细胞是原代粒细胞, 其次是原代淋巴细胞和 LYCK 细胞, 最低的是原代巨噬细胞 (图 4-b)。Poly(I:C) 刺激后, *LcATG5* 在这 4 种免疫细胞中的转录水平都发生了显著上调, 在 LYCK 细胞和原代淋巴细胞中的表达量都是在处理后 12 h 达到峰值, 分别是对照组的 3.93 和 1.43 倍 (图 5-a, c); *LcATG5* 在原代巨噬细胞中的表达量从刺激后 12 h 开始上调, 在 48 h 达到峰值, 是对照组的 1.57 倍 (图 5-b), 而其在原代粒细胞中的表达量在 12 h 达到峰值, 是对照组的 2.73 倍 (图 5-d)。

2.3 *LcATG5* 过表达促进 SVCV 病毒的复制

为了确定 *LcATG5* 在病毒感染过程中的作用, 我们在 EPC 细胞中过表达 *LcATG5*, 然后使用

```

1 ATGGCAGATGACAAGGACGTGTTGAGAGACGTTTGGTTTGGTCGGATCCCCACCTGCTTC
1 M A D D K D V L R D V W F G R I P T C F
61 ACCCTGAACCAGGATGAGGTTACAGAGAGAGAGGCTGAGCCTTACTATCTGCTTTTACCC
21 T L N Q D E V T E R E A E P Y Y L L L P
121 AGGGTGAGCTACCTGACTCTGGTCACAGACAAAGTGAAGAAACACTTCTCAAAGTGATG
41 R V S Y L T L V T D K V K K H F L K V M
181 AAGGCAGAGGACGTGGAGGAGATGTGGTTCGAGTACGAAGGGACGCCGCTGAAATGGCAC
61 K A E D V E E M W F E Y E G T P L K W H
241 TATCCAATCGGAGTCTGTTCGACCTCCATGCCTCCAACACCGTCTTACCCTGGAGTATC
81 Y P I G V L F D L H A S N T V L P W S I
301 ACTGTGCACTTTAAGAATTTCCAGACCGTGACCTGCCTCCACTGCCCGTCCAGCTCCGTT
101 T V H F K N F P D R D L L H C P S S S S V
361 ATCGAGGCTCACTTCATGTCCAGCATCAAGGAGGCCGACGCCCTCAAGCACAAAGAGCCAA
121 I E A H F M S S I K E A D A L K H K S Q
421 GTCGTCAATGACATGCAGAAGAAAGACCACAAGCAGCTGTGGATGGGCTGCAGAACGAT
141 V V N D M Q K K D H K Q L W M G L Q N D
481 AAGTTTGACCAGTTCTGGGCCATGAACAGGAAGCTGATGGAGTATTCACCAGGAGGACGGA
161 K F D Q F W A M N R K L M E Y S T E D G
541 GGCTTAGATACATCCCTTCAGGATATACCAGACGATGAGTGACAGGCCATTCATCCAG
181 G F R Y I P F R I Y Q T M S D R P F I Q
601 AAGCTGTTTCGCCCGTTTACCTGAAGGCAACGTGCACACACTCGGCGACCTGCTGAAA
201 K L F R P V S P E G N V H T L G D L L K
661 GAGATGTACCCGACTGCTTTACCAAACGACGGTGAGCCGAAAGCGTTACCAGGTGGTGATC
221 E M Y P T A L P N D G E P K R Y Q V V I
721 CACGGCATCGAGCCTCTGCTCGAGACTCTCTGCAGTGGCTCAGCGAACACCTCAGCCAC
241 H G I E P L L E T P L Q W L S E H L S H
781 CCTGACAACCTCTGCACATCTGTATCATCCCGACCCCAACCGACTGA
261 P D N F L H I C I I P T P T D *
    
```

图 1 大黄鱼 *ATG5* 核苷酸与氨基酸序列特征

“*”表示终止密码子，灰色阴影指示保守的 APG5 结构域。

Fig. 1 The nucleotide and amino acid sequence characteristics of *LcATG5*

Terminational codon is indicated by “*” and APG5 domain is shaded by gray.

SVCV 感染 EPC 细胞，检测 *LcATG5* 过表达对 SVCV 复制的影响。结果显示，在 EPC 细胞中能够检测到 *LcATG5* 蛋白表达 (图 6-a)，SVCV 感染 12 和 24 h 后，*LcATG5* 的表达水平显著上调 (图 6-b)；过表达 *LcATG5* 的 EPC 细胞中的细胞病变效应 (CPE) 明显多于对照组 (图 7-a)，并且细胞经结晶紫染色后也显示出相似的结果 (图 7-b)；同时过表达 *LcATG5* 的 EPC 细胞培养上清液中 SVCV 滴度为 $10^{13.82}$ TCID₅₀/mL，显著高于对照组 $10^{9.27}$ TCID₅₀/mL (图 7-c)，细胞内 SVCV 标志基因 *SVCV-G*、*SVCV-M* 和 *SVCV-P* 的表达水平也显著高于对照组，在 24 h 时分别是对照组的 13.83、15.72 和 11.39 倍 (图 7-d~f)。上述结果表明，*LcATG5* 促进了 EPC 细胞中 SVCV 的复制。

3 讨论

自噬是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖性降解途径，在维持细胞存活、更新、物质再利用和内环境稳定中起着重要作用。自噬在病毒感染过程中也发挥着重要作用，可以将细胞质

内的病毒颗粒转运到溶酶体，利用溶酶体清除病毒，也可以将病毒转运给细胞内感受器或 MHC II 类分子激活先天性或适应性免疫应答^[20]。自噬在病毒感染中的作用具有双重性，一方面自噬能够降解入侵的病毒，另一方面有些病毒能够利用自噬的过程进行复制、增殖^[21]，这取决于病毒和细胞的类型以及细胞所处环境^[11, 22]。目前关于自噬和自噬相关基因 (ATG) 在鱼类病毒感染过程中报道还相对较少。我们前期的研究发现，大黄鱼自噬相关基因 *Beclin-1* 通过诱导自噬或负调控 I 型干扰素反应促进病毒复制^[23]。本研究从大黄鱼中克隆了 *ATG5* 基因 (*LcATG5*)，其 ORF 全长为 828 个核苷酸，编码一个含有 275 个氨基酸的蛋白质，具有 1 个保守的 APG5 结构域和典型的泛素连接酶特征，包括 2 个泛素类结构域和 1 个富螺旋结构域，这三个结构域相互作用形成凹槽，再与 ATG16 氨基端的螺旋结构结合^[6]。*LcATG5* 序列中还包含 1 个 calpain 切割位点，其基序与草鱼和斑马鱼的相同，该位点经过 calpain 选择性剪切，ATG5 可在该位点分割成两种形式，分别作为分子开关引导细胞进入自噬或凋亡^[24]。此外，与黄

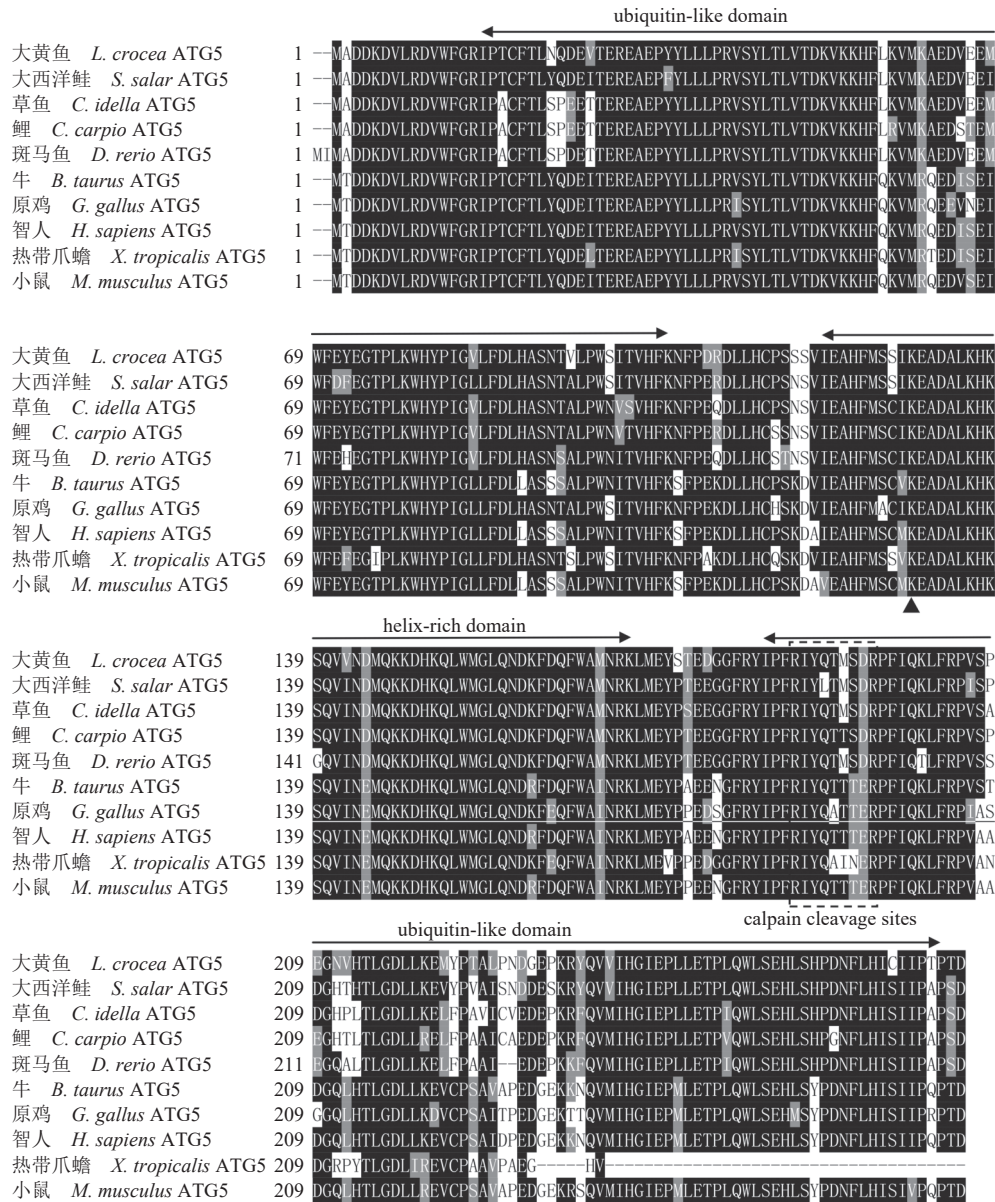


图2 大黄鱼 ATG5 与其他物种 ATG5 氨基酸序列比对

序列上方的箭头指示 ATG5 保守的结构域, 包括 2 个泛素样结构域 (ubiquitin-like domain) 和 1 个富螺旋结构域 (helix-rich domain)。黑色虚线方框指示钙蛋白酶裂解位点 (calpain cleavage)。黑色三角 ▲ 标出的赖氨酸残基为 ATG12 偶联位点。

Fig. 2 Alignment of ATG5 amino acid sequences from *L. crocea* and other vertebrates

Arrows above the sequences represent the conserved domains of ATG5, including two ubiquitin-like domains and a helix-rich domain. The calpain cleavage site is boxed by black dotted line and a lysine residue as the conjugation site for ATG12 is indicated by ▲.

鲮鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)ATG5 结构类似, *LcATG5* 存在保守的 Lys-149, 能够与 ATG12 的 Gly-186 偶联, 这是自噬小体形成的关键步骤^[25]。系统进化分析显示, *LcATG5* 与其他鱼类 ATG5 处于硬骨鱼类分支中, 表明本研究克隆得到的 *LcATG5* 确实为 ATG5 的同源基因, 并且 *LcATG5* 与棘头梅童鱼 ATG5 的序列一致性最高, 为 98.55%。综上所述表明 *LcATG5* 在进化过程中保留了保守的结构特征, 也预示了其功能的保守性。

LcATG5 在所有检测的组织或器官中呈组成型表达, 这种组成型表达模式在其他鱼类, 如石斑鱼、黄鲮鱼和草鱼中都有报道, 说明自噬是在鱼体内是一个普遍的过程, 可能与各个组织的生理功能密切相关。进一步比较分析发现, *LcATG5* 在大黄鱼血液中的表达量最高, 在脾脏中的表达量最低, 这与石斑鱼、黄鲮鱼和草鱼中报道的结果明显不同, 石斑鱼和黄鲮鱼 ATG5 都是在脑组织中的表达量相对较高^[26-27], 而草鱼 ATG5 的表达

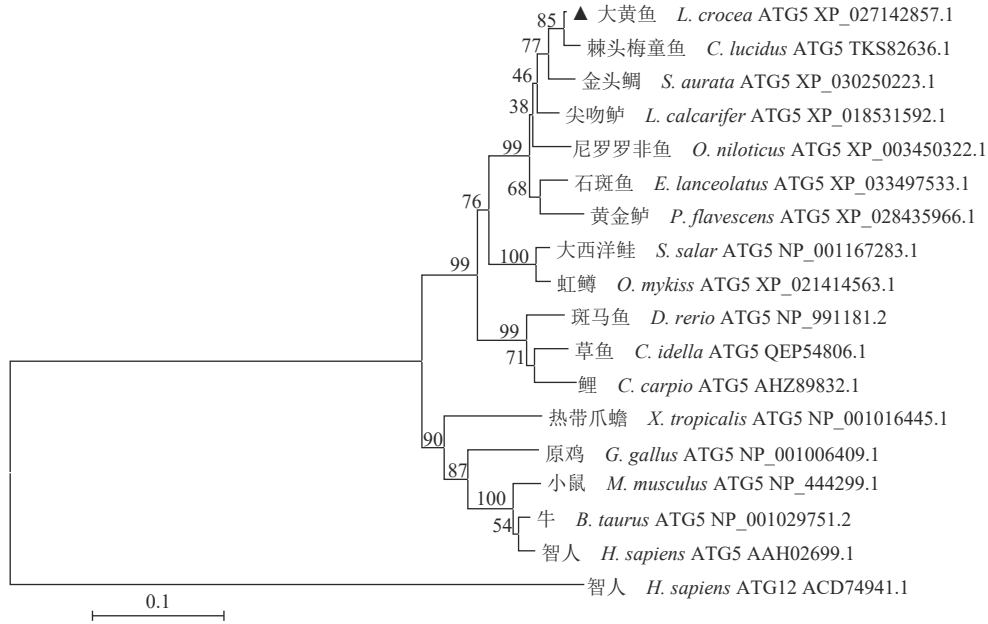


图 3 邻接法构建的 ATG5 系统进化树

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree constructed based on ATG5 amino acid sequences

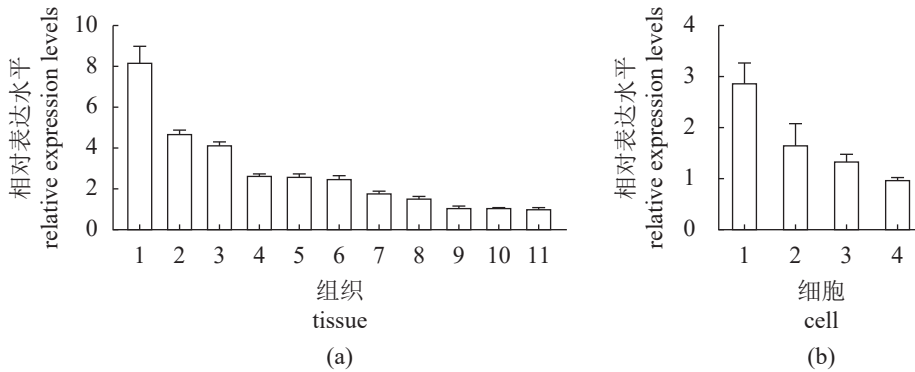


图 4 *LcATG5* 在大黄鱼组织/器官和免疫细胞中的表达模式

(a) *LcATG5* 在大黄鱼组织/器官中的表达谱。1. 血液, 2. 肌肉, 3. 肠, 4. 鳃, 5. 脑, 6. 心脏, 7. 肝脏, 8. 皮肤, 9. 胃, 10. 头肾, 11. 脾脏;
 (b) *LcATG5* 在大黄鱼免疫细胞中的表达谱。1. 原代头肾粒细胞, 2. 原代头肾淋巴细胞, 3. 大黄鱼头肾细胞系 (LYCK), 4. 原代头肾巨噬细胞。

Fig. 4 Expression profiles of *LcATG5* in tissues/organs and immune cells

(a) Relative expression levels of *LcATG5* transcripts in different tissues of *L. crocea*. 1. blood, 2. muscle, 3. intestine, 4. gills, 5. brain, 6. heart, 7. liver, 8. skin, 9. stomach, 10. head kidney, 11. spleen; (b) relative expression levels of *LcATG5* in immune-related cells of *L. crocea* 1. primary head kidney granulocytes, 2. primary head kidney lymphocytes, 3. *L. crocea* head kidney cell line (LYCK), 4. primary head kidney macrophages.

量在鳃组织中相对较高, 在中肾部位表达量较低^[28], 上述结果表明, 不同鱼类中 *ATG5* 的组织分布模式存在明显差异, 可能是由于鱼种差异或生存环境不同导致的。此外, *LcATG5* 基因在原代巨噬细胞、淋巴细胞和粒细胞以及 LYCK 细胞中也均有表达, 提示 *LcATG5* 可能参与大黄鱼免疫应答过程。

ATG5 启动双膜囊泡形成是自噬过程的重要步骤, *ATG5* 在病毒复制过程中的功能在哺乳类中已经被证实^[29]。目前在鱼类中的研究相对较少,

赤点石斑鱼神经坏死病毒 (RGNNV) 和石斑鱼虹彩病毒 (SGIV) 感染后, 石斑鱼 *ATG5* 的转录水平显著升高^[26]; 病毒类似物 poly (I:C) 刺激 24 h, 草鱼 CIK 细胞中 *ATG5* 的表达水平也显著上调^[28]。在本研究中, poly (I:C) 处理后, *LcATG5* 在大黄鱼 4 种免疫细胞中的表达水平均显著上升, 表明鱼类 *ATG5* 可能在病毒感染过程中发挥作用。进一步研究发现, 过表达 *LcATG5* 可显著增加了 SVCV 感染引起的 CPE 现象, 同时感染细胞培养上清液中 SVCV 滴度和细胞内 SVCV 标志基因的表达水

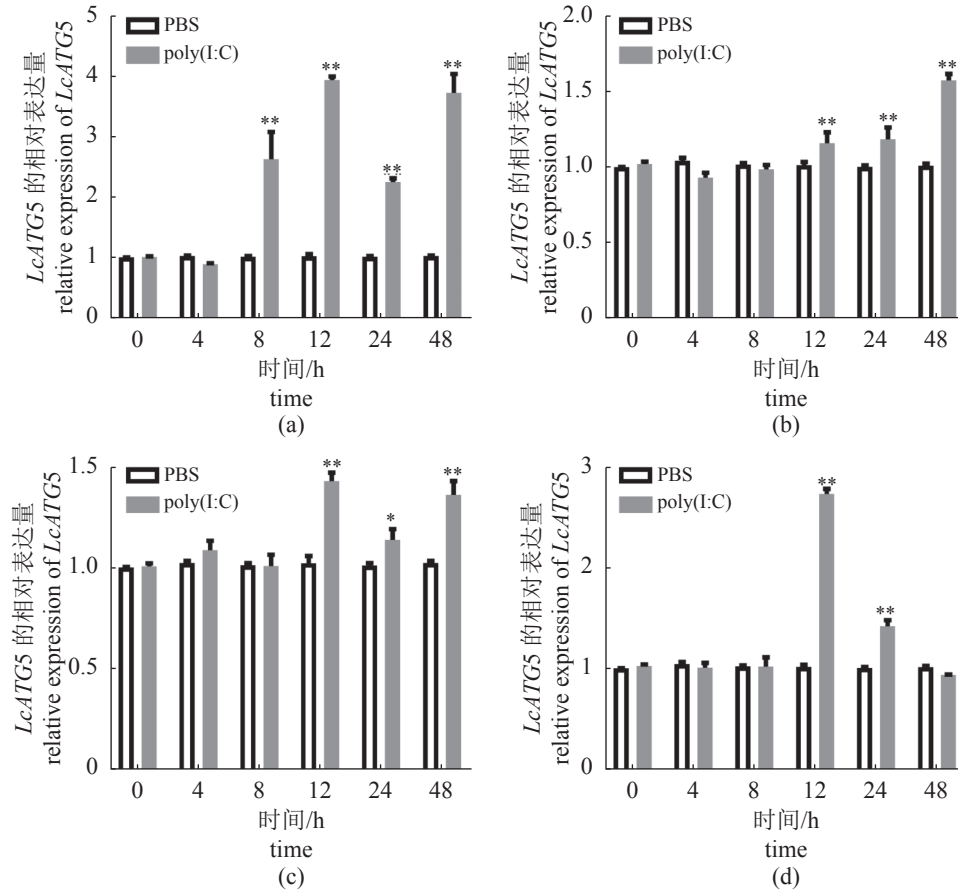


图 5 Poly (I:C) 刺激后免疫细胞中 *LcATG5* 的表达水平变化

使用终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ poly (I:C) 分别刺激大黄鱼头肾细胞系 (a)、原代巨噬细胞 (b)、原代淋巴细胞 (c) 和原代粒细胞 (d); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Fig. 5 Expression changes of *LcATG5* in immune cells after stimulation with poly (I:C)

L. crocea head kidney cell line (a), primary macrophages (b), primary lymphocytes (c), and primary granulocytes (d) were treated with poly (I:C) at a final concentration of 50; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

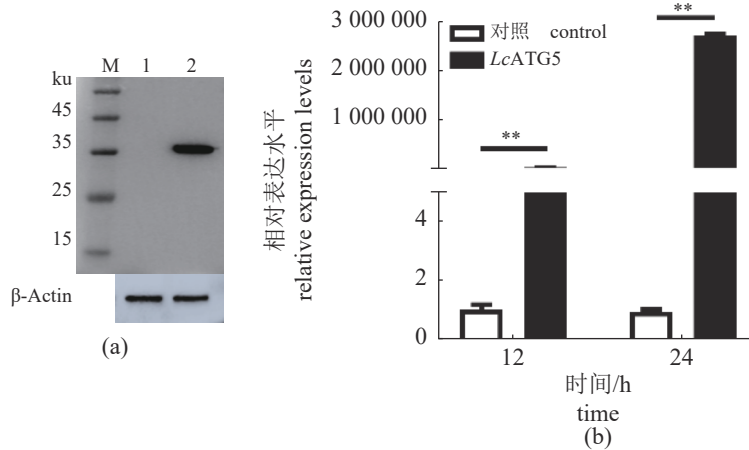


图 6 *LcATG5* 在 EPC 细胞中表达水平分析

(a) 蛋白免疫印迹分析 *LcATG5* 在 EPC 细胞中表达情况, 1. 对照, 2. *LcATG5*, 下同; (b) 荧光定量 PCR 检测 SVCV 感染 EPC 细胞 12 和 24 h 后 *LcATG5* 的转录水平。

Fig. 6 Expression level of *LcATG5* in EPC cells

(a) Western blotting was used to detect the overexpression of *LcATG5* in EPC cells, 1. control, 2. *LcATG5*, the same below; (b) the expression level of *LcATG5* genes was detected in EPC cells at 12 and 24 h post-infection by real-time PCR.

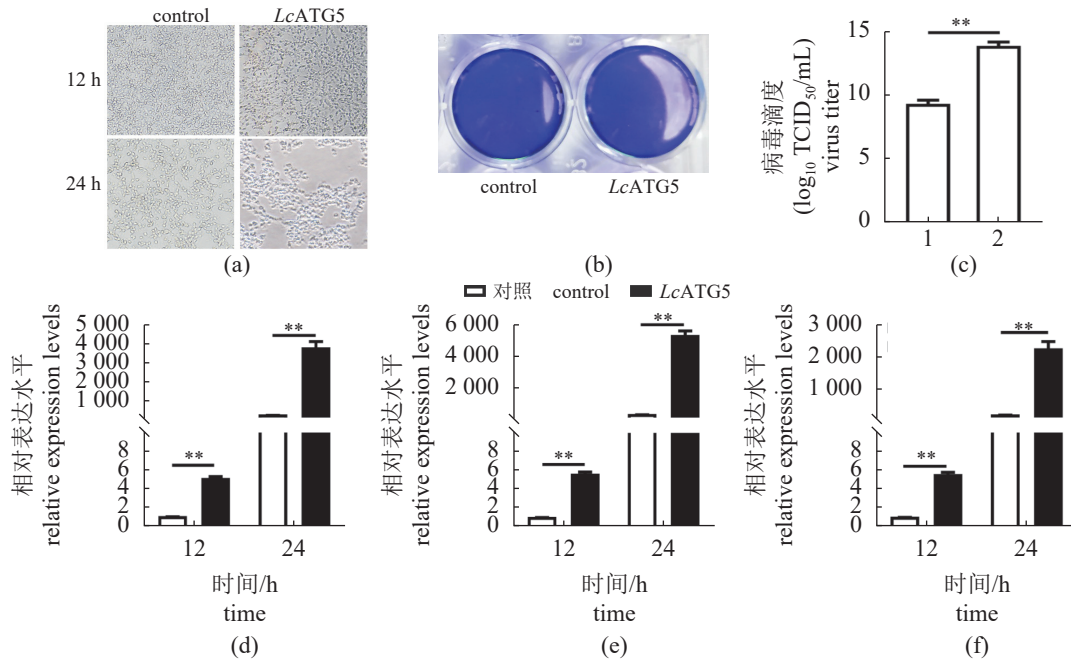


图7 *LcATG5* 过表达对 SVCV 复制的影响

(a) 显微镜观察 SVCV 感染后 12 和 24 h EPC 细胞的病变效应; (b) 结晶紫染色观察 SVCV 感染 24 h 的 EPC 细胞的病变效应; (c) TCID₅₀ 法测定病毒滴度; (d)-(f) 荧光定量 PCR 检测 *LcATG5* 过表达后 EPC 细胞中 *SVCI-G*、*SVCI-M* 和 *SVCI-P* 基因的表达水平。误差条代表三个独立实验的平均值±SEM。* $P < 0.01$, 表示差异极显著。

Fig. 7 Effects of *LcATG5* overexpression on SVCV replication

(a) CPEs in *LcATG5*-overexpressed EPC cells were observed microscopically at 12 and 24 h post-infection with SVCV. (b) EPC cells were stained with 1% crystal violet for detection of CPEs. (c) the titers of SVCV in culture supernatants from *LcATG5*-overexpressed EPC cells or control cells, which was expressed as 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀). (d)-(f) the expression levels of *SVCI-G*, *SVCI-M* and *SVCI-P* genes were detected by real-time PCR at 12 and 24 h post-infection. Error bars represent SEM of three independent experiments. Statistically significant differences were indicated with asterisks where ** $P < 0.01$.

平均显著升高, 表明 *LcATG5* 促进了 SVCV 病毒在 EPC 细胞中复制。已有研究报道, 过表达石斑鱼 *ATG5* 促进 RGNNV 和 SGIV 复制, 草鱼 *ATG5* 显著抑制草鱼呼肠孤病毒 (GCRV) 感染后 *IFN-I* 的表达。因此, 实验推测鱼类病毒可能利用 *ATG5* 参与形成的双膜囊泡进行复制, 并且 *ATG5* 通过抑制 I 型干扰素反应影响鱼类的抗病毒免疫应答。

4 结论

综上所述, 本研究从大黄鱼中鉴定出一个 *ATG5* 基因, 其在所有检测的组织、器官和免疫细胞中呈组成型表达, 同时 poly(I:C) 刺激显著上调了免疫细胞中 *LcATG5* 的表达水平。功能研究发现, 过表达 *LcATG5* 能够促进 EPC 细胞中 SVCV 增殖, 但是具体机制有待明确。这些研究结果将为深入研究自噬和自噬相关基因在鱼类病毒感染过程中的作用及机制奠定了基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Yorimitsu T, Klionsky D J. Autophagy: molecular machinery for self-eating[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2005, 12(2): 1542-1552.
- [2] Dunn W A. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation[J]. *Trends in Cell Biology*, 1994, 4(4): 139-143.
- [3] Wang C W, Klionsky D J. The molecular mechanism of autophagy[J]. *Molecular Medicine*, 2003, 9(3-4): 65-76.
- [4] Klionsky D J. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve[J]. *Autophagy*, 2008, 4(6): 740-743.
- [5] Shibutani S T, Saitoh T, Nowag H, et al. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system[J]. *Nature Immunology*, 2015, 16(10): 1014-1024.
- [6] Matsushita M, Suzuki N N, Obara K, et al. Structure of Atg5-Atg16, a complex essential for autophagy[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(9): 6763-6772.
- [7] Chai P W, Ni H Y, Zhang H, et al. The evolving functions of autophagy in ocular health: a double-edged

- sword[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2016, 12(11): 1332-1340.
- [8] Malhotra R, Warne J P, Salas E, *et al.* Loss of *Atg12*, but not *Atg5*, in pro-opiomelanocortin neurons exacerbates diet-induced obesity[J]. *Autophagy*, 2015, 11(1): 145-154.
- [9] 黄小荣, 黄衍恒, 叶霖, 等. 巨噬细胞条件性*Atg5*基因敲除小鼠的构建及鉴定[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6): 770-775.
- Huang X R, Huang Y H, Ye L, *et al.* Construction and identification of macrophage-conditional *Atg5*-knockout mice[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2019, 27(6): 770-775 (in Chinese).
- [10] 洗国炎, 陈蔚深, 张紫机, 等. 利用慢病毒感染构建稳定敲低*Atg5*基因的RAW 264.7[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(1): 84-89.
- Xian G Y, Chen W S, Zhang Z J, *et al.* Construction of a stable *Atg5* gene knockdown cell line in RAW 264.7 cells by lentivirus infection[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2021, 25(1): 84-89 (in Chinese).
- [11] Jackson W T. Viruses and the autophagy pathway[J]. *Virology*, 2015, 479-480: 450-456.
- [12] Zhao Z J, Thackray L B, Miller B C, *et al.* Coronavirus replication does not require the autophagy gene *ATG5*[J]. *Autophagy*, 2007, 3(6): 581-585.
- [13] Schiøtz B L, Roos N, Rishovd A L, *et al.* Formation of autophagosomes and redistribution of LC3 upon *in vitro* infection with infectious salmon anemia virus[J]. *Virus Research*, 2010, 151(1): 104-107.
- [14] Liu L Y, Zhu B B, Wu S S, *et al.* Spring viraemia of carp virus induces autophagy for necessary viral replication[J]. *Cellular Microbiology*, 2015, 17(4): 595-605.
- [15] Zhao J Z, Xu L M, Liu M, *et al.* Autophagy induced by infectious hematopoietic necrosis virus inhibits intracellular viral replication and extracellular viral yields in epithelioma papulosum cyprini cell line[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 77: 88-94.
- [16] Mu Y N, Li M Y, Ding F, *et al.* De novo characterization of the spleen transcriptome of the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and analysis of the immune relevant genes and pathways involved in the antiviral response[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97471.
- [17] Chen X H, Lin K B, Wang X W. Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26(10): 615-619.
- [18] Wang X H, Wang K R, Nie P, *et al.* Establishment and characterization of a head kidney cell line from large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2014, 84(5): 1551-1561.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Jia P D. Autophagy and virus infection[J]. *Infection International*, 2017, 6(4): 124-128.
- [21] 李宝华. 自噬对胞内感染病原体的双重作用[J]. *微生物与感染*, 2006, 1(3): 181-183.
- Li B H. The dual role of autophagy on intracellular infectious pathogens[J]. *Journal of Microbes and Infection*, 2006, 1(3): 181-183 (in Chinese).
- [22] Lennemann N J, Coyne C B. Catch me if you can: the link between autophagy and viruses[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(3): e1004685.
- [23] Wei Z Y, Li X F, Li W R, *et al.* Molecular characterization and role in virus infection of Beclin-1 in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 116: 30-41.
- [24] Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, *et al.* Calpain-mediated cleavage of *Atg5* switches autophagy to apoptosis[J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(10): 1124-1132.
- [25] Noda N N, Fujioka Y, Hanada T, *et al.* Structure of the *Atg12-Atg5* conjugate reveals a platform for stimulating *Atg8-PE* conjugation[J]. *EMBO Reports*, 2013, 14(2): 206-211.
- [26] Li C, Liu J X, Zhang X, *et al.* Fish autophagy protein 5 exerts negative regulation on antiviral immune response against iridovirus and nodavirus[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 517.
- [27] Wei C C, Luo Z, Song Y F, *et al.* Characterization of twelve autophagy-related genes from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their transcriptional responses to waterborne zinc exposure[J]. *Ecological Indicators*, 2018, 93: 677-686.
- [28] Chu P F, He L B, Yang C, *et al.* Grass carp *ATG5* and *ATG12* promote autophagy but down-regulate the transcriptional expression levels of *IFN-I* signaling pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 600-611.
- [29] Prentice E, Jerome W G, Yoshimori T, *et al.* Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(11): 10136-10141.

Molecular characterization of *ATG5* in *Larimichthys crocea* and its role in promoting virus proliferation

WEI Zuyun, WANG Shan, LI Wanru, WANG Shenglan, CHEN Yuhong,
MU Yinnan*, CHEN Xinhua*

(Key Laboratory of Marine Biotechnology of Fujian Province, College of Marine Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Autophagy is an important process that maintains homeostasis in eukaryotic cells and is involved in cell differentiation, development, and immunity. However, little is known about the function of autophagy-related genes (ATGs) in the immune response of fish. To explore the function of *ATG5* in virus infection of the *Larimichthys crocea*, we cloned a *ATG5* gene from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its open reading frame (ORF) was 828 nucleotides long, encoding a protein of 275 amino acids. The predicted molecular weight of *LcATG5* was 32.3 ku and its theoretical isoelectric point was 5.7. Homology comparison showed that *LcATG5* had a highly conserved APG5 domain as found in other vertebrate *ATG5* proteins. Phylogenetic analysis showed that *LcATG5* was closely related to *Collichthys lucidus* *ATG5*. *LcATG5* was detected in all eleven tissues of *L. crocea*, with highest expression in blood and lowest in spleen. *LcATG5* transcripts were also detected in primary head kidney granulocytes, lymphocytes and macrophages, and *L. crocea* head kidney cell line (LYCK), with highest expression in primary head kidney granulocytes. After induction by poly(I:C), *LcATG5* transcripts were significantly increased in these cells, and were more responsive in LYCK cells, with 3.93-fold increase at 12 h. In the *LcATG5*-overexpressed epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells, the cytopathic effects (CPE) caused by spring viremia of carp virus (SVCV) infection were increased at 48 h post-infection. The viral titer of SVCV in the culture supernatant of the *LcATG5*-overexpressed EPC cells was $10^{13.82}$ TCID₅₀/mL, which was higher than that of control group ($10^{9.27}$ TCID₅₀/mL). Besides, the expression levels of three viral genes (*SVCV-G*, *SVCV-M*, and *SVCV-P*) were significantly up-regulated in the *LcATG5*-overexpressed cells with 13.77-, 15.72-, and 11.39-fold increases, respectively. These results indicate that *LcATG5* plays a role in promoting virus replication, which may provide a basis for in-depth study of the function and mechanism of autophagy and ATGs during virus infection in fish.

Key words: *Larimichthys crocea*; autophagy-related gene 5 (*ATG5*); immune cells; virus replication

Corresponding authors: CHEN Xinhua. E-mail: chenxinhua@tio.org.cn;

MU Yinnan. E-mail: muyinnan@163.com

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0900600); National Natural Science Foundation of China (U1905204, 32073007); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-47); "Double first-class" Scientific and Technological Innovation Capacity and Enhancement Cultivation Plan of Fujian Agriculture and Forestry University (KSYLP001)