

Meng H X, Lin L Y, Yao J Y, *et al.* Biological activity of recombinant IFN- γ from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and its protective mechanism against LMBV infection [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2026, 50(6): 062608. [孟淮鑫, 蔺凌云, 姚嘉赞, 等. 重组大口黑鲈IFN- γ 的生物学活性及其抗LMBV感染的保护机制 [J]. 水生生物学报, 2026, 50(6): 062608.]

重组大口黑鲈IFN- γ 的生物学活性及其抗LMBV感染的保护机制

孟淮鑫^{1,2} 蔺凌云² 姚嘉赞² 郭琼瑶^{2,3} 沈锦玉^{1,2*} 潘晓艺^{2,3*}

(1. 湖州师范大学生命科学学院, 湖州 313000; 2. 浙江省淡水水产研究所(浙江省淡水渔业环境监测站), 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 湖州市渔业环境与水产品质量安全重点实验室, 湖州 313001; 3. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院, 连云港 222005)

摘要: 为了探讨II型干扰素IFN- γ (interferon- γ)在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)抗大口黑鲈蛙虹彩病毒(Largemouth Bass Ranavirus, LMBV)感染中的作用及机制, 本研究利用pCold-TF/Rosetta (DE3)表达体系原核表达并纯化获得重组蛋白rMsIFN- γ , 随后在大口黑鲈脊髓细胞系(*Micropterus salmoides* spinal cord cell line, MSSC)及鱼体水平评估其活性与抗LMBV效果。结果显示, rMsIFN- γ 分子量约21 kD。体外可显著上调MSSC细胞*Mx*、*ISG15*、*SOCS1*和*IRF9*的表达, 并在预防性与治疗性处理条件下均表现出一定抗LMBV作用。体内方面, rMsIFN- γ 可诱导脾脏与头肾中*Mx*、*ISG15*、*SOCS1*、*IRF9*及促炎因子*IL-1 β* 、*TNF- α* 和趋化因子*IL-8*表达。在体内治疗性实验中, 感染早期rMsIFN- γ 处理组*Mx*与*ISG15*表达水平低于病毒感染对照组, 但*IL-1 β* 与*IL-8*显著上调, LMBV即刻早期蛋白ICP46表达下降; 随后组织病毒载量降低并延缓感染鱼的死亡进程。综上, rMsIFN- γ 在体外与体内均具有一定抗LMBV作用, 其保护效应可能与典型干扰素诱导的ISGs通路及体内炎症/趋化反应协同参与有关。本研究揭示了IFN- γ 在大口黑鲈抗LMBV中的潜在应用价值, 为其免疫防控提供了新思路。

关键词: 干扰素- γ ; 抗病毒活性; 大口黑鲈蛙虹彩病毒(LMBV); 大口黑鲈

中图分类号: S942.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2026)06-062608-15

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0423 CSTR: 32229.14.SSSWXB.2025.0423



大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)是一种原产于北美洲的淡水鱼类, 因其生长速度快、环境适应能力强、肉质优良, 自20世纪80年代引入中国以来, 已在全国范围内广泛养殖, 并成为我国重要的淡水养殖品种之一, 在水产经济发展中占据重要地位^[1,2]。随着养殖密度和规模不断扩大, 疾病问题日益突出, 尤其是由大口黑鲈蛙虹彩病毒(Largemouth bass ranavirus, LMBV)引起的病毒性疾病, 已成为制约其养殖效益的主要因素之一。LMBV属于虹彩病毒科(Iridoviridae)蛙虹彩病毒属(Ranavirus), 感染可导致肝脏、脾脏等多器官组织损伤, 并干扰宿主

免疫功能, 常伴随细胞凋亡和强烈炎症反应; 自然感染LMBV的大口黑鲈死亡率通常较高, 可达50%至90%, 是目前造成该物种养殖损失最严重的病原之一^[3-6]。

近年来, 针对鱼类病毒性疾病的防控手段取得了一定进展。例如, 基于LMBV的主要衣壳蛋白(Major Capsid Protein, MCP)为主要免疫抗原构建重组疫苗的免疫策略显著提高了鱼体对LMBV的抵抗力, 并在养殖中展现出良好的预防效果^[4,7,8]。此外, 已有研究表明, 植物提取物和益生菌等免疫增强剂可在一定程度上提高鱼类抗病能力。例如

收稿日期: 2025-11-25; 修订日期: 2026-02-06

基金项目: 湖州市重点研发项目(2025ZD2035); 浙江省“三农九方”科技协作计划(2026SNJF043); 浙江省科研院所专项(2025YSZX02)资助 [Supported by the Key Research and Development Project of Huzhou City (2025ZD2035); the Zhejiang Province “Sannong Jiufang” Science and Technology Cooperation Program (2026SNJF043); the Special Program for Scientific Research Institutes of Zhejiang Province (2025YSZX02)]

作者简介: 孟淮鑫(1997—), 男, 硕士研究生, 主要从事水生动物病害研究。E-mail: 572896463@qq.com

通信作者: 沈锦玉, 研究员; E-mail: sjinyu@126.com 潘晓艺, 研究员; E-mail: panxiaoyi@163.com *共同通信作者

从绿茶中提取的表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin-3-gallate, EGCG)被证实可在大口黑鲈中有效抑制LMBV的复制;在其他鱼类中,投喂枯草芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)益生菌可有效增强罗非鱼(*Oreochromis* spp.)的免疫反应并提高其对罗非鱼湖病毒(Tilapia lake virus, TiLV)感染的抗性^[9, 10]。相较于疫苗和免疫增强剂,细胞因子通过调控宿主的先天免疫通路,快速诱导抗病毒相关基因表达,在调控感染早期防御反应中具有独特优势^[11]。

干扰素(Interferon, IFN)是一种能诱导宿主产生抗病毒反应并调控免疫应答的细胞因子,能通过影响RNA和蛋白质的合成等细胞代谢过程发挥作用,属于先天免疫的重要组成部分^[12, 13]。IFN- γ 属于II型干扰素,目前在哺乳动物中发现的II型干扰素仅包含IFN- γ ,主要由活化T淋巴细胞(T lymphocytes, T cells)和自然杀伤细胞(Natural killer cells, NK cells)产生,参与调节免疫细胞功能、促进抗原呈递,诱导多种抗病毒基因的表达^[14]。IFN- γ 作为免疫调节剂,在人类医疗的多个领域中已开展了深入的研究,尤其是在免疫缺陷、癌症免疫疗法和抗病毒治疗方面^[15–17]。在畜牧养殖领域,IFN- γ 在猪、牛等经济动物中已开展了抗病毒活性评估。例如通过不同载体表达的重组猪IFN- γ 具有显著的抗病毒活性,可有效抑制塞内卡病毒A (Seneca virus A, SVA)和非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)的复制^[18, 19];重组牛IFN- γ 也被证实具有广谱抗病毒作用,能显著抑制口蹄疫病毒(Foot-and-mouth Disease Virus, FMDV)和牛传染性鼻气管炎病毒(Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus, IBRV)的增殖^[20, 21]。对鱼类II型干扰素的研究起步较晚,但也已取得不少进展,与哺乳动物不同的是,硬骨鱼中存在两种II型干扰素,即IFN- γ 和IFN- γ rel,这两者在不同物种中可通过多种受体组合激活下游抗病毒通路^[22]。鱼类IFN- γ 能激活Janus激酶-信号转导与转录激活因子通路(Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway, JAK-STAT)等信号并诱导抗病毒相关基因表达,从而增强宿主对病毒感染的防御能力,例如在中华鲟(*Acipenser sinensis*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)中研究发现IFN- γ 能够有效增强机体对病毒感染的抵抗力^[23–25]。相比之下,IFN- γ rel虽与IFN- γ 同属II型干扰素,但在结构特征、受体及免疫效应上存在区别。IFN- γ rel同样具备抗病毒潜力,银鲫(*Carassius auratus langsdorfii*)的重组IFN- γ rel表现出对鲫造血器官坏死病毒(Crucian carp hematopoietic necrosis virus,

CHNV)的显著抗病毒活性^[26];在七星鲈(*Lateolabrax maculatus*)中,IFN- γ rel能够通过特定的配体-受体组合激活机体的抗病毒免疫状态,显著降低大口黑鲈溃疡综合征病毒(Largemouth bass ulcer syndrome virus, LBUSV)的病毒载量^[22]。

近年来,针对大口黑鲈干扰素系统在抗病毒及细菌感染的免疫保护作用研究已取得显著进展。已有研究构建食品级乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)表达大口黑鲈IFN- α 3,口服给药显著提高鱼体存活率并降低病毒载量,验证了I型干扰素在体内抗LMBV的潜力^[27];在另一项研究中,克隆并表达大口黑鲈IFN- γ ,可显著提高诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)感染鱼的存活率并展现了II型干扰素在大口黑鲈中的免疫调节作用^[28];同属鲈形目的七星鲈,其II型干扰素IFN- γ 和IFN- γ rel可通过II类细胞因子受体家族B(Class II cytokine receptor family B, CRFB)受体组合激活JAK-STAT信号并抑制同属蛙虹彩病毒属的LBUSV复制^[22]。然而,关于II型干扰素IFN- γ 在大口黑鲈抵御LMBV过程中的直接抗病毒机制仍缺乏系统性的深入研究。

本研究扩增大口黑鲈II型干扰素IFN- γ (区别于IFN- γ rel),在大肠杆菌中进行原核表达,对表达纯化的IFN- γ 重组蛋白开展体内外抗LMBV效果评估,选择检测典型干扰素刺激基因(Interferon-stimulated genes, ISGs)中的*Mx* (Myxovirus resistance)和*ISG15* (Interferon-stimulated gene 15)以反映抗病毒效应分子的诱导水平,同时检测*IRF9* (Interferon regulatory factor 9)和*SOC1* (suppressor of cytokine signaling 1),分别作为信号转导与负反馈调控指标。鉴于脊椎动物中IFN- γ 具有突出的免疫调节作用,本研究同步检测促炎因子*IL-1 β* (Interleukin-1 beta)、*TNF- α* (Tumor necrosis factor alpha)和趋化因子*IL-8* (Interleukin-8)的表达。在LMBV攻毒实验中,进一步以鱼的存活率作为整体保护效应的终点指标,检测脾和头肾等关键免疫器官的病毒载量以评估体内病毒复制水平;并以病毒ICP46的表达变化作为评估病毒感染状态的辅助指标,旨在为大口黑鲈对IFN- γ 调控宿主免疫抗病毒机制及其在LMBV防控中的潜在应用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康大口黑鲈,规格为(9.0 $\pm$ 1.0) g,购自浙江省湖州市某规模化养殖场,于循环水养殖桶中暂养1周备用,养殖水温保持在(26.0 $\pm$ 2.0) $^{\circ}$ C,日投饲2次(8:00—9:00和17:00—18:00)。实验用大口黑鲈蛙虹

彩病毒毒株为LMBV-ZJDSS-F5 (经检测病毒滴度为 $10^{9.0}$ TCID₅₀/mL), 由本实验室分离、纯化并保存^[29], 实验用鲈脊髓组织细胞系(*Micropterus salmoides* spinal cord cell line, MSSC)由本实验室建立并保存^[30]。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞及Rosetta (DE3)感受态细胞购自上海碧云天生物技术有限公司。pCold-TF质粒购自武汉淼灵生物科技有限公司。

1.2 大口黑鲈IFN- γ 原核表达质粒的构建

提取大口黑鲈脾脏RNA, 合成cDNA, 采用以下体系扩增IFN- γ 基因(引物序列见表1): cDNA 2 μ L, 2 $\times$ Hieff Canace[®] PCR Master Mix (翌圣) 25 μ L, IFN- γ F和IFN- γ R (10 μ mol/L)各 2 μ L, ddH₂O补足至 50 μ L。扩增程序: 98 $^{\circ}$ C, 3min; 98 $^{\circ}$ C 10s, 54 $^{\circ}$ C 20s,

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'—3')	来源 Source	用途 Application
IFN- γ F	CGCCATATGTTTCAAATC	XM_038	PCR
IFN- γ R	CCTCTGAAGATGAACA	707474.1	
<i>Mx</i> F	CGCGGATCCCTAGACTCT CAGATGAGTTTGGC	[31]	qPCR
<i>Mx</i> R	ACACGACAGACAAAGAC CCATAA		
<i>ISG15</i> F	ATGATTTGAGGTGCAAC ATGAGC	[32]	
<i>ISG15</i> R	TCAAGACCAAGGTCCAG CACA		
<i>SOCS1</i> F	GTAGTCTGAAAGTCTACC ACCCATC	XM_0387 12981.1	
<i>SOCS1</i> R	AGTTGACAGCACCTATC GC		
<i>IRF9</i> F	CCAGGCAAGGTGCTCAT GTT	[33]	
<i>IRF9</i> R	GAAGCTGACGGATGGGA GT		
<i>IL-1β</i> F	CGAGGCGGTAGACCTTG TAG	[4]	
<i>IL-1β</i> R	TGGTGGAACACAGCATG GAGC		
<i>TNF-α</i> F	AGGGTGCACGTAGTTTCG ACA	[4]	
<i>TNF-α</i> R	ACTTCGTCTACAGCCAGG CA		
<i>IL-8</i> F	AGTAACGCGAGACCCTG TGG	[34]	
<i>IL-8</i> R	TGCCGCTGCATCCAAAC AGAGAG		
ICP46 F	TGTCCTCTTCAGAGTGGC AATGATC	[9]	
ICP46 R	CAACTGCAGACTGGTCCT GA		
LMBV-taq F	AAAGCCTGTTGAGGAGA CGA	[29]	
LMBV-taq R	ACTGGCCACCACCTCTAC TC		
LMBV-taq p	AGACACGTTGATGCTTGC GT		
β -actin F	ACGCCCTGAGCCTCAAC GATCC		
β -actin R	CCTTCTTTCCTCGGTATG GAGT	[35]	
	CAGGTCCTTACGGATGTC CAC		

72 $^{\circ}$ C 30s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C, 5min。PCR产物与pCold-TF质粒分别经*Nde* I 和*Bam*H I 双酶切, 回收纯化后, 使用T4 DNA连接酶进行连接, 连接产物转化入DH5 α 感受态细胞, 转化产物涂布于含 50 μ g/mL氨苄青霉素的LB固体平板上, 37 $^{\circ}$ C培养过夜, 挑阳性克隆进行双酶切及测序验证。成功构建的重组表达质粒命名为pCold-TF-rMsIFN- γ , 对应的菌种命名为pCold-TF-rMsIFN- γ /DH5 α 。

1.3 重组蛋白的诱导表达

将经鉴定正确的pCold-TF-rMsIFN- γ /DH5 α 甘油菌株进行划线复苏培养, 挑取单菌落, 接种至液体培养基中扩增, 提取重组质粒。将该重组质粒与空载质粒pCold-TF分别转化至Rosetta (DE3)感受态细胞, 转化产物涂布于含 50 μ g/mL氨苄青霉素和 34 μ g/mL氯霉素的LB固体平板上, 37 $^{\circ}$ C培养过夜。次日挑取单菌落接种至含相同抗生素的LB液体培养基中, 在37 $^{\circ}$ C、180 r/min条件下继续扩增培养, 所得菌液命名为pCold-TF-rMsIFN- γ /Rosetta (DE3) 并进行保藏。保藏的重组菌株与空载对照菌株接种于含双抗的LB固体平板中在37 $^{\circ}$ C复苏培养, 次日挑取单菌落接种至3 mL含相同抗生素的LB液体培养基中, 在37 $^{\circ}$ C、180 r/min条件下培养过夜。随后按1:100比例接种至新鲜培养基中, 继续培养至OD₆₀₀达到0.4—0.5。菌液在15 $^{\circ}$ C预冷30min后, 分别加入终浓度为0.1、0.5和1.0 mmol/L的IPTG进行诱导, 在15 $^{\circ}$ C、150 r/min条件下继续培养24h。诱导结束后取200 μ L菌液, 离心收集菌体, 使用PBS重悬, 加入上样缓冲液煮沸变性后进行SDS-PAGE分析, 以筛选最佳IPTG诱导浓度。

1.4 重组蛋白的纯化与标签蛋白去除

诱导表达结束后, 菌液在4 $^{\circ}$ C、7000 r/min条件下离心15min收集菌体, 用细菌蛋白抽提试剂(康为)重悬, 超声离心后, 分别收集上清液与沉淀。沉淀部分用PBS重悬后进行SDS-PAGE分析以判断不溶性表达; 上清液采用His标签蛋白纯化试剂盒(康为)进行亲和纯化, 纯化产物经50 mmol/L Tris-HCl、0.15 mol/L NaCl缓冲液透析。透析后蛋白浓度使用Bradford法测定。透析完成后的蛋白液中按1 mg蛋白: 2 U凝血酶的比例加入凝血酶, 在4 $^{\circ}$ C条件下切割72h, 以充分断开TF标签与rMsIFN- γ 蛋白之间的连接。在酶切反应结束后, 蛋白混合液经弱阳离子交换层析分离, 去除游离的TF标签, 收集目标蛋白rMsIFN- γ 。最终产物经0.22 μ m滤膜过滤分装, 保存于-80 $^{\circ}$ C备用。

1.5 rMsIFN- γ 的体外和体内活性验证

在体外实验中, 将大口黑鲈MSSC细胞接种于

24孔板,待形成致密单层(细胞量约为 1.5×10^5 个/孔)后,分别加入500 μL 含rMsIFN- γ 蛋白(浓度为10、1、0.1 $\mu\text{g/mL}$)的完全培养基(L15+20% FBS+1% PS, L15、FBS、PS均购自Gibco,下同),不加蛋白的完全培养基为对照组,每组设3个重复孔。在28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育后,于6h、12h、24h、48h和72h收集细胞,提取总RNA并反转录为cDNA, qPCR检测干扰素刺激基因*Mx*、*ISG15*、*SOCS1*和*IRF9*及促炎因子*IL-1 β* 、*TNF- α* 和趋化因子*IL-8*表达,以 β -*actin*为内参。qPCR反应体系20 μL (引物序列见表1), 包含2 $\times$ SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 10 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.6 μL , cDNA 2 μL , RNase-Free ddH₂O补足至20 μL , 使用Roche LightCycler[®] 96进行扩增, 每样设3个技术重复。

在体内实验中,大口黑鲈适养1周后腹腔注射100 μL rMsIFN- γ (5、1、0.2 $\mu\text{g/g}$ 鱼体重), 对照组注射等体积Tris-HCl缓冲液, 实验期间水温保持在(26.0 $\pm$ 2.0) $^{\circ}\text{C}$ 。4组处理均设3个重复, 每重复20尾鱼。于注射后6h、12h、24h、48h和72h分别取脾脏和头肾组织(每组3个重复, 每个重复随机取3尾), 组织用于RNA提取及cDNA合成。qPCR检测干扰素刺激基因*Mx*、*ISG15*、*SOCS1*、*IRF9*及促炎因子*IL-1 β* 、*TNF- α* 和趋化因子*IL-8*表达, β -*actin*为内参, 扩增体系与体外实验相同。

1.6 rMsIFN- γ 的体外和体内抗LMBV效果

为评估rMsIFN- γ 在细胞和个体水平上的抗LMBV效果, 分别开展了体外细胞实验和体内注射实验。在体外实验中, 将MSSC细胞接种于24孔板, 实验分为A、B组。A组先用完全培养基将rMsIFN- γ 蛋白稀释至终浓度10和1 $\mu\text{g/mL}$, 设不添加蛋白的完全培养基为对照组, 每组设3个重复孔。待形成致密单层(细胞量约为 1.5×10^5 个/孔)后, 每孔加入500 μL 相应蛋白浓度的完全培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育12h后, 弃去培养基, 加入200 μL MOI=0.1的LMBV病毒液, 在24 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h。随后弃去病毒液, 加入500 μL 维持液(L15+2% FBS+1% PS), 继续在24 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 并于24h、48h、72h、120h和168h收集200 μL 上清液, 用于提取病毒DNA并按本实验室建立的标准曲线计算病毒拷贝数^[27]。B组则在细胞形成单层(细胞量约为 1.5×10^5 个/孔)后加入200 μL MOI=0.1的LMBV病毒液, 24 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h后弃去病毒液, 加入用维持液稀释好的rMsIFN- γ 蛋白液(终浓度10和1 $\mu\text{g/mL}$), 继续培养, 采样及检测方法与A组相同。

在体内实验中, 为评估LMBV感染后rMsIFN- γ 干预的治疗效果, 将适养1周的大口黑鲈分为rMsIFN- γ 处理组(LMBV+rMsIFN- γ)、病毒感染对

照组(LMBV+Tris-HCl)和未感染对照组(M199+Tris-HCl), rMsIFN- γ 处理组和病毒感染对照组设6个生物学重复(每组中3个生物学重复用于取样、另外3个生物学重复用于观察存活率), 未感染对照组设3个生物学重复(用于取样), 每重复20尾, 实验期间水温维持在(26.0 $\pm$ 2.0) $^{\circ}\text{C}$ 。rMsIFN- γ 处理组和病毒感染对照组鱼体先腹腔注射100 μL LMBV, 剂量为 1×10^5 TCID₅₀/尾; 未感染对照组注射100 μL M199, rMsIFN- γ 处理组注射100 μL rMsIFN- γ (1 $\mu\text{g/g}$ 体重), 两个对照组注射等体积Tris-HCl缓冲液。于给药后6h、12h、24h、48h和72h分别取脾脏和头肾组织(每组3个重复, 每个重复随机取3尾), 提取总RNA和DNA, RNA反转录为cDNA, 用于qPCR检测*Mx*、*ISG15*、*SOCS1*、*IRF9*、*IL-1 β* 、*TNF- α* 、*IL-8*及LMBV的ICP46表达, β -*actin*为内参基因; DNA用于检测组织病毒载量。qPCR反应体系、扩增程序同前述实验。rMsIFN- γ 处理组和病毒感染对照组的其余3个生物学重复用于计算平均存活率, 以评估rMsIFN- γ 在LMBV感染后的治疗效果。

1.7 数据处理与分析

使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各基因相对表达量, 并以log₂ fold change (log₂ FC)形式表示。实验数据采用GraphPad Prism 10.2进行统计分析, 具体统计分析方法见各图注。文中图表采用GraphPad Prism 10.2绘制。

2 结果

2.1 重组大口黑鲈IFN- γ (rMsIFN- γ)表达载体的构建

以大口黑鲈脾脏提取的RNA反转录获得的cDNA为模板进行PCR扩增, 获得略大于500 bp的目的片段, 条带大小与理论预期(567 bp)一致(图1A)。重组质粒pCold-TF-IFN- γ 经测序验证, 其启动子至终止子的序列正确, 插入片段未发生突变。进一步使用限制性内切酶双酶切重组质粒和空载质粒并进行琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, 重组质粒经切割获得目的条带(大约500 bp), 而空载质粒不存在该条带(图1B), 表明重组表达载体构建成功。

2.2 rMsIFN- γ 的表达与纯化

SDS-PAGE检测结果显示, 诱导所得蛋白条带大小与预期大小(空载表达产物55 kD, TF-rMsIFN- γ 76 kD)一致, 不同IPTG浓度对目标蛋白的表达占比无明显影响(图2A)。纯化结果显示, TF-rMsIFN- γ 主要以可溶性形式存在于上清液中, 纯化后蛋白纯度超过90% (图2B)。纯化蛋白在透析后, 加入凝血酶切割72h实现TF标签与rMsIFN- γ 的有效分离

(图 2C), 随后经弱阳离子交换层析去除TF标签, 最终获得高纯度rMsIFN- γ 蛋白(图 2D)。Bradford法测得终浓度为 0.35 mg/mL。

2.3 rMsIFN- γ 的体外与体内活性验证

在体外实验中, 选用不同浓度的rMsIFN- γ (10、1和0.1 μ g/mL)处理大口黑鲈MSSC细胞, qPCR结果显示, 与对照组相比, 抗病毒基因*Mx*、*ISG15*, 细胞因子信号抑制因子*SOCS1*及干扰素调节因子*IRF9*表达均被显著诱导($P<0.01$), 且多数基因在处理12h表达水平达到峰值。10 μ g/mL组诱导效果最为明显, 不仅各靶基因表达水平最高, 且高表达状态维持时间较长(图 3), 但促炎因子*IL-1 β* 、*TNF- α* 和趋化因子*IL-8*的表达无显著差异, 相关数据未展示。

在体内实验中, 与对照组(Tris-HCl缓冲液)相比, 在3种蛋白浓度条件处理下, 均可诱导*Mx*、*ISG15*、*SOCS1*、*IRF9*及炎症因子*IL-1 β* 、*TNF- α* 及趋化因子*IL-8*的表达上调。在脾脏组织中, 干扰素刺激基因大多在注射24h内先显著上调($P<0.01$)后迅速下调, 随后逐渐恢复至基线水平; 炎症因子和趋化因子则在6—12h显著上调($P<0.01$), 24h开始下降, 提示其参与rMsIFN- γ 介导的早期炎症应答。头肾组织中基因表达变化趋势与脾脏基本一致, 均在6—12h内显著升高($P<0.01$), 24h后迅速下降。并且结果显示, 在脾脏和头肾中, 低剂量组(0.2 μ g/g鱼体

重)相比其他两组(5、1 μ g/g 鱼体重)诱导水平下降更快, 且更早进入表达回落状态并趋于平稳(图 4)。

2.4 rMsIFN- γ 的体外及体内抗LMBV效果

在细胞水平, 通过A组实验(病毒感染前处理)发现, rMsIFN- γ 预处理可显著抑制LMBV在MSSC细胞中的复制($P<0.05$), 不同时间点中两种蛋白浓度处理的病毒载量均低于对照组, 且10 μ g/mL组抑制效果更为明显(图 5A)。在B组实验(病毒感染后处理)中, 24h时10 μ g/mL处理组的抗病毒效果较好, 病毒拷贝数在检测时间点显著低于对照组($P<0.05$), 1 μ g/mL处理组的病毒拷贝数仅在实验前期显著低于对照组($P<0.05$); 尽管后续时间点3组上清的病毒拷贝数仍存在一定差异, 但病毒拷贝数之间的差距逐渐缩小(图 5B)。

在体内试验中, 通过腹腔注射rMsIFN- γ 后检测感染大口黑鲈脾脏与头肾中的相关因子表达情况。结果显示, 在脾脏组织中, rMsIFN- γ 处理组*Mx*和*ISG15*基因于6h表达水平显著低于病毒感染对照组($P<0.01$), *SOCS1*则显著上调($P<0.05$); 炎症因子*IL-1 β* 、*TNF- α* 与趋化因子*IL-8*在6h表达均显著高于病毒感染对照组($P<0.01$), 后续时间点差异逐渐减弱。头肾中基因表达趋势与脾脏基本一致, *Mx*和*ISG15*表达在6h显著低于病毒感染对照组, *SOCS1*上调, *IL-1 β* 与*IL-8*显著升高($P<0.01$), 其中脾脏组织的*IRF9*和头肾组织的*IRF9*与*TNF- α* 表达无显著差异, 相关数据未展示(图 6)。

LMBV的即刻早期基因ICP46的表达水平检测结果显示, rMsIFN- γ 可有效抑制其在组织内的表达, 且抑制作用在脾脏中出现较早, 自感染早期起rMsIFN- γ 处理组表达水平持续低于病毒感染对照组($P<0.01$); 而在头肾中, 两组差异自24h起开始显现, 并于72h时趋于一致(图 7A)。病毒载量检测亦验证了该趋势, rMsIFN- γ 处理组在脾脏中12h、24h与48h时的病毒拷贝数显著低于病毒感染对照组($P<0.05$), 在头肾中则仅24h差异显著($P<0.05$), 其余时间点病毒载量虽有降低趋势, 但差异不显著, 且组间差距随时间推移逐渐缩小(图 7B)。

在病毒感染后的存活率实验中, rMsIFN- γ 处理显著延缓了大口黑鲈的死亡进程。rMsIFN- γ 处理组(LMBV + rMsIFN- γ)自第4天起存活率高于病毒感染对照组(LMBV + Tris-HCl), 第7天rMsIFN- γ 处理组平均存活率(70%)显著高于病毒感染对照组(33.3%; $P<0.01$); 第14天, rMsIFN- γ 处理组平均存活率(53.3%)仍显著高于病毒感染对照组(26.7%; $P<0.05$; 图 8)。该结果表明, rMsIFN- γ 可延缓LMBV感染所致死亡并提高鱼体存活率。

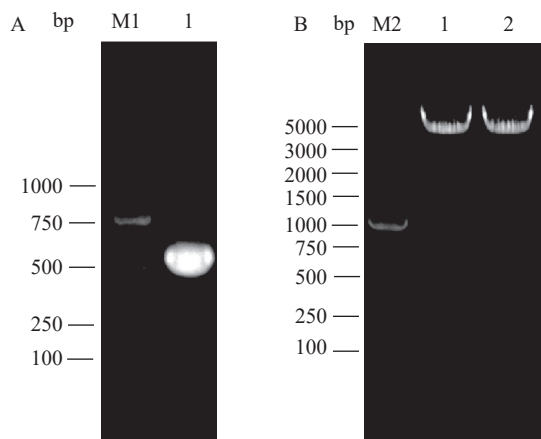


图 1 大口黑鲈IFN- γ 的PCR扩增(A)及重组表达质粒的双酶切验证(B)

Fig. 1 PCR amplification of IFN- γ from largemouth bass (A) and verification of the recombinant expression plasmid by double-enzyme digestion (B)

A. M1. DNA 分子质量标准; 1. 大口黑鲈 IFN- γ 的PCR扩增结果; B. M2. DNA 分子质量标准; 1. 重组质粒pCold-TF-IFN- γ 的双酶切结果; 2. 空载质粒pCold-TF的双酶切结果

A. M1. DNA molecular weight marker; 1. PCR amplification product of largemouth bass IFN- γ ; B. M2. DNA molecular weight marker; 1. double-enzyme digestion of recombinant plasmid pCold-TF-IFN- γ ; 2. double-enzyme digestion of empty vector pCold-TF

3 讨论

3.1 原核表达系统优化提升rMsIFN- γ 的可溶性与活性

在表达策略方面, 本研究采用低温诱导表达载体pCold-TF联合表达优化的宿主菌Rosetta (DE3), 实现了大口黑鲈干扰素 γ (rMsIFN- γ)的原核表达。在研究早期曾尝试利用pET-30a(+)搭配BL21 (DE3)或Rosetta (DE3)进行表达, 存在重组蛋白无法表达

或表达的蛋白经纯化复性后比活性较低的问题, 这可能是由于MsIFN- γ 含有较多稀有密码子且折叠过程复杂所致。pCold-TF搭配Rosetta (DE3)在一定程度上缓解了因目标基因中稀有密码子频繁使用而限制蛋白表达的问题, 显著提高了目的蛋白的表达量与可溶性, 并降低了因蛋白质变性复性过程而导致生物活性丧失的风险^[36, 37]。然而, pCold-TF载体自带较大标签蛋白, 仍可能对重组蛋白的天然构象和功能产生不利影响, 存在一定程度的失活风险^[38]。

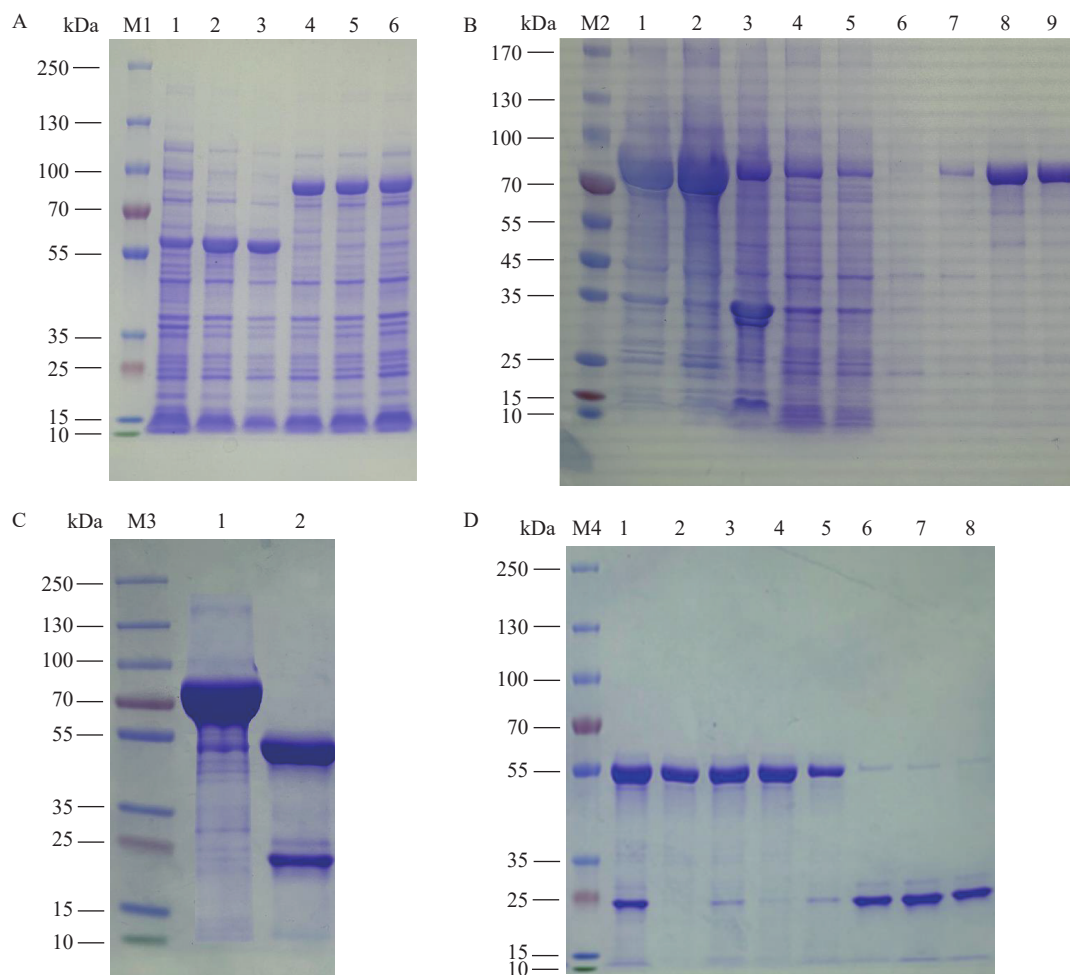


图2 不同IPTG浓度诱导条件下空载蛋白和TF-rMsIFN- γ 的表达结果(A)、TF-rMsIFN- γ 的纯化结果(B)、TF-rMsIFN- γ 的酶切及分离(C、D)

Fig. 2 Expression of empty vector protein and TF-rMsIFN- γ induced by different IPTG concentration (A), purification of TF-rMsIFN- γ (B), and thrombin digestion and separation of TF-rMsIFN- γ (C, D)

A. M1. 蛋白分子质量标准; 1—3. 不同终浓度IPTG诱导空载表达蛋白表达; 4—6. 不同终浓度IPTG诱导TF-rMsIFN- γ 表达; B. M2. 蛋白分子质量标准; 1. 破碎离心后上清; 2. 0.45 μ m 过滤后上清; 3. 离心后沉淀; 4. 流穿液; 5—7. 不同咪唑浓度缓冲液洗涤; 8—9. 500 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱; C. M3. 蛋白分子质量标准; 1. 凝血酶切割前 TF-rMsIFN- γ ; 2. 凝血酶切割后 TF 标签蛋白和 rMsIFN- γ ; D. M4. 蛋白分子质量标准; 1. 上样液; 2. 流穿液; 3—5. 不同浓度 NaCl 缓冲液洗涤; 6—8. 0.5 mol/L NaCl 缓冲液洗脱

A. M1. Protein molecular weight marker; 1—3. expression of empty vector protein induced by different IPTG concentrations; 4—6. expression of TF-rMsIFN- γ induced by different IPTG concentrations; B. M2. Protein molecular weight marker; 1. supernatant after cell disruption and centrifugation; 2. supernatant after 0.45 μ m filtration; 3. pellet after centrifugation; 4. flow-through; 5—7. washes with buffers containing different concentrations of imidazole; 8—9. elution with 500 mmol/L imidazole buffer; C. M3. Protein molecular weight marker; 1. TF-rMsIFN- γ before thrombin digestion; 2. TF tag and rMsIFN- γ after digestion; D. M4. Protein molecular weight marker; 1. sample loaded; 2. flow-through; 3—5. washes with buffers containing different concentrations of NaCl; 6—8. elution with 0.5 mol/L NaCl buffer

为此,在采用 Ni^{2+} 亲和层析进行初步纯化的基础上,进一步通过凝血酶切除标签,并结合弱阳离子交换层析精细纯化去除标签蛋白,最终获得了高纯度且具有生物活性的rMsIFN- γ 蛋白。

3.2 rMsIFN- γ 诱导干扰素刺激基因的表达动态

在MSSC细胞中,rMsIFN- γ 可显著诱导*Mx*、*ISG15*、*SOCS1*和*IRF9*等干扰素刺激基因的表达,且诱导效应具有明显的时间依赖性和浓度依赖性,符合宿主对于II型干扰素的典型应答特征^[39,40]。在MSSC细胞中,上述基因的表达水平在刺激后迅速升高,并于12h达到峰值,随后进入缓慢下降阶段,在一定时间范围内相较对照组仍保持较高水平。这可能与体外刺激条件下rMsIFN- γ 在培养体系中浓度相对稳定、缺乏体内清除过程,且系统性负调控因素较少有关,从而使转录应答衰减相对缓慢。

在鱼体水平,*Mx*、*ISG15*等基因表达具有明显的瞬时性(6—12h达峰,24h回落),这可能与体内外

源刺激在分布与降解后有效浓度下降有关,同时本研究检测到*SOCS1*在刺激后显著上调,提示干扰素信号的负反馈调节被激活,其可能参与限制干扰素通路持续激活并促进ISGs表达在后期逐步回落^[41]。这种负反馈调节机制在鱼类中普遍存在,旨在防止过度的干扰素应答导致自身免疫损伤,也见于草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、七星鲈等鱼类的相关研究^[22,42],推测IFN- γ 应答动力学与体内复杂的免疫调控网络有关,并提示单一剂量的IFN- γ 可能仅提供短期的保护窗口,未来需考虑缓释制剂或连续给药策略。

此外,本研究观察到鱼体免疫器官中促炎因子*IL-1 β* 、*TNF- α* 及趋化因子*IL-8*上调,而MSSC细胞中上述基因诱导并不显著,提示该单一细胞系对IFN- γ 的应答更偏向ISGs途径。体内炎症/趋化反应的增强可能与头肾、脾脏等免疫器官中多类免疫细胞的参与有关,这些细胞可产生炎症细胞因子与趋化因子,并通过细胞因子级联的旁分泌方式进一步放大局部

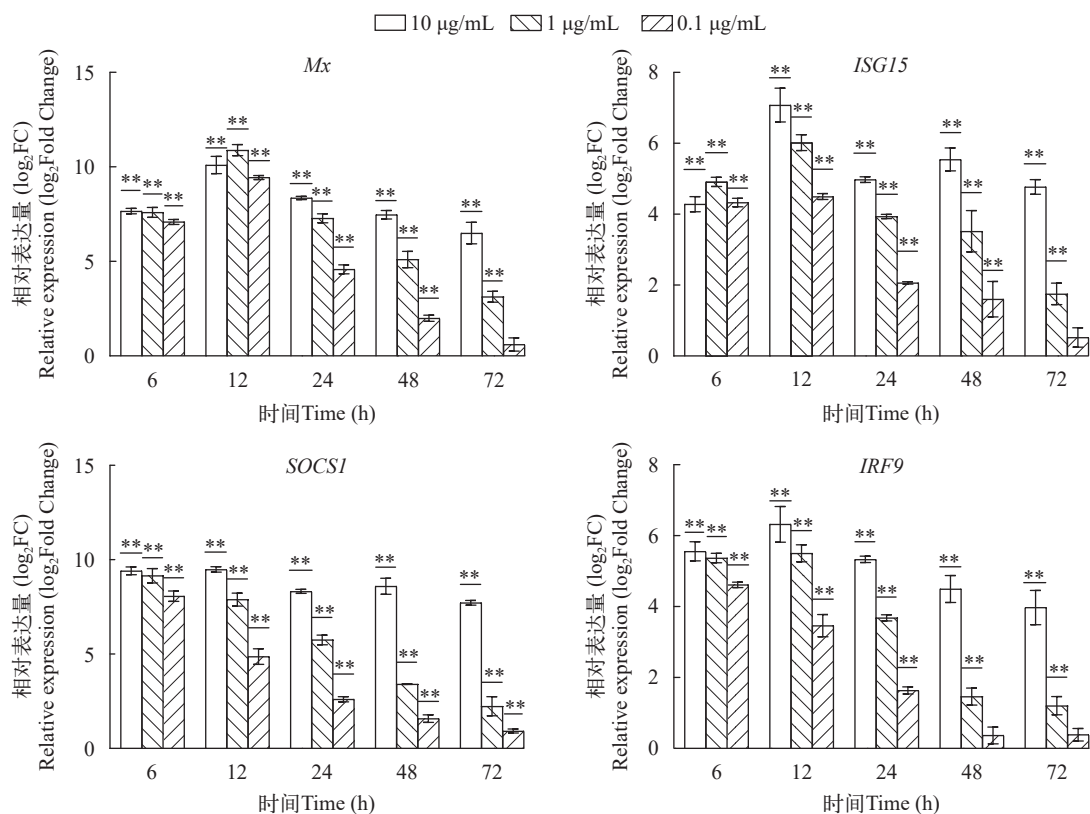


图3 rMsIFN- γ 刺激下大口黑鲈脊髓细胞系中干扰素相关基因的表达

Fig. 3 Expression of interferon-related genes in largemouth bass spinal cord cells stimulated with rMsIFN- γ

图中纵坐标所示为各浓度蛋白组相对于对照组在 β -actin校正后的log₂ FC值,用于反映基因的相对表达倍数变化;对照组作为基准组,其log₂ FC定义为0,未在图中显示;Two-Way ANOVA,图中显著性标注表示在同一时间点内,各蛋白浓度处理组与对照组之间的比较结果;*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$;下同

The y-axis shows the log₂ fold change (log₂ FC) of each protein concentration group relative to the control group after β -actin normalization, reflecting relative changes in gene expression; The control group is used as the reference and its log₂ FC is defined as 0; therefore, it is not shown in the figure; Two-way ANOVA is performed, and significance annotations indicate only comparisons in each protein concentration treatment group and the control group at the same time point. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; The same applies below

免疫应答, 从而呈现更强的炎症相关转录特征^[43, 44]。

3.3 炎症应答与典型抗病毒通路协同介导rMsIFN- γ 的抗病毒保护作用

本研究发现, 在鱼体内, rMsIFN- γ 不仅诱导典型

抗病毒基因(*Mx*, *ISG15*)的表达, 对促炎因子(*IL-1 β* , *TNF- α*)及趋化因子*IL-8*也具有显著的诱导作用。从典型 II 型干扰素信号转导来看, IFN- γ 与受体结合后可激活JAK-STAT通路并诱导ISGs建立抗病毒状

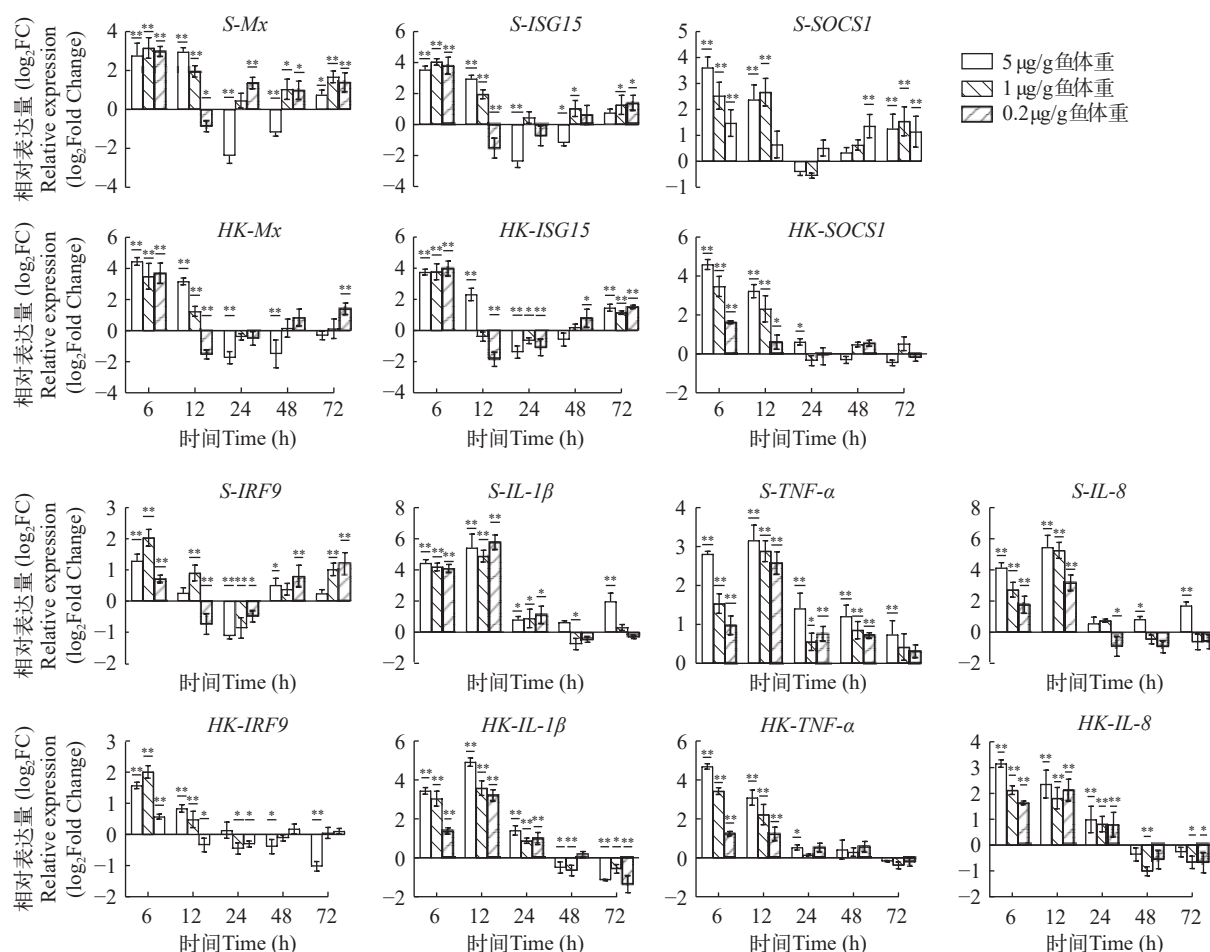


图4 rMsIFN- γ 刺激下大口黑鲈脾脏、头肾组织中干扰素相关基因及炎症相关基因的表达

Fig. 4 Expression of interferon-related genes and inflammation-related genes in the spleen and head kidney of largemouth bass stimulated with rMsIFN- γ

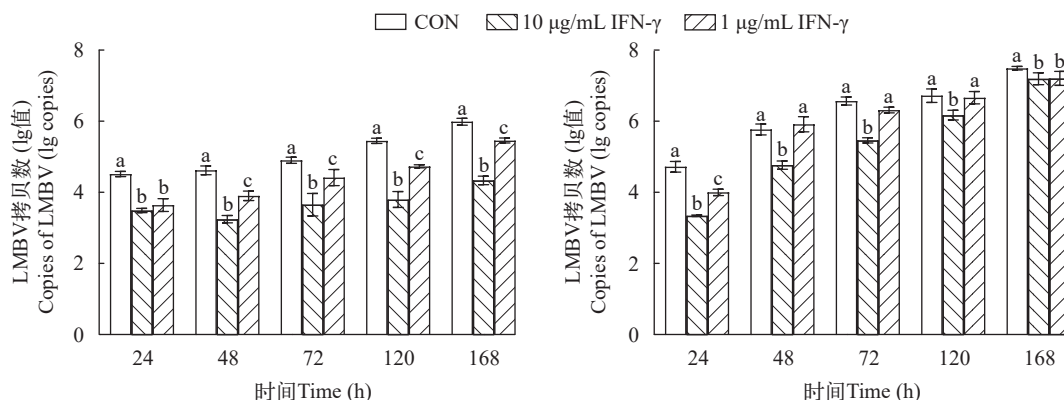


图5 rMsIFN- γ 在感染前(A)后(B)处理对LMBV复制的抑制效果分析

Fig. 5 Analysis of the inhibitory effect of rMsIFN- γ treatment before (A) and after (B) LMBV infection on viral replication

在同一时间点内, 不同字母表示各处理组之间差异显著; Two-way ANOVA, $P < 0.05$

Within the same time point, different letters indicate significant differences among treatment groups; Two-way ANOVA, $P < 0.05$

态^[45]; 另外, *IRF9*通常被视为 I 型干扰素ISGF3复合体(STAT1-STAT2-*IRF9*)的关键组分, 参与 ISRE 靶基因的转录调控, 其上调提示IFN- γ 可能存在与

I 型干扰素转录网络的交叉调控, 进而影响更广谱 ISGs的表达, 从而促进*Mx*、*ISG15*等基因表达^[46, 47]。进一步结合LMBV感染后的免疫应答结果

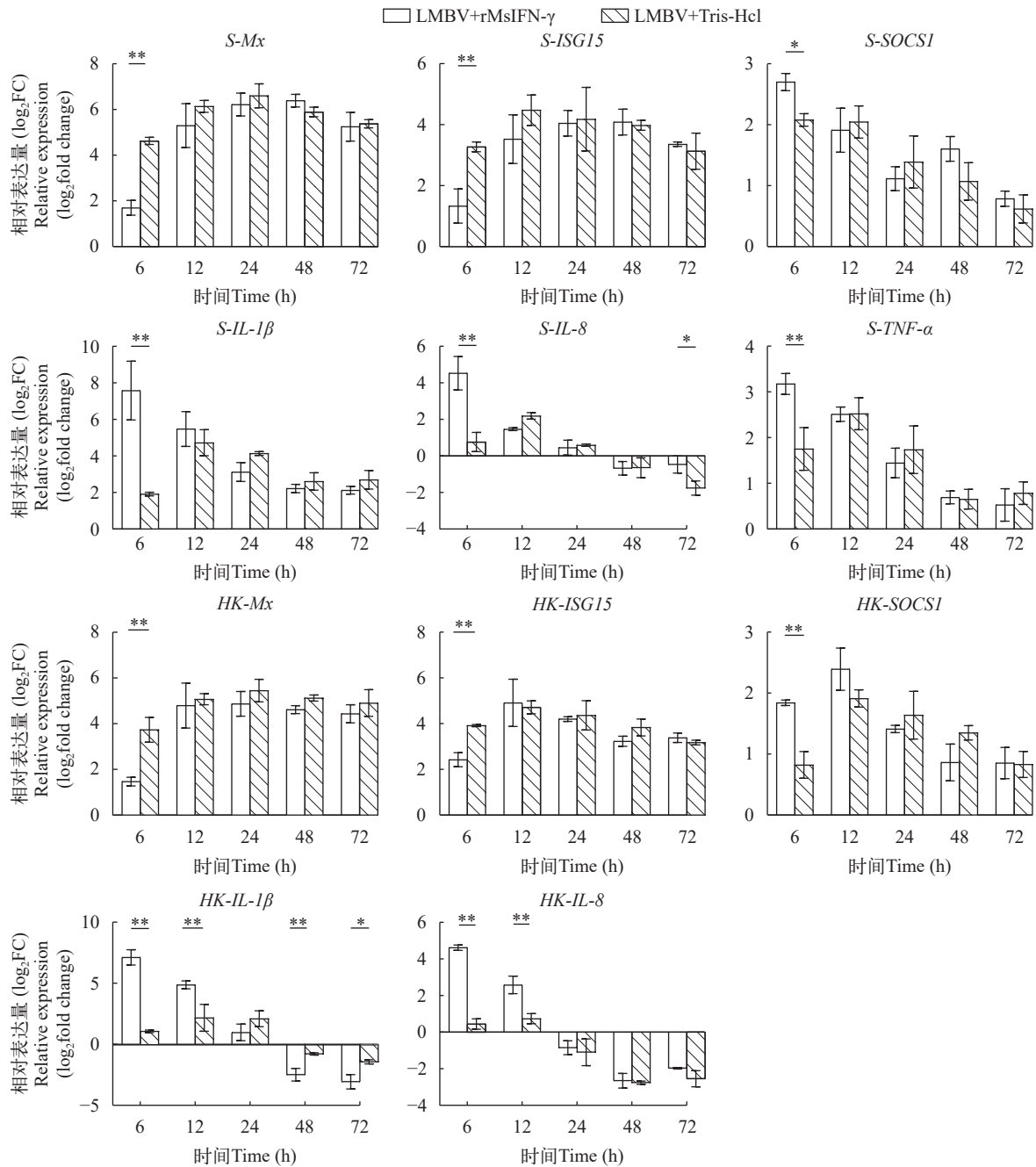


图6 rMsIFN- γ 刺激下染病大口黑鲈脾脏、头肾组织中干扰素刺激基因及炎症相关基因的表达

Fig. 6 Expression of interferon-stimulated genes and inflammation-related genes in the spleen and head kidney of diseased largemouth bass stimulated with rMsIFN- γ

图中纵坐标所示为rMsIFN- γ 处理组(LMBV+rMsIFN- γ)和病毒感染对照组(LMBV+Tris-Hcl)相对于未感染对照组在 β -actin校正后的log₂ FC值, 用于反映目的基因的相对表达倍数变化(未感染对照组作为基准组, 其log₂ FC定义为0, 图中未显示); Two-Way ANOVA, 图中显著性标注表示在同一时间点内, rMsIFN- γ 处理组和病毒感染对照组之间的比较结果

The y-axis shows the β -actin-normalized log₂ fold change (log₂ FC) of the rMsIFN- γ -treated group (LMBV+rMsIFN- γ) and the virus-infected control group (LMBV+Tris-Hcl) relative to the uninfected control group, reflecting relative changes in the expression of the target genes (the uninfected control group is used as the reference and its log₂FC is defined as 0; therefore, it is not shown in the figure); Two-way ANOVA is performed, and significance annotations indicate comparisons between the rMsIFN- γ -treated group and the virus-infected control group at the same time point

发现,在LMBV感染早期,rMsIFN- γ 处理组*Mx*和*ISG15*的表达相对较低,这可能与病毒感染状态下本已被激活的干扰素信号负反馈调节通路(如*SOCS1*分子介导)进一步增强有关,从而在早期抑制部分ISGs(如*Mx*、*ISG15*)的表达,而*IL-1 β* 与*IL-8*的表达则显著高于病毒感染对照组。这些结果提示,rMsIFN- γ 的抗病毒机制可能并非单一依赖于JAK-STAT通路介导的抗病毒效应分子,其激发的炎症/趋化反应同样在早期抗病毒过程中发挥重要作用。在MSSC细胞中rMsIFN- γ 虽未显著上调*IL-1 β* 、*TNF- α* 和*IL-8*,但仍表现出一定抗病毒效应,提示其在细胞水平可主要通过典型干扰素信号诱导ISGs发挥直接抗病毒作用;而鱼体内炎症因子与趋化因子的上调更可能反映多细胞免疫调控网络参与,从而与ISGs形成协同保护。

与I型干扰素不同,II型干扰素(IFN- γ)在硬骨鱼中被普遍认为是“免疫调节型”细胞因子,在鲤

(*Cyprinus carpio* L.)、金鱼(*Carassius auratus* L.)、日本河豚(*Takifugu rubripes*)等鱼中,IFN- γ 已被证实是炎症因子(*IL-1 β* 、*TNF- α* 等)的强效诱导剂^[48–50]。除了可通过JAK-STAT通路诱导ISGs外,IFN- γ 还可刺激促炎因子和趋化因子表达并增强免疫细胞的效应功能,从而在病原入侵早期快速提高先天免疫。*IL-1 β* 和*TNF- α* 可通过NF- κ B/MAPK等炎症信号驱动广谱抗感染转录程序,并与干扰素信号存在交叉放大,有助于机体进入抗感染状态^[51–54];*IL-8*是一种强效的趋化因子,能够介导粒细胞向炎症部位的迁移、聚集并促进其功能发挥,从而减少病毒扩散机会并加速清除,同时进一步募集其他免疫细胞,增强局部免疫效应^[55]。本研究中观察到的3种炎症因子早期显著上调与IFN- γ 在鱼类中具有促进炎症与免疫调节功能的认识一致,为其在感染早期快速提供保护提供了合理解释。

然而炎症反应具有双刃剑效应,鱼类急性炎症

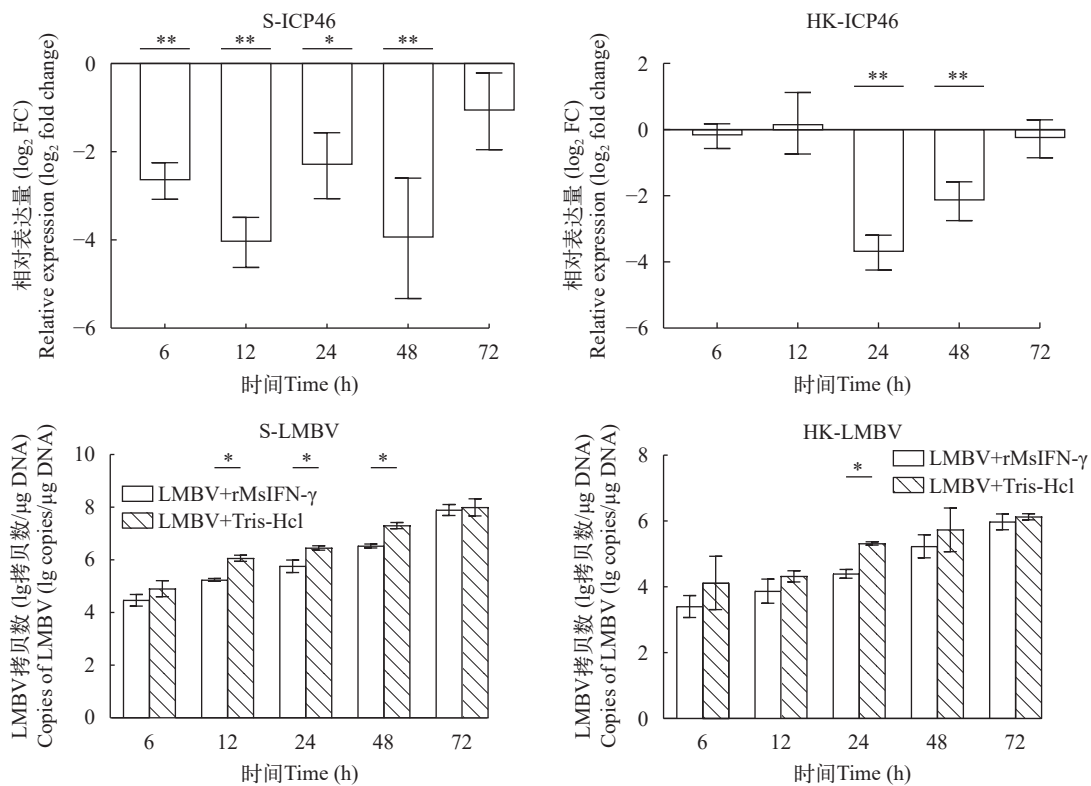


图7 rMsIFN- γ 刺激下染病大口黑鲈脾脏、头肾组织中ICP46的表达和LMBV病毒载量

Fig. 7 Expression of ICP46 and copies of LMBV in the spleen and head kidney tissues of LMBV-infected largemouth bass stimulated with rMsIFN- γ

ICP46图中纵坐标表示rMsIFN- γ 处理组相对于病毒感染对照组在 β -actin校正后的log₂ FC值,用于反映rMsIFN- γ 干预对LMBV即刻早期基因ICP46转录的抑制效果,当log₂ FC<0时,表示ICP46的表达量低于病毒感染对照组;LMBV图中纵坐标为脾脏和头肾组织中的LMBV病毒拷贝数

For the ICP46 panel, y-axis represents β -actin-normalized log₂ fold change (log₂ FC) of the rMsIFN- γ -treated group relative to the virus-infected control group, indicating the inhibitory effect of rMsIFN- γ on transcription of the LMBV immediate-early gene ICP46; When log₂ FC<0, ICP46 expression is lower than that in the virus-infected control group; For the LMBV panel, y-axis indicates the LMBV viral copy number in spleen and head kidney tissues

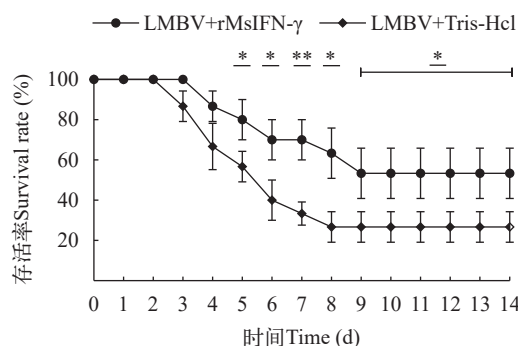


图8 经rMsIFN- γ 治疗的大口黑鲈抗LMBV感染的存活率

Fig. 8 Survival rate of rMsIFN- γ -treated largemouth bass following LMBV infection

存活率曲线由3个平行组的均值 $\pm$ 标准差(SD)表示。显著性差异采用独立样本 t 检验进行分析($n=3$)

Survival curves are presented as mean $\pm$ SD from three biological replicates. Statistical significance is assessed using an unpaired t -test ($n=3$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$

有助于限制病原扩增与启动修复,但若诱导失控或炎症持续时间过久,会导致组织损伤与修复延迟等免疫病理后果^[56]。在本研究中,炎症与ISGs表达均呈现明显时间窗,且SOCS1作为JAK-STAT信号负调控因子快速诱导,提示IFN- γ 相关应答存在负反馈调节,有助于限制反应持续放大并降低潜在免疫损伤风险。因此,rMsIFN- γ 作为免疫增强策略的应用需在保护效应与炎症安全性之间取得平衡,通过给药方式的优化进一步提升安全性与稳定性。

3.4 rMsIFN- γ 对LMBV干预呈感染阶段依赖性

在rMsIFN- γ 的体外抗LMBV实验中观察到,其对病毒载量的抑制效果随时间推移而逐渐减弱,尤其在处理后期,各处理组之间的病毒拷贝数差异明显缩小。既往研究已表明干扰素效应具有时间依赖性,这一现象可能与多因素有关,包括感染进程不同阶段对干扰素干预的敏感性差异^[57]、干扰素刺激后宿主抗病毒状态随时间回落^[58-60],以及病毒在感染进程中通过免疫逃逸降低干扰素效能^[61,62]。

已有研究表明,细胞因子在鱼类中的预防性使用可在多个时间点有效抵御病毒感染,但若在病毒侵染后再施用,其作用窗口通常较为有限。在传染性脾肾坏死病毒(Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)感染斑马鱼前24h、前6h、感染时(0h)和感染后6h腹腔注射IFN1,均可显著提高感染鱼的存活率,感染后24h以相同剂量给药则未显示保护效果^[57]。干扰素相关效应在感染早期通过影响病毒进入或早期时间形成抑制的现象已有报道。例如在褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)中,IFN诱导的跨膜蛋白IFITM1的过表达可通过阻碍病毒入侵,限

制其复制;在石斑鱼(*Epinephelus* spp.)中,干扰素诱导的胆固醇25-羟化酶(Cholesterol 25-hydroxylase, CH25H)则可显著抑制石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)和赤点石斑鱼神经坏死病毒(Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)进入细胞^[63,64]。此外,IFN- γ 对多种病毒的早期基因表达也具有抑制作用。在腺病毒研究中,IFN- γ 可有效下调其早期基因E1A的表达,从而阻止病毒复制^[65];在小鼠模型中,IFN- γ 可在数小时内通过抑制巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)即刻早期蛋白IE1的表达,快速形成免疫屏障^[66]。

另一方面,干扰素诱导的抗病毒状态通常难以长期维持,相关信号与效应基因表达在达到峰值后可在负反馈调控作用下逐步回落,从而使干预效应呈现时间窗特征;随着感染进程推进,病毒往往会通过拮抗先天免疫识别或干扰干扰素的信号转导等方式降低宿主持续的抗病毒压力,例如,在哺乳动物中,许多病毒可通过干扰IRF与STAT的翻译后修饰、阻碍转录复合体组装及核内转位,并促进IRFs/STATs的蛋白水解或泛素化降解,从而削弱甚至阻断抗病毒防御反应的建立^[67];与LMBV同属蛙虹彩病毒属的SGIV感染模型中,多项研究已经揭示病毒蛋白能够针对宿主cGAS-STING-TBK1-IRF3通路的多个关键节点进行抑制,从而削弱IFN的产生与效应,这为理解LMBV在感染后期干扰素效能下降提供了潜在的类比^[68,69]。

3.5 rMsIFN- γ 保护效应具短时性,递送策略优化或可延长保护作用

本研究结果表明,rMsIFN- γ 在大口黑鲈体内注射后可在短时间内诱导抗病毒基因与炎症因子的表达上调,有效抑制LMBV的扩增,并延缓鱼体死亡进程。然而,该保护作用呈现明显的时效性衰减特征:自注射后72h起,相关基因的表达水平及病毒载量逐渐趋近于对照组,提示rMsIFN- γ 在体内的生物稳定性有限,并易受到机体多重调控机制的影响,难以维持持久的免疫激活状态。为延长其免疫活性窗口期并提升抗病毒效果,近年来已有多项研究探索不同的递送方式可供借鉴,如口服包埋、注射缓释等策略。目前,在多种鱼类中,已通过海藻酸钠、壳聚糖等材料包裹抗原实现口服免疫,具有良好的稳定性,可避免在胃内降解,在肠道中缓释并激活黏膜免疫应答^[70]。此外,注射缓释系统如PLGA微球已被广泛用于蛋白质类免疫分子的持续释放,有助于延长作用时间并显著增强疗效^[71]。基因工程微生物表达系统(如重组乳酸菌)也为外源性蛋白的递送提供了新思路。在草鱼中,通过口服能

表达草鱼呼肠孤病毒(Grass carp hemorrhage virus, GCRV)衣壳蛋白VP5的重组乳酸菌能在较长时间内保护草鱼免受GCRV感染;而在大口黑鲈中,口服能表达IFN- α 3的重组乳酸菌能诱导大口黑鲈的免疫反应,从而有效预防和对抗LMBV感染^[27, 72]。

4 结论

本研究成功建立了大口黑鲈 II 型干扰素IFN- γ 的原核表达系统,纯化的重组蛋白rMsIFN- γ 具有诱导干扰素相关基因在大口黑鲈细胞和体内表达的能力;通过腹腔注射rMsIFN- γ 可延缓LMBV感染鱼的死亡进程,提高存活率。本研究为LMBV的防治新途径提供基础数据与参考。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Chen Z, Gong Y, Miao R, *et al.* Effects of dietary binder sources on growth, digestive enzymes activity, and gut barrier function and microbial composition of larval largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Aquaculture*, 2024(586): 740774.
- [2] Xiong C, Chi Y, Wang B, *et al.* Diet with optimal glutathione supplement improves growth, nonspecific immunity, intestinal microbiota, and antioxidant ability in *Micropterus salmoides* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2024, **104**(5): 1566-1578.
- [3] Yang S, Zhao J, An N, *et al.* Updates on infectious diseases of largemouth bass: A major review [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(154): 109976.
- [4] Yi W, Zhang X, Zeng K, *et al.* Construction of a DNA vaccine and its protective effect on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) challenged with largemouth bass virus (LMBV) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(106): 103-109.
- [5] Chu X, Chen J, Lin L, *et al.* Temporal dynamics of immune response signalling in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) infected with largemouth bass virus [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2025, **48**(5): e14086.
- [6] Zhang Y, Gui B, Jia Z, *et al.* Artificial infection pathway of largemouth bass LMBV and identification of resistant and susceptible individuals [J]. *Aquaculture*, 2024(582): 740527.
- [7] Yao J Y, Zhang C S, Yuan X M, *et al.* Oral vaccination with recombinant *Pichia pastoris* expressing iridovirus major capsid protein elicits protective immunity in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022(13): 852300.
- [8] Zhang M, Chen X, Xue M, *et al.* Oral vaccination of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) against largemouth bass ranavirus (LMBV) using yeast surface display technology [J]. *Animals*, 2023, **13**(7): 1183.
- [9] Cheng Y, Liu M, Yu Q, *et al.* Effect of EGCG extracted from green tea against largemouth bass virus infection [J]. *Viruses*, 2023, **15**(1): 151.
- [10] Yang Y F, Yamkasem J, Surachetpong W, *et al.* Modeling the effect of probiotics on tilapia lake virus (TiLV)-infected farmed tilapia [EB/OL]. *Authorea Preprints*, 2024.
- [11] Paludan S R, Pradeu T, Pichlmair A, *et al.* Early host defense against virus infections [J]. *Cell Reports*, 2024, **43**(12): 115070.
- [12] Sengupta P, Chattopadhyay S. Interferons in viral infections [J]. *Viruses*, 2024, **16**(3): 451.
- [13] Yang E, Li M M H. All about the RNA: interferon-stimulated genes that interfere with viral RNA processes [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020(11): 605024.
- [14] Han J, Wu M, Liu Z. Dysregulation in IFN- γ signaling and response: the barricade to tumor immunotherapy [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023(14): 1190333.
- [15] Kak G, Raza M, Tiwari B K. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases [J]. *Biomolecular Concepts*, 2018, **9**(1): 64-79.
- [16] Aboulafia D, Mitsuyasu R T. Potential Role of Interferon-gamma in Human Immunodeficiency Virus-associated Disease [M]. *Anti-Infective Applications of Interferon-Gamma*. Boca Raton: CRC Press, 2020: 37-52.
- [17] Fathima T, Brundha M P, Ezhilarasan D. Role of interferon gamma in COVID-19 prevention-a review [J]. *International Journal of Current Research and Review*, 2020: 91-96.
- [18] Wang L Y, Hao R Z, Yang Y, *et al.* Recombinant porcine interferon-gamma expressed in CHO cells and its antiviral activity [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, **39**(12): 4784-4795. [王凌云, 郝荣增, 杨洋, 等. CHO 细胞表达重组猪干扰素- γ 及其抗病毒活性 [J]. *生物工程学报*, 2023, **39**(12): 4784-4795.]
- [19] Fan W, Jiao P, Zhang H, *et al.* Inhibition of African swine fever virus replication by porcine type I and type II interferons [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020(11): 1203.
- [20] Zhang Z D, Hutching G, Kitching P, *et al.* The effects of gamma interferon on replication of foot-and-mouth disease virus in persistently infected bovine cells [J]. *Archives of Virology*, 2002, **147**(11): 2157-2167.
- [21] Zhang R X. Generation of the bovine IFN- λ 3 and research on its antiviral activity compared with the recombinant boIFN- α , boIFN- β and boIFN- γ [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013. [张润祥. 重组牛IFN- λ 3的制备及其与IFN- α /IFN- β /IFN- γ 抗病毒活性比较研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.]
- [22] Yan L, Guo J, Zhao C, *et al.* Type II interferons (IFN- γ and IFN- γ rel) activate downstream genes through various potential receptor combinations to exert antiviral func-

- tions in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(145): 109292.
- [23] Ding G, Zheng C, Wang B, *et al.* Transcriptome sequencing reveals the antiviral innate immunity by IFN- γ in Chinese sturgeon macrophages [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022(13): 854689.
- [24] Xu D, Li Q, Zhou Y, *et al.* Functional analysis and regulation mechanism of interferon gamma in macrophages of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022(194): 153-162.
- [25] Xiang Y, Liu W, Jia P, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of interferon-gamma in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(70): 140-148.
- [26] Shibasaki Y, Yabu T, Araki K, *et al.* Peculiar monomeric interferon gammas, IFN γ rel 1 and IFN γ rel 2, in ginbuna crucian carp [J]. *The FEBS Journal*, 2014, **281**(4): 1046-1056.
- [27] Hua X, Li C, Xiao Y, *et al.* Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing largemouth bass (*Micropterus salmoides*) IFN α_3 protein enhances immune response against largemouth bass virus (LMBV) infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(154): 109875.
- [28] Yu R, Zhang W, Yu P, *et al.* IFN- γ enhances protective efficacy against *Nocardia seriolae* infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Frontiers in Immunology*, 2024(15): 1361231.
- [29] Gong J P, Pan X Y, Lin L Y, *et al.* Establishment and application of TaqMan qPCR method for largemouth bass ranavirus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, **44**(5): 508-513. [巩金鹏, 潘晓艺, 蔺凌云, 等. 大口黑鲈虹彩病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2022, **44**(5): 508-513.]
- [30] Chu X, Lin L, Gong J, *et al.* Establishment of a spinal cord-derived cell line from *Micropterus salmoides* reveals differential host-pathogen interactions and innate immune evasion strategies [J]. *Aquaculture*, 2026(615): 743611.
- [31] Chu X, Chen J, Gao M Y, *et al.* The immunoregulatory mechanisms of an attenuated LMBV in *Micropterus salmoides* based on transcriptome analysis [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, **49**(6): 64-77. [楚馨, 陈静, 高铭悦, 等. 基于转录组分析的蛙虹彩病毒减毒株对大口黑鲈的免疫调控机制 [J]. *水生生物学报*, 2025, **49**(6): 64-77.]
- [32] Fan J Q, Hong Q M, Liu L S, *et al.* Study of the antiviral function mediated by STING in *Micropterus salmoides* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(149): 109528.
- [33] Xu Z, Liao J, Zhang D, *et al.* Isolation, characterization, and transcriptome analysis of an ISKNV-like virus from largemouth bass [J]. *Viruses*, 2023, **15**(2): 398.
- [34] Jia Y J, Guo Z R, Ma R, *et al.* Protective immunity of largemouth bass immunized with immersed DNA vaccine against largemouth bass ulcerative syndrome virus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(107): 269-276.
- [35] Gong J P. Development and immune effect evaluation of largemouth bass ranavirus inactivated vaccine [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2022. [巩金鹏. 大口黑鲈蛙虹彩病毒病灭活疫苗的研制及免疫效果评价 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022.]
- [36] Nabel A, Yosua Y, Sriwidodo S, *et al.* Overview of refolding methods on misfolded recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies [J]. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 2023, **11**(3): 47-52.
- [37] Yamaguchi H, Miyazaki M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies [J]. *Biomolecules*, 2014, **4**(1): 235-251.
- [38] Li J, Han Q, Zhang T, *et al.* Expression of soluble native protein in *Escherichia coli* using a cold-shock SUMO tag-fused expression vector [J]. *Biotechnology Reports*, 2018(19): e00261.
- [39] Sun B, Skjæveland I, Svingerud T, *et al.* Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon [J]. *Journal of Virology*, 2011, **85**(17): 9188-9198.
- [40] 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.
- [41] Subramani A, Hite M E L, Garcia S, *et al.* Regulation of macrophage IFN γ -stimulated gene expression by the transcriptional coregulator CITED1 [J]. *Journal of Cell Science*, 2023, **136**(1): jcs260529.
- [42] Yuan X M, Xu L W, Huang L, *et al.* Prokaryotic expression of recombinant interferon IFN γ of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and its anti-GCRV effects [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2022, **30**(7): 1348-1356. [袁雪梅, 徐铃威, 黄雷, 等. 重组草鱼干扰素 IFN γ 原核表达及其抗GCRV效果 [J]. *农业生物技术学报*, 2022, **30**(7): 1348-1356.]
- [43] Geven E J W, Klaren P H M. The teleost head kidney: Integrating thyroid and immune signalling [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017(66): 73-83.
- [44] Zapata A G. The fish spleen [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(144): 109280.
- [45] Morales-Lange B, Ramírez-Cepeda F, Schmitt P, *et al.* Interferon gamma induces the increase of cell-surface markers (CD80/86, CD83 and MHC-II) in splenocytes from Atlantic salmon [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021(12): 666356.
- [46] Paul A, Tang T H, Ng S K. Interferon regulatory factor 9 structure and regulation [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018(9): 1831.

- [47] Platanitis E, Demiroz D, Schneller A, *et al.* A molecular switch from STAT2-IRF9 to ISGF3 underlies interferon-induced gene transcription [J]. *Nature Communications*, 2019(10): 2921.
- [48] 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.
- [49] Arts J A J, 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.
- [50] Biswas G, Nagamine R, Hikima J I, *et al.* Inductive immune responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) treated with recombinant IFN- γ , IFN- γ rel, IL-4/13A and IL-4/13B [J]. *International Immunopharmacology*, 2016(31): 50-56.
- [51] Deng Y, Ding C, Yang H, *et al.* First in vitro and in vivo evaluation of recombinant IL-1 β protein as a potential immunomodulator against viral infection in fish [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024(255): 128192.
- [52] Yang X, Wang S, Du L, *et al.* Molecular and functional characterization of IL-1 receptor type 2 in grass carp: a potent inhibitor of IL-1 β signaling in head kidney leukocytes [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, **41**(4): 738-745.
- [53] Zhang A, Chen D, Wei H, *et al.* Functional characterization of TNF- α in grass carp head kidney leukocytes: induction and involvement in the regulation of NF- κ B signaling [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, **33**(5): 1123-1132.
- [54] Zou J, Secombes C J. Teleost fish interferons and their role in immunity [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, **35**(12): 1376-1387.
- [55] Nguyen T T T, Nguyen H T, Wang P C, *et al.* Identification and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, TNF- α and IL-8, in cobia (*Rachycentron canadum* L.) in response to *Streptococcus dysgalactiae* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(67): 159-171.
- [56] Soliman A M, Barreda D R. The acute inflammatory response of teleost fish [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2023(146): 104731.
- [57] Li Z, Xu X, Huang L, *et al.* Administration of recombinant IFN1 protects zebrafish (*Danio rerio*) from ISKNV infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, **29**(3): 399-406.
- [58] Zhang M, Liu W Q, Wang Y, *et al.* Identification, expression pattern and functional characterization of IFN- γ involved in activating JAK-STAT pathway in *Sebastes schlegelii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023(140): 108936.
- [59] Li D, Lin G, Yu X, *et al.* Immunoprotection of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with recombinant interferon (rCiIFN) against GCHV infection [J]. *Aquaculture*, 2013(388): 42-48.
- [60] Del Mar Ortega-Villaizán M, Chico V, Perez L. Fish innate immune response to viral infection-an overview of five major antiviral genes [J]. *Viruses*, 2022, **14**(7): 1546.
- [61] Wang X L, Li Z C, Zhang C, *et al.* Spring viremia of carp virus N protein negatively regulates IFN induction through autophagy-lysosome-dependent degradation of STING [J]. *Journal of Immunology*, 2023, **210**(1): 72-81.
- [62] Wang Z X, Zhou Y, Lu L F, *et al.* Infectious hematopoietic necrosis virus N protein suppresses fish IFN1 production by targeting the MITA [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(97): 523-530.
- [63] Zhang Y, Wang L, Huang X, *et al.* Fish cholesterol 25-hydroxylase inhibits virus replication via regulating interferon immune response or affecting virus entry [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019(10): 322.
- [64] Zhu R, Wang J, Lei X Y, *et al.* Evidence for *Paralichthys olivaceus* IFITM1 antiviral effect by impeding viral entry into target cells [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, **35**(3): 918-926.
- [65] Zheng Y, Stamminger T, Hearing P. E2F/Rb family proteins mediate interferon induced repression of adenovirus immediate early transcription to promote persistent viral infection [J]. *PLoS Pathogens*, 2016, **12**(1): e1005415.
- [66] Kropp K A, Robertson K A, Sing G, *et al.* Reversible inhibition of murine cytomegalovirus replication by gamma interferon (IFN- γ) in primary macrophages involves a primed type I IFN-signaling subnetwork for full establishment of an immediate-early antiviral state [J]. *Journal of Virology*, 2011, **85**(19): 10286-10299.
- [67] Gao X, Lin L, Zhao Y, *et al.* SGIV evades interferon immune response via the degradation of STING-TBK1 complex by VP149 [J]. *Aquaculture*, 2024(584): 740666.
- [68] Zhan Z, Chen H, Liao X, *et al.* Singapore grouper iridovirus VP128 inhibits STING-TBK1 mediated signaling to evade antiviral immunity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(152): 109774.
- [69] Zhang Y, Gao X, Yang X, *et al.* Singapore grouper iridovirus VP131 drives degradation of STING-TBK1 pathway proteins and negatively regulates antiviral innate immunity [J]. *Journal of Virology*, 2022, **96**(20): e00682-e00622.
- [70] Radhakrishnan A, Vaseeharan B, Ramasamy P, *et al.* Oral vaccination for sustainable disease prevention in aquaculture-an encapsulation approach [J]. *Aquaculture International*, 2023, **31**(2): 867-891.
- [71] Yang J. PLGA microsphere/P (NIPAAm-co-AAm) hydrogel combination systems for drug delivery [J]. *IOP*

Conference Series: Materials Science and Engineering,
2019(504): 012013.

[72] Zhang Y, Zhao K, Liu Y, *et al.* An oral probiotic vaccine

loaded by *Lactobacillus casei* effectively increases
defense against GCRV infection in grass carp [J].
Vaccine, 2025(45): 126660.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF RECOMBINANT IFN- γ FROM LARGEMOUTH BASS (*MICROPTERUS SALMOIDES*) AND ITS PROTECTIVE MECHANISM AGAINST LMBV INFECTION

MENG Huai-Xin^{1,2}, LIN Ling-Yun², YAO Jia-Yun², GUO Qiong-Yao^{2,3}, SHEN Jin-Yu^{1,2} and PAN Xiao-Yi^{2,3}

(1. School of Life Sciences, Huzhou Normal University, Huzhou 313000, China; 2. Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Key Laboratory of Fishery Environment and Aquatic Product Quality and Safety of Huzhou City, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries (Zhejiang Freshwater Fishery Environmental Monitoring Station), Huzhou 313001, China; 3. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Largemouth bass ranavirus (LMBV) is a major pathogen in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) aquaculture, frequently causing high mortality and substantial economic losses. Non-specific immune responses are crucial for host antiviral defence. Although interferons are known to mediate antiviral immunity in teleosts, the function and underlying mechanisms of type II interferon IFN- γ (interferon- γ) in largemouth bass resistance to LMBV infection remain insufficiently elucidated. To address this, recombinant rMsIFN- γ was expressed and purified using a pCold-TF/Rosetta (DE3) prokaryotic system, and its bioactivity and anti-LMBV effects were assessed both in vitro using the *Micropterus salmoides* spinal cord cell line (MSSC) and in vivo. The results showed that rMsIFN- γ had an apparent molecular mass of approximately 21 kDa. In vitro, rMsIFN- γ markedly upregulated the expression of *Mx*, *ISG15*, *SOCS1*, and *IRF9* in MSSC cells, and exhibited measurable anti-LMBV activity under both prophylactic and therapeutic treatment regimens. In vivo, rMsIFN- γ induced the expression of *Mx*, *ISG15*, *SOCS1*, and *IRF9*, as well as the pro-inflammatory cytokines *IL-1 β* and *TNF- α* and the chemokine *IL-8*, in the spleen and head kidney. In therapeutic experiments, early rMsIFN- γ administration after infection resulted in lower *Mx* and *ISG15* expression than that in virus-infected controls, while *IL-1 β* and *IL-8* were significantly elevated; concomitantly, expression of the LMBV immediate-early protein ICP-46 was reduced. Thereafter, viral loads in tissues decreased and mortality progression in infected fish was delayed. Collectively, rMsIFN- γ confers demonstrable anti-LMBV effects both in vitro and in vivo, likely associated with the canonical interferon-stimulated genes (ISGs) pathway in conjunction with coordinated inflammatory and chemotactic responses in vivo. These findings highlight the potential utility of IFN- γ for LMBV control and provide a novel perspective for immunological prevention and intervention strategies in largemouth bass.

Key words: Interferon- γ ; Antiviral activity; Largemouth bass ranavirus (LMBV); *Micropterus salmoides*