

文章编号:1005-8737(2000)03-0097-05

·综述·

## 鱼类干扰素的研究进展

Progress of studies on fish interferon

张义兵,俞小牧

(中国科学院水生生物研究所,湖北武汉430072)

ZHANG Yi-bing, YU Xiao-mu

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

关键词:鱼类;干扰素;诱导;基因工程育种

Key words: fish; interferon; induction; gene engineering fish breeding

中图分类号:S943

文献标识码:A

自从1957年一种病毒抑制物即干扰素(Interferon, IFN)<sup>[1]</sup>被发现以来,此后40年,IFN一直是病毒学、细胞学、免疫学、分子生物学、临床医学、肿瘤学等相关学科的研究热点。IFN是细胞和机体受到病毒感染,或受核酸、细菌内毒素、促细胞分裂素等诱导时,由受体细胞分泌的一种具有广谱抗病毒活性的糖蛋白。IFN对细胞生长、细胞分化、细胞和机体的免疫也有很重要的调节活性。在哺乳类,根据IFN的抗原特性、生物学特性和理化特性可分为IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ 。IFN $\alpha$ 和IFN $\beta$ 因有相似的生物和理化特性及共同的基因进化起源被归类为I类IFN(Type I IFN),IFN $\gamma$ 称为II类IFN(Type II IFN)<sup>[2]</sup>。IFN系统是目前所知的机体防御反应中出现最早的细胞功能调节系统,在病毒感染几小时之内就起作用。

1965年,Gravell和Malsberger<sup>[3]</sup>首次发现鱼类IFN活性物质后,又陆续在许多种类的鱼体内检测到IFN,如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[4-8]</sup>、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)<sup>[9]</sup>、大麻哈鱼(*O. keta*)<sup>[8]</sup>、鲤(*Carp*)<sup>[5]</sup>、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)<sup>[10-12]</sup>、金鱼(*Carassius auratus* Li.)<sup>[13]</sup>等;另外,在一些鱼的机体细胞中也诱导检测出IFN,包括虹鳟白细胞<sup>[14-18]</sup>、GF细胞系<sup>[19]</sup>、性腺细胞系RTG-2<sup>[20-22]</sup>、胖头鲮的鳍传代细胞系FHM<sup>[3,23]</sup>、红大麻哈鱼(*O. nerka*)胚胎细胞系SSE-5<sup>[24]</sup>、斑鲟(*Ictalurus punctatus*)卵巢细胞系CCO<sup>[25]</sup>、草鱼细胞系GCF、CO<sup>[10]</sup>、鲤科鱼类细胞系CAB、GCB、GRE、CIK、FHM<sup>[26,27]</sup>、牙鲈(*Paralichthys*

*olivaceus*)永久白细胞系HL-8<sup>[28]</sup>等。本文首次对鱼类IFN的研究进展作综述报道。

### 1 鱼类IFN系统

有人推测,鱼类与人干扰素(HuIFN)的基因存在同源性<sup>[29]</sup>。Wilson等证实了这一假设,他用HuIFN $\beta$  cDNA探针在鸟类和雅罗鱼(*Leuciscus leuciscus*)、条鳅(*Noemacheilus barbatulus*)、河鲈(*Perca fluviatilis*)、鲟(*Phoxinus phoxinus*)等的基因组DNA检测到杂交信号,而HuIFN $\alpha$  cDNA探针却不能。表明在4亿年前鱼类和两栖类开始分化时,鱼类就有与HuIFN $\beta$ 同源的基因<sup>[30]</sup>。鱼类可能只有一个IFN基因类似于哺乳动物类的Type I IFN<sup>[15,31]</sup>。

鱼类IFN至少有两类:①耐酸(pH 2稳定),耐热。由病毒或dsRNA等诱导<sup>[17-19,25,27]</sup>,性质与哺乳类Type I IFN相似。由VHSV和PolyI:C诱导的鲑类IFN都有酸稳定性<sup>[4,8,17,32]</sup>;②不耐酸,不耐热。由白细胞、T细胞或巨噬细胞产生,有丝分裂素等诱导<sup>[15,25]</sup>,与哺乳类Type II IFN相似。但是鱼类IFN对酸的稳定性也有差异。从牙鲈永久白细胞系HL-8诱导的IFN活性仅在pH 4~8稳定,pH 2处理20 min即全部失活<sup>[28]</sup>。山鲮(*O. clarki*)病毒CTV、IHNV诱导虹鳟白细胞产生的IFN活性物质在pH 2处理后,抗病毒滴度略有降低但不完全消失,表明诱导的抗病毒物质不止1种,有耐酸或不耐酸的<sup>[14,16]</sup>。同一种病毒经不同处理后诱导的IFN种类或组成成分也不一致。如有活性的IHNV和CMA-IHNV(即IHNV感染细胞单层后用戊二醛等处理)诱导的虹鳟白细胞IFN对酸的耐受性有显著差别。pH 2整夜处理,前者保持(76.6 $\pm$ 3.0)%的活性,而后者只有(55.7 $\pm$ 3.4)%的活性<sup>[14]</sup>。由于缺乏深入的分子生物学研究,鱼类IFN种类尚无最终定论,但可以肯定有许多种。

收稿日期:1999-11-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870602)

作者简介:张义兵(1969-),男,中国科学院水生生物研究所助理研究员,遗传学硕士。

鱼类 IFN 抗病毒机制的研究还处于起步阶段。Mx 蛋白是 IFN 或病毒等诱导剂诱导细胞的抗病毒状态时由宿主细胞快速表达的抗病毒蛋白。与 IFN 相比,其表达量大,可达细胞质蛋白的 1%;半衰期长达 2.5 d;不存在负反馈抑制;易于检测。因此,哺乳类 Mx 蛋白已被认为是细胞被诱导 Type I IFN 的标记<sup>[33]</sup>。鱼类也存在 Mx 基因,表明鱼类 IFN 的抗病毒机制与哺乳类 IFN 具相似性。如虹鲟体内注射 IFN 诱导剂 PolyI:C 或病毒后,能快速检测到 Mx mRNA 的表达<sup>[34]</sup>。RTG-2 细胞经 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PolyI:C 诱导 4 h,用免疫印迹法能检测到 Mx 基因的表达,48 h 表达量最高,72 h 后下降。用  $10^5$  TCID<sub>50</sub> IHNV 浸泡虹鲟 5 h,2 d 后能检测到 IHNV 的组织,如鳃、肾、脾、胸腺、幽门盲囊、小肠等,同时也能检测到 Mx 蛋白。虹鲟 Mx 蛋白具有 Mx 蛋白家族的典型结构特征,三聚体 GTP 结合位点以及 Leu 拉链<sup>[35,36]</sup>。所有结果表明,Mx 同样是诱导鱼类 IFN 的有用标记<sup>[37]</sup>。但令人不解的是,3 种虹鲟 Mx 基因转染 CHSE-214 细胞后,表达的 Mx 蛋白却无抗病毒作用<sup>[36]</sup>。

## 2 鱼类 IFN 的诱导

### 2.1 诱导起源

鱼类机体和体外培养细胞都能诱导 IFN。Snegaroff<sup>[18]</sup>以 NDV 等 4 种恒温病毒诱导虹鲟免疫细胞 IFN 时,发现头肾白细胞比血白细胞的诱导能力强。Congleton 等<sup>[14]</sup>首次对虹鲟白细胞的组成成分 IFN 的诱导能力进行了研究。贴壁白细胞、不贴壁白细胞和不分离白细胞所含巨噬细胞的比例不同。同等细胞数量,拥有巨噬细胞比例越大,IFN 产量越高。病毒 IHNV 和 PolyI:C 诱导取得相同结果。

### 2.2 诱导剂

鱼类病毒及非鱼类病毒都是很好的 IFN 诱导剂。非鱼类病毒 Reo-2(人呼肠孤病毒 2 型)<sup>[23]</sup>,NDV(新城疫病毒)、TGEV(猪冠状病毒)、牛冠状病毒<sup>[18]</sup>,SVDV(猪水泡病病毒),FMDV(猪口蹄疫病毒)、IBV(鸡传染性支气管炎病毒)<sup>[12]</sup>等能分别诱导 FHM、虹鲟肾白细胞、草鱼血清 IFN。呼肠孤病毒是鱼类 IFN 有效诱导剂,如 Reo-2、CRV(斑鲟鱼呼肠孤病毒)、CSV(大麻哈鱼呼肠孤病毒)、GCHV(草鱼出血病病毒)等。

除 RNA 病毒外,DNA 病毒也有诱导能力。如 MDHV(鸡马立克氏疱疹病毒),但较 RNA 病毒的诱导能力低<sup>[12]</sup>。诱导草鱼血清 IFN 时,具 dsRNA 基因组的 GCHV、IBDV 的诱导能力比 ssRNA 病毒如 IBV 和 HcPV(三角帆蚌瘟病毒)强,具有脂质囊膜结构的 VSV、IBV、HcPV 的诱导能力比无膜结构的 GCHV 强<sup>[38]</sup>。

有的病毒经高温、紫外线、 $\beta$ -丙酸内酯、戊二醛等灭活后仍有诱导能力或获得诱导能力。如未灭活的斑鲟鱼呼肠孤病毒 CRV 通过病毒干扰保护 CCO 细胞不受斑鲟鱼疱疹病毒 CCV 病毒感染,UV 灭活后的 CRV 对 CCO 的保护却是诱导细胞产生 IFN<sup>[25]</sup>。

人工合成 dsRNA(PolyI:C)已成功诱导培养细胞 SSE-5、RTG-2 IFN<sup>[24]</sup>和 4 种鲑科鱼类的 IFN<sup>[8]</sup>。Con A/PMA 诱导的虹鲟白细胞上清液中发现巨噬细胞因子(MAF)和 IFN 活性同时存在和消失,证明是一种类似于哺乳类 Type II IFN 的鱼类 IFN<sup>[15]</sup>。

### 2.3 诱导机制

鱼类 IFN 的诱导与病毒复制有关。弹状病毒 IHNV、VHSV 及双 RNA 病毒 IPNV 诱导虹鲟血清 IFN 时必须复制<sup>[4,7]</sup>。无致病力的 CTV 浸泡感染虹鲟,在 CTV 复制的某些器官,如皮肤和鳃产生 IFN 并诱导虹鲟抗 IHNV 感染<sup>[16]</sup>。紫外线灭活的 GCHV 诱导 CAB 等 5 种鲤科鱼类培养细胞 IFN 可能与病毒 dsRNA 复制有关<sup>[26]</sup>。有证据表明紫外线灭活的病毒在细胞中诱导 IFN 需要病毒 RNA 的复制,短时间照射紫外线虽能使病毒迅速丧失感染性,但 RNA 仍能部分复制<sup>[39]</sup>。

诱导 IFN 也可不依赖病毒的复制。CMA-VHSV 不能复制,但仍能诱导虹鲟头肾或周围血白细胞 IFN,诱导产量与活的 VHSV、 $\beta$ -丙酸内酯灭活的 VHSV 无显著差异。作者依此认为这两种灭活的和活的 VHSV 诱导虹鲟白细胞 IFN 的机制可能相同。用 VHSV 蛋白的 MA5 H10 处理后的 CMA-VHSV 诱导 IFN 的能力显著下降,进一步表明,至少有部分 IFN 的诱导与 EPC 细胞膜上 VHSV 毒芽的外部成分同虹鲟白细胞表面相互作用有关<sup>[17]</sup>。感染性的 IHNV 和 CMA-IHNV 诱导虹鲟头肾白细胞干扰素也有类似机制<sup>[14]</sup>。

### 2.4 起导作用和超诱导作用

诱导 IFN 还有两种有趣的现象:起导作用(Priming)和超诱导作用(Superinduction)。IFN 起导作用指在加入诱导剂前,加入少量自身 IFN 作用被诱导的细胞能成倍增加 IFN 产量。其分子机制可能是先加入的少量 IFN 诱导合成了细胞内的转录因子,从而促进 IFN mRNA 的转录。超诱导作用指细胞诱导后,加入某种大分子合成抑制物(如 ActD)适当作用促使 IFN 产量增加的现象,其机制可能是因为阻止 IFN 合成的蛋白抑制物是一种不稳定的调节蛋白,加入 ActD 可使此蛋白抑制物及其 mRNA 快速失活,而 IFN mRNA 相对稳定,因此 IFN 产量大增<sup>[2]</sup>。

鱼类 IFN 诱导也有起导效应和超诱导效应。紫外线灭活的 GCHV 诱导鲫囊胚细胞 CAB 前 16 h,加入少量 CAB IFN 起导,诱导 4 h 后再加入 ActD 超诱导 2 h,能进一步提高 IFN 的产量<sup>[26]</sup>。邵建忠等<sup>[38]</sup>也发现草鱼血清 IFN 对其自身合成有起导作用,100 U 的 IFN 预注射 2 d 后再感染病毒,可提高 IFN 的诱生活性。这种起导作用随注射剂量的增加而增强,起导所需要的时间则随剂量的增加而缩短。

### 2.5 其它诱导条件

**2.5.1 病毒感染复数** 病毒感染复数越高,IFN 的诱导产量越高<sup>[17,38]</sup>。超离心纯化的 GCHV 经紫外线灭活后诱导鲤科鱼类培养细胞 IFN 时,由于超速离心力的作用,使部分病毒丧失感染性(GCHV 经  $10^5$  g 纯化后,感染性降低 10 倍

以上),病毒粒子的数量将大于感染性粒子的数量,所以诱导高滴度的 IFN 必须加入高剂量的病毒作为诱导剂<sup>[26]</sup>。也有实验表明,诱导病毒的浓度不可过高。IHN 诱导虹鳟头肾白细胞 IFN,当感染复数过高时,IFN 产量反而下降<sup>[14]</sup>。

**2.5.2 病毒灭活程度** 病毒灭活程度对 IFN 产量的影响,不同病毒-细胞(鱼体)组合可能有不同的结果。紫外线长时间(1 h)照射 GCHV 将失去诱导 CAB IFN 的能力,高温灭活(56℃ 1 h)也不能诱生 IFN<sup>[26]</sup>。但 56℃ 灭活不同的时间(0、2.4、6~10 h,其中 8 h 和 10 h 病毒滴度为 0),对诱生草鱼 IFN 无显著影响<sup>[38]</sup>。

**2.5.3 温度** 是调节鱼类 IFN 诱生的一个重要因素,与鱼类是低等脊椎动物的进化地位有关。鱼类 IFN 的发现就是因为传染性胰腺坏死病病毒(IPNV)在 23℃ 时能在 FHM 繁殖,34℃ 时却不能。这并非由于温度不适合病毒的增殖,而是在 34℃ IPNV 诱导 FHM 细胞分泌了与哺乳类 IFN 一致的活性物质,这种物质又诱导 FHM 细胞的抗 IPNV 状态<sup>[3]</sup>。Oie 等<sup>[23]</sup>用 Reo-2 感染 FHM 证实了以上发现:Reo-2 在 33℃ 被抑制,26℃ 时却能在 FHM 增殖。水温从 10℃ 上升到 18℃ 时也能抑制 IHN 感染虹鳟<sup>[40]</sup>。

近年来研究表明,在不同温度时,病毒诱导的虹鳟白细胞 IFN 和草鱼 IFN 活性呈相似的动态变化。低温下 IFN 诱导产量略低,表明低温能抑制 IFN 的合成<sup>[17,38]</sup>。不同的诱导温度和培养温度对鲤科鱼类 IFN 的产量有明显的影响<sup>[26]</sup>。

**2.5.4 诱导细胞日龄或鱼龄** 非分裂细胞比生长细胞更能稳定产生高滴度 IFN。王铁辉等<sup>[26]</sup>发现 28℃ 培养 2 d 的 CAB 细胞 IFN 产量较低,培养 4 d 或 4 d 后转移到 16℃ 培养的 CAB 能稳定产生高滴度 IFN,超过 4 d 后反而降低。但 1、2、3 龄草鱼对 IFN 的诱生没有影响<sup>[38]</sup>。

此外,培养基血清浓度、鱼体营养状况等对 IFN 诱导也有一定影响。

### 3 鱼类 IFN 的组成型表达

同哺乳类一样,正常的鱼类细胞和机体一般不分泌 IFN,需经病毒等感染产生。但 Chinchar 等<sup>[25]</sup>从几种长期培养的斑斑 T 淋巴样细胞系(CF-59)和巨噬细胞系(42TA)的培养上清液中检测到组成型表达的高滴度抗病毒因子,理化性质显示可能是鱼类 IFN $\gamma$ 。其中从 CF-59 检测到的抗病毒滴度高达 6 400 U/ml,其热不稳定性等性质类似于哺乳类 Type II IFN。Chinchar 等还认为新建立的 T 细胞和巨噬细胞系对 CCV 病毒不敏感,很可能是因为建系之初,细胞能自发产生组成型 IFN,而随着体外传代,又渐渐对 CCV 敏感,因为细胞逐渐失去了合成这些“非必须蛋白”(如 IFN 等细胞素)的能力。

### 4 鱼类 IFN 的性质

鉴定 IFN 的公认标准是:①是一种蛋白质,但不是巨球

蛋白;②抗病毒作用不是由于对病毒的非特异性所致,而是通过细胞内 RNA 和蛋白质的途径来完成的;③有广谱的抗病毒活性。研究表明,鱼类 IFN 的性质符合这些标准。

鱼类 IFN 是一种蛋白质,因为抗 RNase 和 DNase,对胰蛋白酶敏感。邵建忠等用葡萄糖苷酶和 NaIO<sub>4</sub> 裂解草鱼 IFN 糖基,IFN 活性显著下降,证明鱼类 IFN 具有糖蛋白的性质<sup>[12]</sup>。

鱼类 IFN 分子量也有报道。DeSena 等<sup>[20]</sup>部分纯化了 IPNV 诱导的 RTG-2 IFN,测得分子量为 94 000,等电点 pH 7.1。Dorson 等<sup>[6]</sup>认为不同细胞起源或不同诱导剂产生的 IFN 不同,用 VHSV 诱导的虹鳟 IFN 分子量为 26 000,沉降系数(2.3±0.5)S,等电点 pH 5.3。牙鲆 IFN 为分子量为 16 000 的糖蛋白<sup>[28]</sup>。分离纯化草鱼血清 IFN,证实该 IFN 是一种分子量为 38 000 的糖蛋白,有关分子生物学的研究正在进行之中<sup>[38]</sup>。

病毒和 PolyI:C 诱导的鱼类 IFN 一般有较高热稳定性(56℃),耐酸(pH 2),10<sup>5</sup> g 离心不沉降。而由促细胞分裂剂 ConA/PMA 诱导的虹鳟白细胞 IFN 对酸(pH 2)敏感,不耐热(60℃)<sup>[15]</sup>。

IFN 抗病毒机制研究表明,病毒特异性抗体不能中和鱼类 IFN 活性,IFN 无直接杀灭病毒作用。在 IFN 诱导细胞抗病毒状态之前加入微量 ActD 可使 IFN 的抗病毒作用消失,表明鱼类 IFN 对病毒的抑制作用是通过细胞内转录和转译水平的调控来完成的,依赖于细胞内 RNA 和蛋白质的合成<sup>[12,27]</sup>。

在同种细胞上,鱼类 IFN 具有广谱抗病毒活性,对鱼类和非鱼类病毒、RNA 和 DNA 病毒都有抑制作用<sup>[10,27]</sup>。

### 5 鱼类 IFN 基因

目前见报道的只有牙鲆 IFN 基因。

Tamai 等共转染人癌基因 c-Ha-ras 和 c-fos 的表达质粒获得 1 株牙鲆永久白细胞系。由此诱导,纯化了牙鲆白细胞 IFN,并从 IFN cDNA 文库中克隆得到牙鲆 IFN cDNA。连接表达载体,转染 BHK-21 细胞表达获得成功。重组 IFN 蛋白质大小与诱导 IFN 一致。牙鲆 IFN 共 138 个氨基酸,有一个糖基化位点和 30 个氨基酸编码的信号肽,分子量 16 000。但是牙鲆 IFN 的氨基酸顺序与哺乳类同源性较低,与人 IFN $\alpha$ N、牛 IFN $\alpha$ A、马 IFN $\alpha$ 2、大鼠 IFN $\alpha$ 1、人 IFN $\beta$  和小鼠 IFN $\beta$  的氨基酸同源性分别为 24%、20%、19%、18%、14% 和 12%<sup>[28]</sup>。与进化关系最近的鸡 IFN 氨基酸和核苷酸序列同源性也分别只有 10% 和 35%<sup>[41]</sup>。目前邵建忠等和本实验室正分别进行草鱼 IFN 和鲤 IFN 基因的克隆工作,有关鱼类 IFN 基因还有待更多、更深入研究。

### 6 鱼类 IFN 的应用

鱼类病毒病是至今没有解决的严重影响水产养殖业的世界性难题。在进化过程中,鱼类处于连接高等脊椎动物和

低等无脊椎动物的特殊地位,特异性免疫机制不完善,非特异免疫占有重要地位,免疫易受水温的影响。早在1967年 Sigel 就指出,鱼类 IFN 可能是鱼类特异性免疫反应不足的一种补充,水温较低鱼体免疫低下时,它的合成在抵抗病毒感染中能发挥重要作用<sup>[42]</sup>。另外,鱼类 IFN 具有广谱的抗病毒活性,它不只对1种或几种病毒有作用,且抑制病毒感染不需任何抗体反应或免疫成分参与。因此,IFN 的作用越来越受到重视<sup>[8]</sup>。

目前,鱼类粗制 IFN 和诱导剂(如 PolyI:C)都已用于防治鱼病的试验。注射一定剂量的 IFN、PolyI:C 或以一定浓度浸泡易感鱼体几小时,可以延滞或抑制病毒在鱼体内的复制,延缓发病时间,显著提高存活率。

de Kinkelin 等<sup>[5]</sup>收集 VHSV 诱导虹鳟血清 IFN 注射虹鳟幼鱼,2 d 后幼鱼即能抵抗 VHSV 体外感染。注射 VHSV 诱导的虹鳟头肾白细胞 IFN 能降低 20% 死亡率,第 1 次注射 4 d 后再进行第 2 次注射能降低 50% 的死亡率<sup>[17]</sup>。邵建忠等<sup>[11]</sup>将草鱼细胞 AHZC88 分离出的 IFN 活性因子用于抗草鱼出血病的实验,经 IFN 活性因子保护的 1 龄草鱼比对照晚发病 1 周,在第 15 天左右开始出现发病症状,第 18 天后开始出现死亡,平均死亡率为 48.9%,而对照组死亡率高达 98.8%。存活下来的草鱼连续观察 2 个月也未见死亡。

Eaton 报道<sup>[8]</sup>注射 PolyI:C 能保护鱼体不受病毒感染。红大麻哈鱼、大麻哈鱼注射一定剂量的 PolyI:C 4 d,再注射 IHNV 感染,可显著提高两种鱼的存活率。如果注射感染的是红细胞坏死病毒 ENV,红大麻哈鱼在第 21 天可检测到病毒包涵体,28 d 后在鳍和肛门可见发病血症(对照组分别出现在第 14 天、第 21 天)。大麻哈鱼则不见病毒包涵体或任何发病症状,表明注射 PolyI:C 已成功抵制 ENV 感染。以 PolyI:C 浸泡鱼体的实验获得相同结果<sup>[8]</sup>。

## 7 问题及展望

鱼类 IFN 在多种鱼体和培养细胞诱导成功。但目前对鱼类 IFN 的研究大都局限于 IFN 的诱导起源、诱导剂种类、诱导条件、生物学特性及理化特性的研究,鉴定 IFN 主要是根据其抗病毒活性等特性是否符合哺乳类 IFN 的一般特点。对 IFN 的纯化鉴定、抗病毒活性外的其它活性研究、诱生机制、抗病毒机制、IFN 基因以及与高等脊椎动物的比较研究只初步涉及,几乎还是空白,还缺乏更多的分子生物学证据,缺乏与高等脊椎动物 IFN 分子生物学的系统比较。因此,鱼类 IFN 的基础研究还有待深入。

鱼类 IFN 防治鱼病有两种方法:①直接利用诱导的 IFN 或诱导剂(如 PolyI:C)注射或浸泡易感鱼体。但这种方法工作量大、成本高,且影响因素很多,如接种剂量、途径、时间等。IFN 的种属特异性也使之推广受到一定限制,不能彻底控制鱼病的发生。在没有更好的防治鱼病方法之前,仍不失为一种较成功的方法。Eaton<sup>[8]</sup>在比较了利弊之后,认为以一定剂量 PolyI:C 浸泡可能是一种适合于大规模养殖的方

法,但是 PolyI:C 是一种较昂贵的药物,用于商品鱼抗病还必须获得有关部门许可,并仍有许多细节需更进一步的研究。②利用 IFN 基因或相关基因进行基因工程鱼类抗病育种。转基因鱼问世,及外源基因能够在鱼体成功表达并发挥作用是开展这项工作的理论基础。由于病毒病原的复杂性和高可变性,针对单株病毒而设计的特异性抗病毒育种,如病毒外壳蛋白基因、Ribozyme、反义 RNA 或者抗体等,都不能普遍性地解决抗病育种问题,以 IFN 基因培育抗病新品种是彻底解决鱼类抗病的一条有效途径<sup>[26]</sup>。为此,必须加快鱼类 IFN 免疫学和分子生物学的研究。针对严重危害我国水产养殖业的草鱼出血病,我们提出了以 IFN 等抗病基因的基因工程育种策略,但目前正积极研究之中。总之,无论是利用 IFN 防治,还是进行 IFN 基因抗病育种,对防治乃至根治鱼类病毒病都指出了崭新的应用前景。

## 参考文献:

- [1] Issacs A, Lindenman J. Virus interference: I. The Interferon[J]. Proc R Soc Lond[B], 1957, 147:258-263.
- [2] Joklik, W K. Interferon[A]. Fields B N, Knipe D M, et al. Virology [M]. Second edited. New York: Raven Press Ltd, 1990.384-410.
- [3] Gravel M, Marlsbenger RG. A permanent cell line from the fat-head minnow (*Pimephales promelas*)[J]. Ann N Y Academy Sci, 1965, 126:555-565.
- [4] de Kinkelin P, Dorson M. Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus [J]. J Gen Viro, 1973, 19:125-127.
- [5] Kinkelin P, Dorson M, Hattenbelger - Ballouy A M. Interferon synthesis in trout and carp after viral infection[J]. Devel Comp Immunol, 1982, (suppl. 2):167-174.
- [6] Dorson M, Brade A, Kinkelin P. Egtved virus induced rainbow trout serum interferon; some physicochemical proprieties[J]. Annls Microbiol Inst Pasteur, 1975, 126B:485-589.
- [7] Dorson M, Kinkelin P, Torhyc. Interferon synthesis in rainbow trout fry following infection by infectious pancreatic necrosis visus [J]. Fish Shellfish Immunol, 1992, 2:311-313.
- [8] Eaton W D. Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic; cytidylic acid[J]. Dis Aquat Org, 1990, 9:193-198.
- [9] Pinto R M, Joire J, Bosch A. Interferon-like activity in sea bass affected by viral erythrocytic infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3(2):89-96.
- [10] 江育林, 李正秋. 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.
- [11] 邵建忠, 项黎新, 李亚南. 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.
- [12] 邵建忠, 钱凯艺, 项黎新. 病毒诱导草鱼产生干扰素活性因子的研究[J]. 病毒学报, 1998, 14(4):346-351.
- [13] Shea T B, Berry ES. Suppression of interferon synthesis by the pesticide Carbaryl as a mechanism for enhancement of goldfish

- virus-2 replication[J]. Appl Environ Microb, 1984, 47(2):250-252.
- [14] Congleton J, Sun B. Interferon-like activity produced by anterior kidney leukocytes of rainbow trout stimulated in vitro by infectious hematopoietic necrosis virus or Poly I; C[J]. Dis Aquat Org, 1996, 25:185-195.
- [15] Graham S, Secombes CJ. Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma[J]. J Fish Biol, 1990, 36:563-573.
- [16] Hedrick R P, Lapatra SE, Yun S, et al. Induction of protection from infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by pre-exposure to the avirulent cutthroat trout virus(CTV)[J]. Dis Aquat Org, 1994, 20:111-118.
- [17] Rogel-Gaillard C, Chilmonczyk S, Kinkelin P. In vitro induction of interferon-like activity from rainbow trout leukocytes stimulated by Egatved virus[J]. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3:383-394.
- [18] Snegaroff J. Induction of interferon synthesis in rainbow trout leukocytes by various homeotherm viruses[J]. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3:191-198.
- [19] Beasley A R, Sige MM, Clem LM. Latent infection in marine fish cell tissue cultures[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1966, 121:1 169-1 174.
- [20] DeSena J, Rio GJ. Partial purification and characterization of RTG-2 fish cell interferon[J]. Infect Immun, 1975, 11:815-822.
- [21] Okamoto N, Shirakura T, Nagakura Y, et al. The mechanism of interferon with fish viral infection in the RTG-2 cell line[J]. Fish Pathology, 1983, 18:7-12.
- [22] Sano T, Noyakura Y. Studies on viral diseases of Japanese fishes-VIII. Interferon induced by RTG-2 cell infected with IHN virus[J]. Fish Pathology, 1982, 17:179-185.
- [23] Oie H K, Loh PC. Reovirus Type 2: Induction of viral resistance and interferon production in fathead minnow cells[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1971, 136:369-373.
- [24] MacDonald R D, Kennedy JC. Infectious pancreatic necrosis virus persistently infects chinook salmon embryo cells independent of interferon[J]. Virology, 1979, 95:260-264.
- [25] Chinchar V G, Logue O, Antao A. Channel catfish reovirus (CRV) inhibits replication of channel catfish herpesvirus(CCV) by two distinct mechanisms: viral interference and induction of an anti-viral factor[J]. Dis Aquat Org, 1998, 33:77-85.
- [26] 王铁辉, 张义兵, 李戈强. 鱼类培养细胞干扰素的诱导[J]. 病毒学报, 1999, 15(1):43-49.
- [27] 张义兵, 王铁辉, 李戈强, 等. 鲫鱼囊胚细胞干扰素的诱导及部分特性的研究[J]. 中国病毒学, 2000, 15(2):163-169.
- [28] Murakami H, Tamai T, Shirahata S. Immobilization of fish lymphocytes and fish interferon gene[J]. Fish Pathology, 1995, 30(2):175-180.
- [29] Taniguchi T, Mantei N, Schwarzstein M, et al. Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related[J]. Nature, 1980, 285:547-549.
- [30] Wilson V, Jeffreys A J, Barrie P. A comparison of vertebrate interferon gene families detected by hybridization with human interferon DNA[J]. J Mol Biol, 1983, 166:457-475.
- [31] Miyata T, Hayashida H, Kikuno R. Evolution of interferon genes[J]. Interferon, 1985, 6:1-30.
- [32] Renault T, Torchy C, Kinkelin P. Spectrophotometric method for titration of trout interferon, and its application to rainbow trout fry experimentally infected with viral haemorrhagic septicemia virus[J]. Dis Aquat Org, 1991, 10:23-29.
- [33] Abrams M E, Balish M J, Brondt C R. IFN-alpha induces MxA gene expression in cultured human corneal fibroblasts[J]. Exp Eye Res, 1995, 60:137-142.
- [34] Staeheli P, Yu Yx, Grob R, et al. A double-strand RNA-inducible fish gene homologous to the murine influenza virus resistance gene Mx[J]. Mol Cell Biol, 1989, 9(7):3 117-3 121.
- [35] Trobridge G D, Leong JAC. Characterization of a rainbow trout Mx gene[J]. J Interferon Cytokine Res, 1995, 15:691-702.
- [36] Trobridge G D, Chiou PP, Leong JA. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells[J]. J Virol, 1997, 1(7):5 304-5 311.
- [37] Trobridge G D, Chiou PP, Kim C H. Induction of the Mx protein of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in vitro and in vivo with poly I;C dsRNA and infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Dis Aquat Org, 1997, 30:91-98.
- [38] 邵建忠, 项黎新, 李亚南. 草鱼干扰素诱导条件的研究[J]. 水产学报, 1999, 23(2):122-127.
- [39] McClain M E, Sepedlove R S. Multiplicity reactivation of reovirus particles after exposure to ultraviolet light[J]. J Bacteriol, 1966, 92:1 422-1 429.
- [40] Amend D F. Control of infectious hematopoietic necrosis virus by elevating the water temperature[J]. J Fish Res Bd Can, 1970, 27:265-270.
- [41] Sekellick M J, Ferrandino A F, Hopkins DA, et al. Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis[J]. J Interferon Res, 1994, 14(2):71-79.
- [42] Sigel M M. Virus infection and immunity in fish[A]. G Berg. Transmission of Viruses by the Water Route [M]. London: John Wiley & Sons, 1967. 301-302.