

DOI: 10.12264/JFSC2022-0426

## 鲤疱疹病毒 III 型(CyHV-3)诱导鲤肝组织自噬发生的研究

田立静<sup>1,2,3</sup>, 姜晓娜<sup>2,3</sup>, 任婉莹<sup>2,3</sup>, 李龔<sup>1,2,3</sup>, 葛彦龙<sup>2,3</sup>, 李池陶<sup>2,3</sup>, 胡雪松<sup>2,3</sup>,  
程磊<sup>2,3</sup>, 石潇丹<sup>2,3</sup>, 石连玉<sup>2,3</sup>, 贾智英<sup>1,2,3</sup>

1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;
2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 农业农村部水产基因组学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;
3. 中国水产科学研究院鲤遗传育种工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150070

**摘要:** 在鲤(*Cyprinus carpio*)感染鲤疱疹病毒 III 型(CyHV-3)不同时期, 通过分析鲤疱疹病毒标志基因 *TK* 和 *ORF72* 与自噬标志基因 *Beclin-1*、*LC3*、*P62* 的差异表达情况, 探讨在 CyHV-3 感染中自噬的发生情况。研究表明: (1) 抗病选育组与未选育组鲤 *TK* 和 *ORF72* 基因以及自噬标志因子 *Beclin-1*、*LC3*、*P62* 基因相对表达量均呈现先升高后降低的趋势; *TK* 和 *ORF72* 基因相对表达量选育组均极显著低于未选育组( $P<0.01$ )且在感染 144 h 达到最高; (2) 选育组鲤 *Beclin-1*、*LC3*、*P62* 基因相对表达量在感染 48 h 达到最高, 且 *Beclin-1*、*LC3* 基因表达量极显著高于未选育组( $P<0.001$ ), *P62* 显著高于未选育组( $P<0.05$ ); (3) 未选育组鲤 *Beclin-1*、*LC3*、*P62* 基因相对表达量在感染 96 h 达到最高且极显著高于选育组( $P<0.001$ ), 而 *P62* 基因相对表达量持续在感染 144 h、192 h 极显著高于选育组( $P<0.01$ ), 说明 *P62* 基因表达发生了聚集; (4) *LC3* 蛋白表达趋势与基因相对表达量趋势一致。以上结果表明 CyHV-3 感染能够诱导鲤发生自噬, 推测自噬体降解过程可能被抑制产生不完全自噬从而促进病毒复制感染。

**关键词:** 鲤; CyHV-3; 自噬; *Beclin-1*; *P62*; *LC3*

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)03-0384-09

鲤疱疹病毒 III 型(CyHV-3)是引起锦鲤(*Cyprinus carpio*)和鲤(*Cyprinus carpio*)感染的高致死率疾病, 死亡率达 80%~100%<sup>[1]</sup>。该病在基因水平上主要以胸苷激酶(thymidine kinase)基因 *TK* 和衣壳蛋白(capsid triplex protein)基因 *ORF72* 为标志检测基因<sup>[2-4]</sup>。

自噬(autophagy)是细胞内的一种应激保护机制, 利用自噬体将细胞内衰老的细胞器以及入侵的病原微生物等转移到溶酶体进行降解来维持细胞的稳态与平衡<sup>[5-6]</sup>。然而在病原微生物入侵宿主的过程中自噬也可发挥截然不同的作用, 自噬体可将病毒粒子转运至溶酶体进行降解, 从而抑制自噬; 而一些病毒利用自噬逃避宿主免疫系统的

清除, 从而促进病毒增殖<sup>[7-8]</sup>。苺氯素 1 (*Beclin-1*)是自噬关键调控基因及自噬体形成的核心基因, 参与调控自噬体的生成及成熟<sup>[9]</sup>, 故可作为自噬活性强弱的指标<sup>[10-11]</sup>。微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3)基因 *LC3* 是自噬过程重要的标志基因<sup>[12-13]</sup>, 并在自噬体膜的延伸和成熟中发挥着关键作用<sup>[14]</sup>, 当自噬发生时 *LC3* 蛋白被水解成 *LC3-I* 后与磷脂酰乙醇胺结合, 形成脂酰化 *LC3-II*, *LC3-II* 可以特异性结合到自噬体和自噬溶酶体膜上, 溶酶体中的水解酶得以降解自噬体中成分。可以通过蛋白质印迹法(western blot)检测 *LC3-I* 到 *LC3-II* 的带型转化来判断自噬是否发生<sup>[15]</sup>。选择性自噬衔接蛋白

收稿日期: 2022-12-09; 修订日期: 2023-01-03.

基金项目: 国家大宗淡水鱼产业技术体系项目(CARS-45-07); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目(2020TD31)

作者简介: 田立静(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种与生物技术. E-mail: 1559771336@qq.com

通信作者: 贾智英, 研究员, 从事鱼类遗传学和新品种选育研究. E-mail: Zyjia2010@163.com

(SQSTM1/Sequestosome1) P62 能协助募集 LC3 将入侵的病原体包裹在自噬体中<sup>[16]</sup>, 在自噬和天然免疫中均发挥着重要作用<sup>[17]</sup>。

本课题组经多年利用群体选育和分子辅助选育相结合的方法, 以德国镜鲤选育系(F<sub>4</sub>)为基础群, 开展了抗 CyHV-3 镜鲤新品种选育<sup>[18]</sup>, 孙佳鑫等<sup>[1]</sup>对抗病镜鲤选育系(F<sub>4</sub>)(抗 CyHV-3)感染 CyHV-3 的头肾和脾组织的病毒表达量进行评估, 表明抗病镜鲤选育系的病毒表达量显著低于德国镜鲤选育系。Jia 等<sup>[19]</sup>对抗病镜鲤选和德国镜鲤选育系在转录组水平上的分析结果显示, 自噬相关基因均具有显著差异表达。本研究利用实时荧光定量技术(RT-qPCR)确定不同感染时期抗病镜鲤选育系和德国镜鲤选育系肝组织的病毒表达量情况, 利用 RT-qPCR 和 western blot 检测鲤受 CyHV-3 感染不同阶段肝组织中的自噬通路中关键基因 *Beclin-1*、*P62* 的相对表达, 以及 *LC3* 基因和蛋白表达差异情况, 探究鲤受 CyHV-3 感染过程中是否发生自噬及自噬发生情况, 为鲤抗病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究选用的实验鱼为抗病镜鲤选育系(F<sub>4</sub>)(选育组)和德国镜鲤选育系(F<sub>4</sub>)(未选育组), 均来自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所宽甸水产试验站, 来自孙佳鑫等<sup>[1]</sup>攻毒感染实验, 将携带病毒的组织匀浆后投入养殖两组鱼的水体中在 48 h、96 h、144 h、192 h、240 h 分别采集 3 尾鱼的肝组织, 保存在 RNAlater 中, -80 °C 冰箱保存。其中选育组与未选育组均在 144 h 达到死亡高峰, 选育组成活率 87.3%, 未选育组成活率 62.3%<sup>[1]</sup>。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取 采用 QIAGEN RNA 提取试剂盒(RNeasy lipid tissue mini kit)提取样品的总 RNA。用 Nanovue 微量分光光度仪(GE 公司)检测 RNA 浓度及纯度(A260/A280 在 1.8~2.0), 并用 1.5%的琼脂糖凝胶检测 RNA 的质量。用 RNA 逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)将总 RNA 逆转录合成 cDNA, 并根

据荧光定量试剂盒说明要求将 cDNA 稀释到同一浓度, -80 °C 冰箱储存。

1.2.2 RT-qPCR 以上述稀释好的 cDNA 为模板, 以  $\beta$ -肌动蛋白基因( $\beta$ -actin)作为内参, 使用 SYBR Green I 荧光染料试剂盒检测 *TK*、*ORF72* 和 *Beclin-1*、*LC3*、*P62* 基因相对表达量。使用 Agilent Mx3005 荧光定量 PCR 仪进行 RT-qPCR 反应。本实验中所用的引物由生工生物工程(上海)有限公司提供, 引物信息见表 1。所有反应均设 3 组生物学重复。

表 1 引物序列  
Tab. 1 Primer sequence

| 引物名称<br>primer  | 引物序列(5'-3')<br>sequence (5'-3')                          | 退火温<br>度/°C<br>T <sub>m</sub> | 用途<br>application |
|-----------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| <i>LC3</i>      | F: CCAATCAGGCTTTCTTCTACTT<br>R: TGTCTCCTGGGAGGCATAGAC    | 64                            | RT-PCR            |
| <i>Beclin-1</i> | F: AGTGGGCAGTTCGGAACAAT<br>R: AGTACAGTTTGACCCAGGC        | 63                            | RT-PCR            |
| <i>P62</i>      | F: GAGCTGCCCTGGATACCATC<br>R: GGCCAGAAGTTTCAAACAGCA      | 64                            | RT-PCR            |
| <i>TK</i>       | F: CCCTTCACCGTCAGAATCTCTC<br>R: AGCTCGTACTGGGCCATCC      | 60                            | RT-PCR            |
| <i>ORF72</i>    | F: CGAGAAGCAGGGTATGGTC<br>R: GGCGTGTAGGGCACAAAG          | 60                            | RT-PCR            |
| $\beta$ -actin  | F: GCCGTGACCTGACTGACTACCT<br>R: GCCACATAGCAGAGCTTCTCCTTG | 61                            | RT-PCR            |

1.2.3 全蛋白提取 肝组织称重, 按 1 : 8 比例计算蛋白酶及磷酸酶抑制剂量, PMSF 10  $\mu$ L, 裂解液 970  $\mu$ L。匀浆后离心 12000 g/min, 30 min。上清液与 Sample buffer (4 $\times$ )以 1 : 3 的比例混匀, 金属浴 70 °C, 10 min, -80 °C 保存。

1.2.4 Western blot 取处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后湿转至聚偏氟乙烯膜(PVDF), 先用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 封闭结束后 Tris-HCL 平衡盐缓冲液(TBS)洗膜, 而后分别将兔源 total LC3 单克隆抗体、兔源  $\beta$ -actin 抗体用 TBS 稀释 1000 倍, 4 °C 孵育过夜, 经 TBST (TBS+Tween)洗膜后, 用辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG)(H&L), 用 TBS 稀释 2000 倍, 37 °C 孵育 1 h 后 TBS 洗膜。以上抗体均来自于 Affinity Biosciences (美国)。在暗室中显影, 根据 western blot 检测鉴定 LC3-I、LC3-II (分子量分别为 16 kD 和 14 kD)。

### 1.3 数据统计与分析

本研究使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算 RT-qPCR 实验数据得出的基因相对表达量, western blot 结果通过 Image J 软件分析每个标本的灰度值。利用 SPSS 19.0 和 Graphpad 8.0.1 分析软件对结果数据进行统计学分析及绘图, 结果用平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm SD$ ) 表示, 组间差异比较采用 one-way ANOVA 进行显著性差异分析, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义, \*、\*\*和\*\*\*分别表示在 0.05、0.01 和 0.001 水平上有统计学差异。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 不同感染时期病毒表达情况

在 CyHV-3 感染的不同时期选育组和未选育组肝组织中病毒基因的表达均呈现先升高后下降的趋势, 且均在感染 144 h 呈现最高(图 1)。TK 基因相对表达量在选育组和未选育组中感染 96 h 和 144 h 均极显著高于 48 h ( $P < 0.001$ ), 感染 192 h 和 240 h 极显著高于 48 h ( $P < 0.01$ ); 144 h 显著高于

192 h ( $P < 0.05$ ) (图 1a, 图 1b)。ORF72 基因相对表达量在选育组中感染 96 h 显著高于 48 h ( $P < 0.05$ ), 选育组中感染 144 h 极显著高于 48 h ( $P < 0.01$ ), 144 h 极显著高于 192 h ( $P < 0.01$ ); 而在未选育组中感染 144 h 极显著高于 48 h ( $P < 0.001$ ), 感染 192 h 和 240 h 显著高于 48 h ( $P < 0.05$ ), 144 h 极显著高于 96 h 和 192 h ( $P < 0.01$ ) (图 1c 和 1d)。此外, 在不同感染阶段, 选育组中 TK、ORF72 基因相对表达量均极显著低于未选育组 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) (图 2)。

### 2.2 不同感染时期 Beclin-1 基因表达量的变化

在 CyHV-3 感染的不同时期中, 选育组与未选育组中 Beclin-1 基因相对表达量均呈现先升高再下降的趋势。不同的是, 选育组在感染 48 h 时表达量最高并极显著高于 0 h 和 96 h ( $P < 0.001$ ), 96 h 至 240 h 极显著高于 0 h ( $P < 0.01$ ) (图 3a); 而未选育组在感染 48 h 至 240 h 极显著高于 0 h ( $P < 0.001$ ), 但在 96 h 最高且显著高于 48 h 和 144 h ( $P < 0.05$ ) (图 3b)。选育组 Beclin-1 基因相对表达量

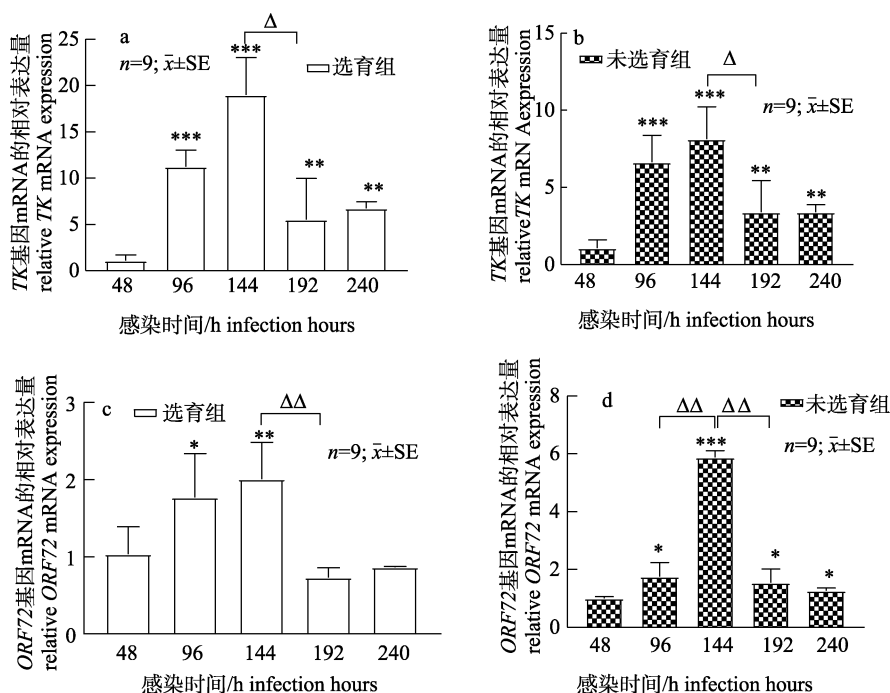


图 1 不同感染时期选育组和未选育组镜鲤中肝组织 TK 基因和 ORF72 基因相对表达量情况

\*、\*\*和\*\*\*分别表示在 0.05、0.01 和 0.001 水平上与 48 h 比较有统计学差异。Δ 和 ΔΔ 分别表示在 0.05 和 0.01 水平上两两比较有显著差异。

Fig. 1 Relative expression of TK gene and ORF72 gene in liver tissue of breeding and non-breeding *Cyprinus carpio* groups at different infection stages

The markers \*, \*\* and \*\*\* indicate significant difference at 0.05, 0.01 and 0.001 level compared with 48 h, respectively. The marker Δ and ΔΔ indicate significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively.

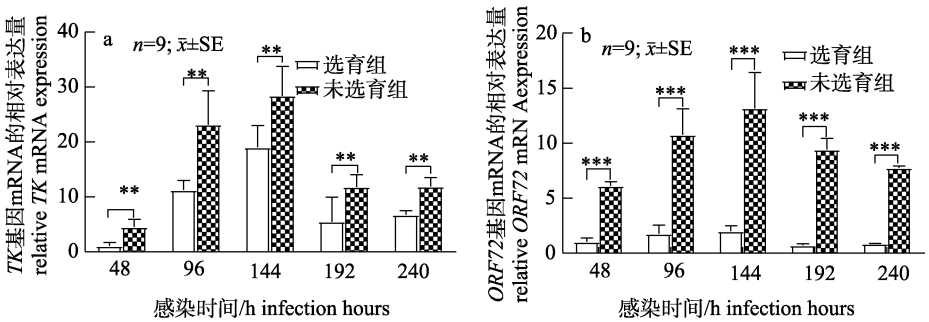


图 2 不同感染时期选育组和未选育组镜鲤肝组织中 *TK* 基因和 *ORF72* 基因相对表达情况  
\*\*和\*\*\*分别表示在 0.01 和 0.001 水平上有统计学差异。

Fig. 2 Comparison of relative expression of *TK* gene and *ORF72* gene in liver tissue of breeding and non-breeding *Cyprinus carpio* groups at different infection stages  
The markers \*\* and \*\*\* indicate significant difference at 0.01 and 0.001 level, respectively.

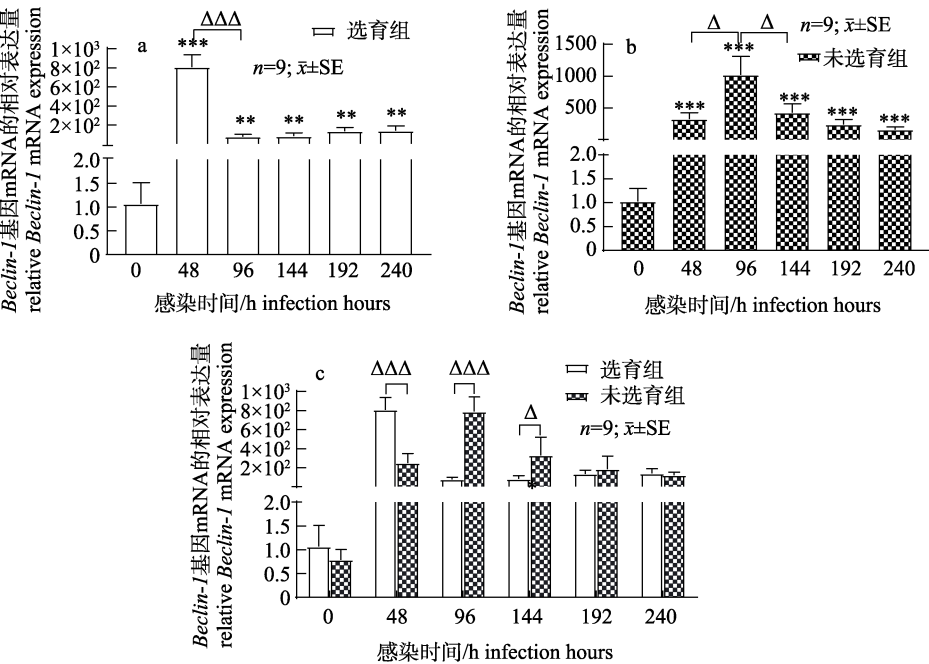


图 3 不同感染时期选育组和未选育组镜鲤肝组织中 *Beclin-1* 基因相对表达情况

\*\*和\*\*\*分别表示在 0.01 和 0.001 水平上与 0 h 有统计学差异。Δ 和 ΔΔΔ 分别表示在 0.05 和 0.001 水平有显著差异。

Fig. 3 Comparison of relative expression of *Beclin-1* gene in liver tissue of breeding and non-breeding *Cyprinus carpio* groups at different infection stages

The markers \*\* and \*\*\* indicate significant difference at 0.01 and 0.001 level compared with 0 h, respectively.  
Δ and ΔΔΔ indicate difference at 0.05 and 0.001 level, respectively

在感染 48 h 高于未选育组并达到极显著差异 ( $P<0.001$ ), 而在其他感染时期均低于选育组, 且在 96 h 达到极显著差异 ( $P<0.001$ ), 在 144 h 达到显著差异 ( $P<0.05$ ) (图 3c)。

2.3 不同感染时期 LC3 表达量的变化

在 CyHV-3 感染的不同时期中, 选育组与未选育组的肝组织中 *LC3* 基因相对表达量呈先升高再下降的趋势。不同的是, 选育组在感染 48 h 和 96 h 极显著高于 0 h ( $P<0.001$ ), 但在 48 h 最高,

在 144 h 至 240 h 极显著高于 0 h ( $P<0.01$ ), 96 h 极显著高于 144 h ( $P<0.001$ ) (图 4a); 而未选育组在感染 48 h 至 240 h 极显著高于 0 h ( $P<0.001$ ), 但在 96 h 最高且极显著高于 48 h 和 144 h ( $P<0.001$ ) (图 4b)。选育组 *LC3* 基因相对表达量在感染 48 h 高于未选育组并达到极显著差异 ( $P<0.001$ ), 而在其他感染时期均呈现未选育组高于选育组, 且在 96 h 达到极显著差异 ( $P<0.001$ ), 在 144 h 和 192 h 达到显著差异 ( $P<0.05$ ) (图 4c)。

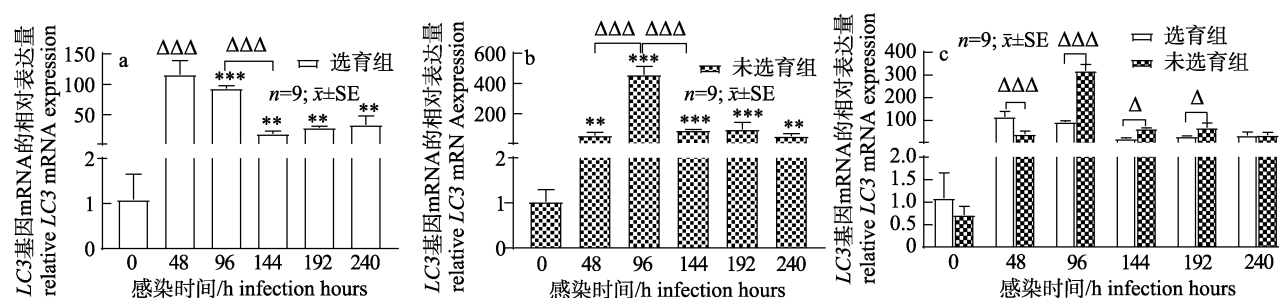


图 4 不同感染时期选育组和未选育组鲤肝组织中 *LC3* 基因相对表达量情况

\*\*和\*\*\*分别表示与 0 h 在 0.05, 0.01 和 0.001 水平上有统计学差异。Δ 和 ΔΔΔ 分别表示在 0.05 和 0.001 水平有显著差异。

Fig. 4 Comparison of relative expression of *LC3* gene in liver tissue of breeding and non-breeding *Cyprinus carpio* groups at different infection stages

The markers \*\* and \*\*\* indicate significant difference at 0.01 and 0.001 level compared with 0 h, respectively.

Δ and ΔΔΔ indicate difference at 0.05 and 0.001 level, respectively.

在 CyHV-3 感染的不同时期中, 选育组与未选育组的肝组织中 *LC3-II/LC3-I* 的蛋白含量比值呈先上升再下降的趋势, 与 *LC3* 基因相对表达趋势一致。选育组在感染 48 h 时最高并极显著高于 0 h ( $P<0.001$ ), 96 h 时极显著高于 0 h 和 144 h ( $P<0.01$ )(图 5b、6a); 未选育组在感染 48 h 和 96 h 极显著高于 0 h ( $P<0.001$ ), 但在 96 h 最高且极显著高于 144 h ( $P<0.001$ )(图 5a、6b)。LC3-II/LC3-I 的蛋白含量比值在感染 48 h 时选育组极显著高于未选育组 ( $P<0.001$ ), 但在感染 96 h 时未选育组极显著高于选育组 ( $P<0.001$ )(图 6c)。

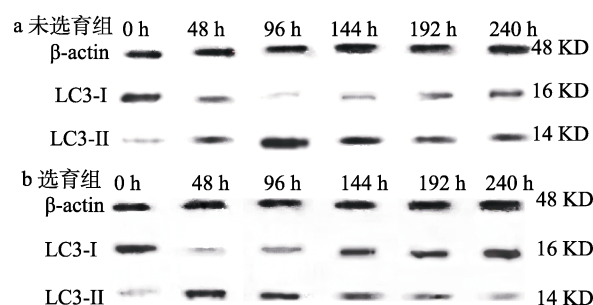


图 5 不同感染时期选育组和未选育组鲤肝组织中 *LC3* 蛋白表达情况

Fig. 5 Expression of *LC3* in liver tissues of breeding and non-breeding *Cyprinus carpio* groups at different infection stages determined by western blot

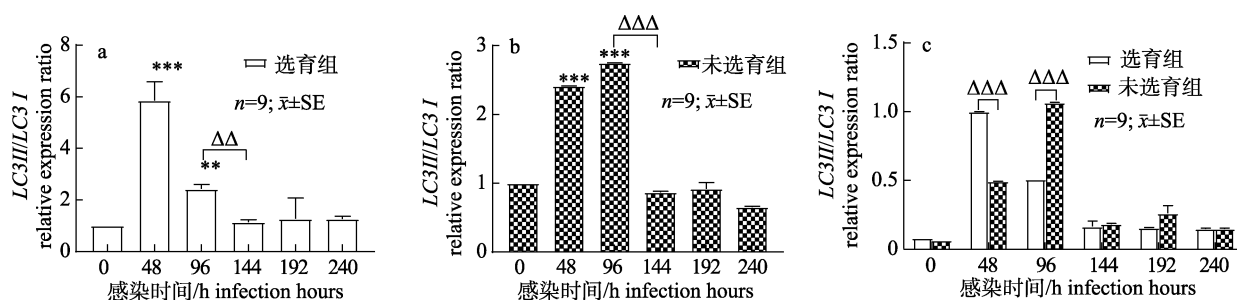


图 6 不同感染时期选育组和未选育组鲤肝组织中 *LC3-II/LC3-I* 的灰度比值变化

\*\*和\*\*\*分别表示与 0 h 在 0.01 和 0.001 水平上具有显著差异。Δ 和 ΔΔΔ 分别表示在 0.05 和 0.001 水平有显著差异。

Fig. 6 Comparison of intensity band ratios of *LC3-II/LC3-I* in liver of breeding and non-breeding *Cyprinus carpio* groups at different infection stages

The markers \*\* and \*\*\* indicate significant difference at 0.01 and 0.001 level, respectively. Δ and ΔΔΔ indicate difference at 0.05 and 0.001 level, respectively.

## 2.4 不同感染时期两组鱼间 *P62* 基因表达量的变化

在 CyHV-3 感染的不同时期中, 选育组和未选育组肝组织中 *P62* 基因相对表达量呈现先升高再下降的趋势。不同的是, 选育组在感染 48 h 时

最高且极显著高于 0 h 和 96 h ( $P<0.001$ ), 96~240 h 均显著高于 0 h ( $P<0.05$ )(图 7a); 而未选育组在感染 48 h 至 240 h 均极显著高于 0 h ( $P<0.001$ ), 但在 96 h 最高且显著高于 48 h 和 144 h ( $P<0.05$ )(图 7b)。选育组 *P62* 基因相对表达量在 48 h 显著高

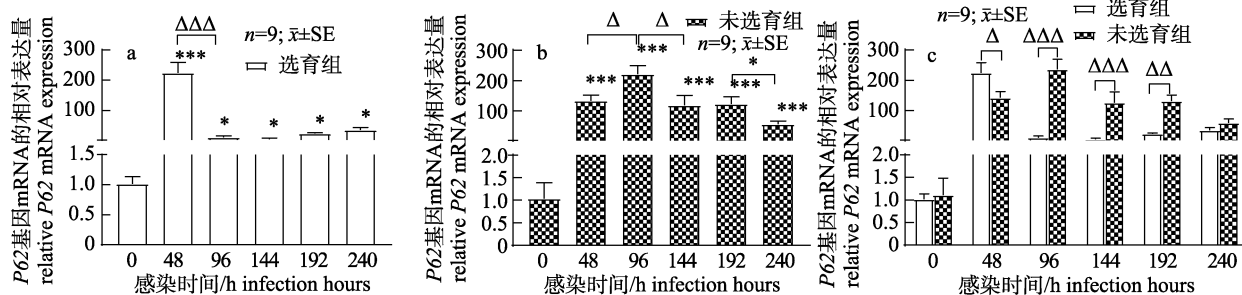


图7 不同感染时期及两组鲤肝组织中 *P62* 基因相对表达量情况

\*和\*\*\*分别表示与0 h在0.01和0.001水平上具有显著差异. Δ和ΔΔΔ分别表示在0.01和0.001水平有显著差异. Δ和ΔΔΔ分别表示在0.05和0.001水平有显著差异.

Fig. 7 Comparison of relative expression of *P62* gene in liver of breeding and non-breeding *Cyprinus carpio* groups at different infection stages

The markers \* and \*\*\* indicate significant difference at 0.05 and 0.001 level, respectively. Δ and ΔΔΔ indicate difference at 0.05 and 0.001 level, respectively

于未选育组( $P<0.05$ ), 在其他感染时期均低于未选育组, 且在96 h和144 h达到极显著差异( $P<0.001$ ), 在192 h达到极显著水平( $P<0.01$ )(图7c)。

### 3 讨论

自噬作为先天免疫重要的组成部分, 可以分为自噬起始、延伸、自噬体的形成、与溶酶体结合形成自噬溶酶体、降解5个过程<sup>[20]</sup>, 并在病原体感染机体的过程中具有双重作用: 一方面可以通过激活或增强宿主免疫应答发挥抗病毒作用, 另一方面也可以被抑制或拮抗来增强病毒的复制和感染<sup>[21-22]</sup>。因此, 深入研究自噬的发生机制及其与疾病发生发展的关系对疾病防控具有重要意义<sup>[23]</sup>。目前关于鱼类感染病毒后自噬反应已有较多研究, Li等<sup>[24]</sup>发现红石斑鱼神经坏死病毒(RGNNV)和其衣壳蛋白能够诱导自噬发生病毒通过阻断自噬体与溶酶体融合促进复制。Dong等<sup>[25]</sup>证明了传染性胰脏坏死病毒(IPNV)感染诱导大马哈鱼胚胎细胞CHSE-214发生自噬, 使用自噬诱导剂rapamycin提高细胞的自噬水平可以促进IPNV mRNA的复制。但关于鲤抗CyHV-3的自噬反应相关研究鲜有报道, 因此本研究从自噬角度出发研究机体的抗病毒免疫机制。

CyHV-3是导致鲤与锦鲤感染并死亡的DNA双链病毒, 严重危害养殖业的发展。本研究以*TK*和*ORF72*为标志基因确定感染鲤不同时期肝组织的病毒表达量。结果显示, CyHV-3感染两组鱼

后不同时期肝组织中*TK*和*ORF72*基因相对表达量均呈先上升后下降的趋势, 并在感染144 h达到峰值, 该研究结果与孙佳鑫等<sup>[1]</sup>在脾、肾组织上的病毒表达量趋势相同, 与Jia等<sup>[19]</sup>的病毒感染死亡率时间是一致的, 推测在CyHV-3感染过程中鲤肝组织产生一系列免疫反应以抵御病毒的入侵。此外, 选育组肝组织中的病毒表达量均显著低于未选育组, 与孙佳鑫等<sup>[1]</sup>在脾、肾组织上的研究结果相同, 说明选育组与未选育组肝组织均受到了病毒感染, 且选育组的抗病能力强于未选育组, 说明通过选育提高了机体抗病毒能力。

本研究系统地从自噬起始到自噬溶酶体的形成开展了自噬在鲤抗CyHV-3中的研究。*Beclin-1*是自噬的起始基因调控自噬前体的形成, 其表达量跟自噬活性呈正相关<sup>[26]</sup>, 宿鑫<sup>[27]</sup>发现大鼠发生急性心肌缺血时上调*Beclin-1*基因表达水平, 表明自噬功能被激活。Russell等<sup>[28]</sup>研究发现在过表达*Beclin-1*后自噬体显著积累。本研究结果显示, 在CyHV-3感染后, 两组鱼中*Beclin-1*基因相对表达量均显著升高, 说明病毒感染使自噬功能被激活。*Beclin-1*基因相对表达量均呈先上升后下降的趋势, 在病毒感染48 h选育组达到峰值且极显著高于未选育组, 在96 h选育组的表达量下降, 未选育组达到峰值且极显著高于选育组, 在144 h未选育组显著高于选育组, 说明自噬主要发生在病毒感染早期且选育组早于未选育组激活自噬功能。*LC3*是自噬的标志基因, 经翻译修饰后定

位在自噬体膜上,当自噬发生时,LC3 经酶切形成 LC3-I 后与 PE 结合生成脂酰化 LC3-II,LC3-II/LC3-I 的比值可以代表自噬过程强弱<sup>[29-30]</sup>。Kabeya 等<sup>[29]</sup>发现饥饿可以引起 LC3 水解成 LC3-I 后修饰成 LC3-II 导致自噬增强。Wang 等<sup>[31]</sup>发现在猪肺炎支原体感染后 LC3 表达量升高,且 LC3-II/LC3-I 的比值与之相对应,证明肺支原体感染增强自噬的发生。本研究结果显示,在 CyHV-3 感染后 LC3 基因相对表达量及 LC3-II/LC3-I 的比值均显著升高,该研究结果与 *Beclin-1* 基因研究结果是一致的,进一步说明鲤在病毒感染后自噬体的形成。LC3 蛋白含量趋势与基因相对表达量结果一致,均呈先上升后下降的趋势,在 48 h 选育组达到最高且极显著高于未选育组,在 96 h 选育组的表达量下降,未选育组中达到峰值且极显著高于选育组,在 144~192 h 未选育组显著高于选育组,说明后期未选育组自噬体形成高于选育组。*P62* 是自噬通量标志基因,与 LC3 蛋白直接作用特异性地定位于自噬溶酶体上<sup>[32]</sup>。有研究表明 *P62* 的表达量升高,自噬体降解过程被抑制发生不完全自噬,从而促进病毒复制<sup>[31-33]</sup>;*P62* 的表达量降低,自噬体被降解发生完全自噬以抵抗病毒<sup>[33]</sup>。本研究结果显示,在 CyHV-3 感染后,两组鱼中 *P62* 基因相对表达量均呈先上升后下降的趋势,在 48 h 选育组达到峰值且显著高于未选育组,在 96 h 选育组表达量下降,未选育组达到峰值且极显著高于选育组,且在 144 h、192 h 未选育组均极显著高于选育组,说明鲤在病毒感染后自噬发生,但自噬体降解过程被抑制,这与 Wang 等<sup>[31]</sup>的研究结果是一致的,进一步表明自噬体发生了聚集,推测在 CyHV-3 感染过程中自噬体降解过程被抑制发生不完全自噬且促进病毒复制。此外,鲤肝组织中 *Beclin-1*、*LC3*、*P62* 基因表达量与 LC3-II/LC3-I 的比值在 48 h 选育组均显著高于未选育组,在 96 h 未选育组均显著高于选育组,说明在选育中更早产生自噬反应,而在未选育中产生了更为强烈的自噬反应。

以上结果显示, CyHV-3 感染可诱导鲤自噬发生,但自噬体降解过程被抑制,推测产生不完全自噬从而促进病毒复制。但选育组比未选育组产

生较早的自噬反应,未选育组比选育组自噬反应更为强烈,因而不能确定完全自噬是否发生,仍需进一步深入研究。本研究结果将为深入探究鲤抗 CyHV-3 的作用机制提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Sun J X, Shi L Y, Jiang X N, et al. Research on expression of virus in Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) F<sub>4</sub> disease resistant strains[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2021, 30(2): 258-265. [孙佳鑫, 石连玉, 姜晓娜, 等. 镜鲤抗疱疹病毒 (CyHV-3)F<sub>4</sub> 抗病品系病毒表达量评估[J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(2): 258-265.]
- [2] Zhu X, Wang H, Li X W, et al. Advances in koi herpesvirus disease[J]. Chinese Veterinary Science, 2011, 41(1): 106-110. [朱霞, 王好, 李新伟, 等. 锦鲤疱疹病毒病的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(1): 106-110.]
- [3] Kong S Y, Jiang Y S, Wang Q, et al. Detection methods of Cyprinid herpesvirus 2 infection in silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) via a pORF72 monoclonal antibody[J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(12): 1791-1798.[PubMed]
- [4] Gomes Noll J C, Joshi L R, do Nascimento G M, et al. Deletion of the thymidine kinase gene attenuates Caprine alphaherpesvirus 1 in goats[J]. Veterinary Microbiology, 2019, 237: 108370.
- [5] Levine B. Eating oneself and uninvited guests: Autophagy-related pathways in cellular defense[J]. Cell, 2005, 120(2): 159-162.
- [6] Yorimitsu T, Klionsky D J. Autophagy: Molecular machinery for self-eating[J]. Cell Death & Differentiation, 2005, 12(2): 1542-1552.
- [7] Cadwell K. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: Balancing defence and homeostasis[J]. Nature Reviews Immunology, 2016, 16(11): 661-675.
- [8] Hargarten J C, Williamson P R. Epigenetic regulation of autophagy: A path to the control of autoimmunity[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 1864.
- [9] Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages[J]. Nature Cell Biology, 2009, 11(4): 385-396.
- [10] Xu H D, Qin Z H. Beclin 1, bcl-2 and autophagy[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2019, 1206: 109-126.
- [11] Shen Y, Liang L Z, Hong M H, et al. Expression and clinical significance of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and Beclin1 in epithelial ovarian cancer[J]. Chinese



- Journal of Cancer, 2008, 27(6): 595-599. [沈扬, 梁立治, 洪明晃, 等. 微管相关蛋白 LC3 和自噬基因 Beclin1 在上皮性卵巢癌中的表达及其意义[J]. 癌症, 2008, 27(6): 595-599.]
- [12] Huang R, Xu Y F, Wan W, et al. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation[J]. Molecular Cell, 2015, 57(3): 456-466.
- [13] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research[J]. Cell, 2010, 140(3): 313-326.
- [14] Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, et al. LC3 and GATE-16N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis[J]. Developmental Cell, 2011, 20(4): 444-454.
- [15] Xie Z P, Klionsky D J. Autophagosome formation: Core machinery and adaptations[J]. Nature Cell Biology, 2007, 9(10): 1102-1109.
- [16] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: The p62/SQSTM1 paradigm[J]. Essays in Biochemistry, 2017, 61(6): 609-624.
- [17] Jeong S J, Zhang X Y, Rodriguez-Velez A, et al. p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2019, 31(6): 458-471.
- [18] Sun J X, Shi L Y, Jia Z Y. Research and the status of the progress of cyprinid herpesvirus 3 in common carp and its disease resistance breeding[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 32(6): 69-74. [孙佳鑫, 石连玉, 贾智英. 鲤疱疹病毒(CyHV-3)及抗病选育研究现状与进展[J]. 水产学杂志, 2019, 32(6): 69-74.]
- [19] Jia Z Y, Wu N, Jiang X N, et al. Integrative transcriptomic analysis reveals the immune mechanism for a CyHV-3-resistant common carp strain[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 687151.
- [20] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- [21] Dorn B R, Dunn W A Jr, Progulski-Fox A. Bacterial interactions with the autophagic pathway[J]. Cellular Microbiology, 2002, 4(1): 1-10.
- [22] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy[J]. Nature Cell Biology, 2013, 15(7): 713-720.
- [23] Shintani T, Klionsky D J. Autophagy in health and disease: A double-edged sword[J]. Science, 2004, 306(5698): 990-995.
- [24] Li C, Liu J X, Zhang X, et al. Red grouper nervous necrosis virus (RGNNV) induces autophagy to promote viral replication[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 908-916.
- [25] Dong Y, Zhao J Z, Chen X Y, et al. Autophagy induced by infectious pancreatic necrosis virus promotes its multiplication in the Chinook salmon embryo cell line CHSE-214[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 375-381.
- [26] Aita V M, Liang X H, Murty V V V S, et al. Cloning and genomic organization of Beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21[J]. Genomics, 1999, 59(1): 59-65.
- [27] Su X. Effect of Shuangshen Huoxue Granule on the expression of LC3, p62 and beclin-1 in rats with acute myocardial ischemia[D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2021. [宿鑫. 双参活血颗粒对急性心肌缺血大鼠 LC3、p62 和 Beclin-1 表达的影响[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2021.]
- [28] Russell R C, Tian Y, Yuan H X, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase[J]. Nature Cell Biology, 2013, 15(7): 741-750.
- [29] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. The EMBO Journal, 2000, 19(21): 5720-5728.
- [30] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting[J]. Autophagy, 2007, 3(6): 542-545.
- [31] Wang Z D, Wen Y K, Zhou B Q, et al. Incomplete autophagy promotes the replication of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Journal of Microbiology, 2021, 59(8): 782-791.
- [32] Ishii T, Warabi E, Siow R C M, et al. Sequestosome1/p62: A regulator of redox-sensitive voltage-activated potassium channels, arterial remodeling, inflammation, and neurite outgrowth[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 65: 102-116.
- [33] Li X Y. Mechanism study of bovine coronavirus-mediated autophagy regulating viral infection[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2022. [李旭阳. 牛冠状病毒介导的细胞自噬调控病毒感染的机制研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2022.]



## Autophagy induced by CyHV-3 in the common carp (*Cyprinus carpio*) liver

TIAN Lijing<sup>1,2,3</sup>, JIANG Xiaona<sup>2,3</sup>, REN Wanying<sup>2,3</sup>, LI Yan<sup>1,2,3</sup>, GE Yanlong<sup>2,3</sup>, LI Chitao<sup>2,3</sup>, HU Xuesong<sup>2,3</sup>, CHENG Lei<sup>2,3</sup>, SHI Xiaodan<sup>2,3</sup>, SHI Lianyu<sup>2,3</sup>, JIA Zhiying<sup>1,2,3</sup>

1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

3. Research Center for Genetic and Breeding Engineering Technology of Common Carp, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China

**Abstract:** CyHV-3 infection causes a highly lethal disease in common carp, and it can be mainly detected by using *TK* and *ORF72* gene markers. Autophagy is a stress protection mechanism in cells, mainly marked by *Beclin-1*, *LC3*, and *P62* genes. This paper aimed to analyze the differential expression of CyHV-3 marker genes, *TK* and *ORF72*, in common carp (*Cyprinus carpio*) and autophagy marker genes *Beclin-1*, *LC3*, and *P62* during different stages of CyHV-3 infection, and to explore the occurrence of autophagy in CyHV-3 infected common carp. The results showed that: (1) The relative expression of *TK* and *ORF72* genes and the autophagy marker genes, *Beclin-1*, *LC3*, and *P62*, in the breeding group and the non-breeding group increased initially and then decreased. The relative expression of *TK* and *ORF72* genes in the breeding group was significantly lower than that in the non-breeding group ( $P<0.01$ ), and reached the highest at 144 h post-infection; (2) The relative expression of *Beclin-1*, *LC3*, and *P62* genes in the breeding group reached the highest level at 48 h post-infection, and the expression of *Beclin-1* and *LC3* genes in the breeding group was extremely significantly higher than that in the non-breeding group ( $P<0.001$ ), and *P62* expression was extremely significantly higher in the breeding group than that in the non-breeding group ( $P<0.05$ ); (3) The relative expression of *Beclin-1*, *LC3*, and *P62* genes in the non-breeding group reached the highest level at 96 h post-infection and was significantly higher than that in the breeding group ( $P<0.001$ ), while the relative expression of *P62* gene was significantly higher at 144 h and 192 h post-infection in the non-breeding group ( $P<0.01$ ), indicating that the expression of *P62* gene was clustered; (4) The trend of LC3 protein expression was consistent with the trend of relative gene expression. The above studies indicate that CyHV-3 infection can induce autophagy in carp. It is speculated that the autophagy degradation process may be inhibited resulting in incomplete autophagy, thus promoting viral replication and infection. The probability of occurrence of complete autophagy needs further investigation. This study provides an important basis for the investigation of the mechanism of carp anti-CyHV-3 and the molecular mechanism of fish autophagy during viral infection.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; CyHV-3; autophagy; *Beclin-1*; *P62*; *LC3*

**Corresponding author:** JIA Zhiying. E-mail: Zyjia2010@163.com