

鱼类干扰素反应及分子调控

张义兵, 桂建芳

中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

摘要: 干扰素反应在脊椎动物抵抗病毒感染过程中发挥重要作用。近年来, 鱼类干扰素抗病毒免疫反应的研究取得了重要进展, 不仅克隆鉴定了一系列鱼类干扰素系统基因, 而且通过功能研究揭示了鱼类具有类似于高等哺乳类的干扰素反应。但是, 鱼类干扰素反应及分子调控具有自身特点。以下综述了最近这方面的研究结果。

关键词: 鱼类, 干扰素反应, 干扰素刺激基因, 信号通路, 分子调控

Fish interferon response and its molecular regulation: a review

Yibing Zhang, and Jianfang Gui

State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Abstract: Interferon response is the first line of host defense against virus infection. Recent years have witnessed tremendous progress in understanding of fish innate response to virus infection, especially in fish interferon antiviral response. A line of fish genes involved in interferon antiviral response have been identified and functional studies further reveal that fish possess an IFN antiviral system similar to mammals. However, fish virus-induced interferon genes contain introns similar to mammalian type III interferon genes although they encode proteins similar to type I interferons, which makes it hard to understand the evolution of vertebrate interferon genes directly resulting in a debate on nomenclature of fish interferon genes. Actually, fish display some unique mechanisms underlying interferon antiviral response. This review documents the recent progress on fish interferon response and its molecular mechanism.

Keywords: fish, interferon response, interferon-stimulated genes, signaling pathway, molecular mechanism

1957年,英国学者 Alick Isaacs 和 Jean Lindenmann 发现感染病毒的细胞能分泌一种抗病毒蛋白^[1]。这在利用鸡胚绒毛尿囊膜研究流感病毒的干扰现象时 种抗病毒蛋白能诱导邻近细胞抗病毒状态的产生、

Received: December 17, 2010; **Accepted:** March 21, 2011

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB126303), National Natural Science Foundation of China (No. 30871922), FEBL Research Grant (No. 2009FBZ01).

Corresponding author: Yibing Zhang. Tel: +86-27-68780663; Fax: +86-27-68780123; E-mail: ybzhang@ihb.ac.cn
Jianfang Gui. Tel: +86-27-68780707; Fax: +86-27-68780123; E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2010CB126303), 国家自然科学基金 (No. 30871922), 淡水生态与生物技术国家重点实验室项目 (No. 2009FBZ01) 资助。

抑制多种同源和异源病毒的感染。他们把这种抗病毒蛋白命名为干扰素 (Interferon, IFN), 从此开始了脊椎动物 IFN 系统半个多世纪的探索和发现。

1 哺乳类 IFN 抗病毒反应分子机制简介

IFN 是人类发现的第一种细胞因子, 一般在病毒等微生物感染时被诱导表达。IFN 反应被认为是脊椎动物抵抗病毒入侵的第一道防线。哺乳类 IFN 根据结合的受体不同分为 I 型 IFN、II 型 IFN 和 III 型 IFN 三类。在人基因组中, I 型 IFN 由包括 15 个有活性的 IFN α 成员和 14 个假基因, 1 个 *IFN β* 基因, 1 个有活性的 *IFN ω* 基因和 5 个假基因, 以及 1 个 *IFN κ* 基因组成。所有的 I 型 IFN 基因串联在第 9 号染色体短臂。II 型 IFN 只包括 1 个基因 *IFN γ* , 包含 3 个内含子, 位于第 12 号染色体的长臂。III 型 IFN 由 2 个研究小组在 2003 年同时鉴定, 由 *IFN λ 1*、*IFN λ 2* 和 *IFN λ 3* 组成, 位于第 19 号染色体^[2]。其中 I 型 IFN 和 III 型 IFN 被认为具有共同的进化起源, 抗病毒性质相似, 又被合称为“病毒诱导的 IFN”。

关于 I 型 IFN 的信号通路研究较多^[3]。宿主细胞一旦受到病毒感染, 就能通过至少两类模式识别受体 (Pattern-recognition receptors, PPRs) 识别病毒核酸 DNA 或病毒复制时产生的 dsRNA (Double-stranded RNA): 一类位于内吞体膜上的 Toll 样受体 (Toll-like receptor) 如 TLR3, 另一类存在于细胞质中的受体 RLR (Retinoic acid inducible gene I(RIG-I)-like receptor), 主要包括 RIG-I 和 MDA5 (Melanoma differentiation-associated gene 5)。这两类受体分别启动不同的信号通路, 但最后都需要磷酸化激活一个共同的转录因子 IRF3 (IFN regulatory factor 3)。激活后的 IRF3 从细胞质进入到细胞核, 结合到 *IFN β* 基因启动子 PRDI 和 PRDIII (Positive regulatory domain I and III) 上启动 *IFN β* 的转录。激活的 IRF3 还能直接结合在某些 ISGs (IFN-stimulated gene) 如 *ISG56*、*ISG54* 基因启动子的 ISRE 上直接启动这些基因的表达。诱导产生的 IFN β 分泌到细胞

外, 结合到邻近细胞的 IFN 受体 IFNAR1 和 IFNAR2 导致 Janus kinase 家族的 Tyk2 磷酸化, 同时 Tyk2 与 Janus kinase 家族的另外一个成员 JAK1 又通过相互磷酸化被进一步激活。激活后的 JAK1 与 Tyk2 又反过来磷酸化 Stat1 (Signal transducer and activator of transcription 1) 和 Stat2 蛋白, 导致 Stat1:Stat2 异源二聚体的形成, 然后脱离 IFN 受体与 IRF9 形成 ISGF3 (Interferon-stimulated gene factor 3) 复合体, 从细胞质进入到细胞核结合到 ISGs 基因启动子的调控序列 ISRE (IFN-stimulated response sequence) 上, 最终启动 ISGs 转录, 其中包括 IRF7 的表达。新合成的 IRF7 被激活后参与诱导各种 *IFN α* 基因的表达。产生的 IFN α 蛋白又通过上述的 Jak-Stat 通路诱导 ISGs 的表达, 形成一个正反馈的放大过程。PDC 细胞 (Plasmacytoid dendritic cells) 主要产生 IFN α , 其信号通路有其细胞特异性^[4-5]。

因此, IFN 本身没有抗病毒作用, 需要诱导一系列抗病毒蛋白的表达才能建立宿主细胞的抗病毒状态^[6]。目前已经证实的由抗病毒蛋白介导的干扰素反应有: Mx (Myxovirus-resistant) 蛋白介导途径, 蛋白激酶 PKR (Double-stranded RNA-activated protein kinase) 介导途径, 2',5'-寡聚核苷酸酶 (2'-5'-oligoadenylate synthetase) 介导途径, 以及由 ADAR (Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase) 介导的 RNA 编辑 (RNA editing) 机制等等。此外, 有报道表明 ISG15、ISG56、Viperin (Virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, interferon-inducible) 等 ISGs 同样能介导 IFN 诱导的抗病毒作用, 但是其中机制还有待于阐明。如 ISG15 是一种类泛素蛋白, 通过类似于泛素化的机制与靶分子共轭结合 (Conjugating), 称之为 ISGylation。ISG15 通过修饰靶分子使之免于降解 (如作用于 IRF3) 或促使活性的改变 (如增强 EIF4E2 与 RNA 的 5'帽子结构的结合, 但是却抑制 PPM1B 的酶活性从而增强 NF- κ B 信号)。但不管怎样, 在 IFN 受体剔除小鼠中, 感染致死量的辛德比斯病毒 (Sindbis virus), 过量表

达 ISG15 却能提高小鼠存活率。ISG56 早期发现能够抑制病毒蛋白的翻译起始, 但是最近的研究却发现负调控 IFN 信号。

2 鱼类具有干扰素抗病毒反应系统

1965 年, 在发现哺乳类 IFN 8 年后, Gravel 和 Malsberger 首次在传染性腺坏死病毒 (IPNV) 诱导的鱼类培养细胞 FHM 中检测到鱼类干扰素活性^[7]。此后从人工病毒感染或如 poly I:C 等诱导剂诱导的多种鱼类培养细胞和鱼体血清中检测到 IFN 活性。我国学者在研究草鱼出血病病毒 GCRV 感染草鱼培养细胞时, 也从培养上清中发现有抗病毒活性物质产生^[8-10]。我们实验室利用紫外线灭活的 GCRV 在多种鲤科鱼类细胞中也获得了相似的结果^[11-12]。这些研究虽然都未能成功分离纯化鱼类 IFN 蛋白, 但是都表明鱼类具有类似于哺乳类 IFN 的抗病毒反应。

随着分子生物学研究的深入, 鱼类 IFN 基因以及 IFN 反应相关的一些重要基因如 Stat 家族成员、IRF 家族成员、包括 *Mx* 等在内的抗病毒效应基因相继被鉴定, 从分子水平证明鱼类存在 IFN 系统^[13-15]。2003 年, 病毒诱导的鱼类 IFN 基因随着模式动物基因组破译的浪潮终于在斑马鱼、大西洋鲑、河豚率先获得鉴定^[16-18]。此后, IFN 基因在斑点叉尾鲷、虹鳟、鲫、鲤等多种鱼类中也获得鉴定。与病毒诱导哺乳类 IFN 基因相似, 病毒感染和利用 poly I:C 等诱导剂能诱导 IFN 基因的表达并伴随着细胞抗病毒状态的建立; 过量表达鱼类 IFN 基因能诱导下游 ISG 基因的表达, 同时抑制病毒的复制; 原核表达的 IFN 纯化蛋白也类同于转染 IFN 基因相同的效果^[19]。鱼类 IFN 自身同样没有抗病毒作用, 阻断细胞 Stat1 通路能显著抑制 IFN 抑制细胞中病毒的复制, 其机制在于阻断了 IFN 诱导抗病毒基因的表达^[19]。作为抗病毒基因, IFN 诱导表达基因如 *PKR*^[20] 和 *Mx*^[21] 不仅具有类似哺乳类同源基因的结构, 而且在细胞中过量表达能显著抑制病毒感染。

机制研究发现鱼类 PKR 也通过磷酸化底物 eIF2 α 阻断蛋白翻译, 从而抑制病毒在细胞中的复制^[20]。

3 病毒诱导的鱼类 IFN 基因及其受体

目前已鉴定出两类鱼类 IFN 基因: 一类与哺乳类 II 型 IFN 同源^[22]。与哺乳类只具有一个 *IFN γ* 拷贝不同的是, 很多种鱼的基因组中至少有 2 个以上拷贝^[23]。另外一类与哺乳类病毒诱导的 IFN 基因同源 (以下讨论的都是这类 IFN)。同源性分析发现鱼类病毒诱导的 IFN 氨基酸组成与哺乳类 I 型 IFN 的同源性高于与哺乳类 III 型 IFN 的同源性。鱼类病毒诱导的 IFN 基因也具有多拷贝, 系统进化树发现鱼类 IFN 独立于哺乳类和鸟类 IFN 而自成一个进化分枝, 表明虽然所有脊椎动物 IFN 有共同的进化起源, 但不支持单个鱼类 IFN 基因与高等动物单个 IFN 基因间存在对应的直向进化关系 (Orthologous relationship)。有趣的是, 不同于哺乳类 *IFN α/β* 基因不含有内含子, 鉴定的鱼类 IFN 基因都具有 5 个外显子和 4 个内含子, 与哺乳类 III 型 IFN 的基因结构相似 (有内含子)^[13,17]。由于鱼类 IFN 基因具有与 IL10 家族基因相似的外显子和内含子的特点, 因此有学者认为, 在进化上鱼类 IFN 基因可能代表一类古老的 *IFN*^[17]。另外, 已经鉴定的斑马鱼 4 个 IFN 基因有 3 个串连在第 3 号染色体, 而另外一个则位于第 12 号染色体^[24]。相对于其他脊椎动物, 鱼类发生过特有的第 3 次基因组加倍事件。4 个斑马鱼 IFN 基因位于不同染色体是否源于这次特有的基因组加倍事件还有待证实。

根据鱼类 IFN 氨基酸组成中所含的半胱氨酸数量的不同, 可以将所有已知的鱼类 IFN 分为两类: group I IFN 含有 2 个半胱氨酸, 而 group II IFN 含有 4 个半胱氨酸^[25]。系统进化树支持这个结论^[19,24-27]。根据不同诱导剂在不同细胞中对大西洋鲑 11 种 IFN 基因的诱导表达特点以及对新发现的虹鳟 IFN 基因结构进行分析, 发现这些 IFN 基因可以进一步细分为 4 类^[26-27]。group I IFN 和 group II IFN 的功能似乎

也有显著差别^[24]。在斑马鱼中,注射 group I IFN 蛋白在病毒和细菌感染时都能发挥作用,而 group II IFN 仅在病毒感染时有效^[28-29]。比较抗病毒效应基因的表达强度和时序时发现,group II IFN 诱导快速和瞬时的基因表达,而 group I IFN 诱导基因表达的特点是强烈和持久。因此 group II IFN 可能在病毒感染早期发挥作用^[28]。体外研究也表明 group II IFN 诱导 *Mx* 的表达要弱于 group I IFN^[25]。

值得一提的是目前利用斑马鱼胚胎和幼鱼所作的开创性工作使鱼类 IFN 系统基因的功能研究上了一个新台阶。由于斑马鱼在发育早期(前 4~6 周)只有非特异性免疫发挥作用,因此斑马鱼胚胎和幼鱼就成为了一个非常好的研究模型,而且可以利用 Morpholino 在胚胎发育时期进行基因功能阻断。运用这个模型系统,法国学者发现斑马鱼的两类 IFN 通过结合不同的 IFN 受体发挥抗病毒功能。同哺乳类 IFN 一样,鱼类 IFN 受体由 2 个亚基组成。两类鱼类 IFN 共同使用一个短链受体 CRFB5,但却用不同的长链受体:group I IFN 为 CRFB1,group II IFN 为 CRFB2^[24,30]。很显然,鱼类病毒诱导的 IFN 受体与高等哺乳类 I 型和 III 型 IFN 受体相比是不保守的。

4 病毒诱导的鱼类 IFN 反应及 IFN 介导的 Stat1 通路

鱼类 IFN 和受体不同于哺乳类的结构特点提出了一个基本问题:鱼类 IFN 是否通过保守的 Jak-Stat 信号通路发挥作用?我们实验室在病毒感染的鱼类培养细胞中鉴定了一系列的 IFN 系统基因,包括特异识别 dsRNA 的基因 *TLR3*、*RIG-I* 和 *MDA5*, *IFN* 基因,干扰素信号通路基因 *STAT1*、*JAK1*,干扰素表达调控基因 *IRF1*、*IRF2*、*IRF3*、*IRF7*、*IRF9*,抗病毒基因 *Mx1*、*Mx2*、*IFI56*、*PKR-like*、*PKR*、*Viperin*、*ISG15-1*、*ISG15-2*、*ISG15-3* 等等^[14-15,19]。在哺乳类,这些基因在 IFN 信号通路中的不同结点上发挥作用。在病毒感染的鱼类培养细胞中,这些基因受病毒诱导后表达上调表明它们在鱼类 IFN 抗

病毒反应中也可能发挥相似作用。利用基因转染技术,证实在培养细胞中过量表达鲫 Stat1 蛋白能促进 IFN 的抗病毒作用,而转染显性失活突变载体 (Dominant negative mutant) 阻断 Stat1 的功能则削减 IFN 对培养细胞的保护能力。基因表达分析证明 IFN 发挥抗病毒作用需要经过 Stat1 通路诱导下游 ISGs 的表达^[19]。事实上,IFN 处理可以诱导大西洋鲑 Stat1 的磷酸化^[31];在 *Stat1* 基因缺失的人细胞株中过量表达斑马鱼 *Stat1* 基因,可以恢复正常的 IFN 信号,表明在 IFN 反应中鱼类 *Stat1* 功能的保守性^[32]。但是,斑马鱼基因组有 2 个 *Stat1* 基因拷贝。这两个拷贝的 *Stat1* 功能是否相同,或鱼类基因组存在多个 *Stat1* 有何生物学意义仍不清楚^[33]。

有关鱼类 IFN 反应的启动研究最近也取得进展。目前在哺乳类研究较多的 dsRNA 受体如 *TLR3*、*RIG-I* 和 *Mda5* 也存在于鱼类基因组中。虽然没有证实鱼类 RIG-I 和下游分子 MAVS (The mitochondrial anti-viral signaling protein, 也称为 IPS-1, VISA 和 CARDIF) 之间的相互作用,但是分别过量表达大西洋鲑 RIG-I 或 MAVS 能诱导细胞的 IFN 反应,抑制病毒在细胞中的复制^[34]。鱼类 TLR 系统有与哺乳类 TLR 成员完全同源的基因,也具有自身特有的基因。如河豚基因组发现有 *TLR3* 同源基因,也有哺乳类不存在的 *TLR22*。功能揭示河豚 TLR3 位于内质网膜上,TLR22 位于细胞膜上,两者都能识别病毒信号通过 Trif (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) 途径启动 IFN 反应,表明鱼类具有不同于哺乳类的 TLR-Trif-IRF3-IFN 信号通路^[35-36]。在另外一篇关于斑马鱼 Trif 的研究中发现,鱼类 Trif 与哺乳类 Trif 是直向同源的进化关系,但是序列出现了较大歧化。这些结构上的差异可能是鱼类 Trif 不能与 Traf6 (Receptor associated factor 6) 结合行使类似哺乳类 Trif 功能的原因^[37]。虽然如此,过量表达 Trif 仍然能够启动 IFN 反应,但是作者认为由 Trif 启动的 IFN 反应可能不经过 IRF3/IRF7 途径^[37]。我们实验室最

近在研究鲫 IRF3 的功能时也探索了该蛋白在 dsRNA (poly I:C) 激活的 IFN 反应中的作用, 却发现了不同于该研究的结果。在这个实验中, 阻断 IRF3 几乎能阻断由胞外 poly I:C 启动的鱼类 IFN 反应, 证明在 TLR 介导的鱼类 IFN 反应中, 鱼类 IRF3 具有类同于哺乳类 IRF3 的作用^[38]。

5 鱼类 IRF3 对 IFN 反应的调控作用

如前所述, TLR 和 RLR 途径虽然启动不同的信号通路介导 IFN 反应, 但是最后都汇聚在一点, 即都需要磷酸化激活转录因子 IRF3^[3]。哺乳类 IRF 家族共有 9 个成员, 鸟类还存在 IRF10。鱼类基因组中存在所有发现的 10 个 IRF 成员, 并且还有一个新成员 IRF11, 该基因与 IRF1 有非常近的亲缘关系^[32]。系统进化树分析, 鱼类 IRF1-IRF10 与高等脊椎动物的 IRF 家族成员具有直向同源关系^[33,38-39]。鱼类 *IRF1* 是最早获得鉴定的 IRF 家族成员, 有报道表明过量表达 *IRF1* 能够诱导 IFN 反应^[40]。哺乳类中 IRF1 同样能够调控 IFN 反应, 但是大量的研究表明, 在这个过程中只有 IRF3 和 IRF7 发挥重要作用。

哺乳类 IRF3 是一个遍在表达蛋白, 在正常细胞中没有活性, 其表达在病毒感染和 IFN 处理时不发生变化。大多数细胞不表达 IRF7 或表达很弱, 仅在某些细胞如 PDC (Plasmacytoid dendritic cells) 中有组成型表达。IRF7 的表达受病毒和 IFN 诱导上调。这就是为什么在大多数细胞如成纤维细胞和 CDC (Conventional dendritic cells) 中, 无论是经 TLR3 途径还是经 RLR 途径识别病毒信号都可以诱导 IFN β 的产生, 因为这些细胞都组成型表达 IRF3。病毒感染激活的 IRF3 主要负责早期表达的 IFN β 的表达; 产生的 IFN β 可以诱导晚期表达的 IFN (大部分的 IFN α) 的表达, 在这个过程中 IRF7 发挥重要作用^[3]。同时也可以理解为什么 PDC 能高效表达 IFN α 而不是 IFN β ^[4]。PDC 细胞启动 IFN 信号有其细胞特异性, 利用 TLR 途径 (TLR7/8/9 而不是 TLR3) 识别病毒核酸, 其信号通路也不同于 TLR3 介导的

Trif-IRF3-IFN, 而需要 MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) 和 IRF7 的相互作用^[4]。因为 PDC 细胞中表达的核酸受体为 TLR7/8/9, 且高表达 IRF7, 因此, 该种细胞启动 IFN 信号的是 TLR7/8/9 途径而不是 RIG-I 途径^[41]。事实上, 过量表达 IRF7 不能诱导 *IFN β* 基因启动子活性, 而经 TLR7/8/9 激活的 IRF7 和 MyD88、TRAF6 形成复合物在 PDC 细胞中介导 IFN α 的产生^[4]。另外, 早期表达的 IFN β 虽能诱导晚期 IFN α 的表达, 但不能诱导自身表达^[42]; IFN α 也不能诱导自身表达^[43]。

我们近期的研究发现, 鲫 IFN 能通过 Stat1 途径诱导自身基因的表达, 因此在抗病毒免疫反应中形成一个正反馈循环以在病毒感染初期放大 IFN 反应^[19]。分析鲫 *IFN* 启动子, 发现 2 个典型的 ISRE 基序。突变分析证明这 2 个 ISRE 在鲫 *IFN* 基因的诱导表达中发挥重要作用, 至少 IRF3 可能结合在该位点启动鲫 *IFN* 的表达^[38]。因此, 鲫 *IFN* 基因实际上也是一个典型的 ISG。鲫 *IFN* 基因的自我表达调控性质与哺乳类 III 型 IFN 相似, 因为人 III 型 IFN 不仅能被 I 型 IFN 诱导表达也能诱导自身表达^[43-45]。在关于最初鉴定的 3 个斑马鱼 *IFN* 基因的研究中也有相同发现^[46]。

鱼类 IRF3 是否类似于哺乳类 IRF3 在调控 IFN 反应中具有重要作用呢? 最近的研究发现鱼类 IRF3 的表达调控机制不同于哺乳类 IRF3: 它们不仅受 IFN 诱导表达, 而且还受各种 IFN 诱导剂的诱导表达。通过制备鲫 IRF3 的多克隆抗体, Western blotting 证明鱼类 IRF3 蛋白是一个 IFN 诱导的蛋白。分析鲫 *IRF3* 基因启动子发现含有 ISRE 基序。进一步对已知的鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类 *IRF3* 基因的启动子进行分析, 发现了有趣的结果: ISRE 基序不仅存在于所有鱼类 *IRF3* 基因, 而且在两栖类 *IRF3* 基因的启动子中也存在。但是在爬行类、鸟类和哺乳类等羊膜动物中不存在。在哺乳类, IRF3 的组成型表达早有定论, 因此可以断定 *IRF3* 基因的表达调控机制在脊椎动物的演化中发生了歧化, 这种

差异直接表现为基因调控序列的变异。功能研究证实脊椎动物 IRF3 调控 IFN 反应的功能应该是一个古老的机制,因为在鱼类培养细胞中过量表达 *IRF3* 可以诱导 *IFN* 及其下游 ISG 基因的表达,诱导 ISG 基因如 *Mx* 和 *Gig2* 表达需要细胞先产生 IFN,这种调控结果与哺乳类类似^[38]。

IRF3 在调控 IFN 反应时是否承担了一个转录因子的角色?在哺乳类,病毒感染细胞激活细胞质激酶 TBK1 (TANK-binding kinase 1),该激酶然后磷酸化激活 IRF3 蛋白,激活的 IRF3 蛋白从细胞质进入到细胞核然后启动 *IFN β* 基因的表达。因此,IRF3 蛋白的磷酸化和入核可以当作 IRF3 被激活的标志。序列分析所有脊椎动物 IRF3 蛋白的 C 末端具有一个保守的丝氨酸和苏氨酸结构域。将该结构域中的丝氨酸和苏氨酸替换成天冬氨酸制备组成型激活型 IRF3 蛋白,在培养细胞中过量表达该突变体比野生型蛋白有更强的诱导 IFN 反应的能力,证明磷酸化该结构域在调控 IFN 反应中的重要性。事实上我们也检测到 poly I:C 等诱导剂能诱导 IRF3 的磷酸化。有趣的是,鲫 IRF3 在 IFN 处理的细胞中也能被磷酸化,而且在 poly I:C 和 IFN 处理的细胞中观察到随着诱导时间的推移,越来越多的 IRF3 蛋白从细胞质进入到细胞核。因此,鱼类 IRF3 能被 IFN 诱导激活,从而通过诱导相关基因的表达调控 IFN 反应^[38]。

鱼类 IRF3 不同于哺乳类的表达调控和功能特点有什么生物学意义?在哺乳类,IRF3 蛋白有较高水平的组成型表达、仅受病毒感染激活、被激活后的 IRF3 蛋白将在几小时内迅速被降解。这 3 个方面的特点保证当细胞感染病毒时 IFN 反应能在第一时间启动,但仅在病毒感染的细胞中发生,而且是适度发生。反观在鱼类中,IRF3 有组成型表达,但是 IFN 能诱导 IRF3 表达和激活,表明当病毒诱导 IFN 反应后,诱导合成的 IRF3 蛋白能继续被 IFN 激活参与 IFN 的级联放大反应。同时也表明,IRF3 启动的 IFN 反应不仅在病毒感染的细胞中启动,而且在 IFN 作用的细胞中,即使没有感染病毒的情况下也能发

生。因此,与哺乳类相比,鱼类 IRF3 调控的 IFN 反应是一个相对粗放的机制。鉴于两栖类 *IRF3* 基因具有与鱼类 *IRF3* 相同的表达调控特点,在两栖类中依赖 IRF3 调控的 IFN 反应可能也具有类似鱼类的特点。这些结果表明,随着物种的演化,依赖 IRF3 调控的 IFN 反应机制越来越趋于精确和完善^[38]。

6 问题及展望

虽然鱼类 IFN 系统基因的鉴定以及基因功能的研究最近取得重要进展,但是关于基因功能的研究还不多,主要原因可能在于功能基因研究体系和技术平台还没能有效建立起来。我们在研究中也发现 IRF7 能够诱导鱼类 IFN 的表达,但是与 IRF3 相比,作用较弱,是否与 IRF3 有协同作用还有待进一步解析^[38]。目前许多鱼类 IFN 反应研究还局限于基因鉴定和克隆,对基因功能的描述仅限于从蛋白同源性分析和表达特征比较上进行推论。如 *IRF2*、*IRF9* 等虽然在鱼类获得克隆并且推断在鱼类的 IFN 反应中发挥重要作用,但目前还缺乏严谨证据。而较为系统的功能研究或许能发现鱼类 IFN 反应中特有的机制。*TLR22* 和 *IRF3* 基因的功能研究从某种程度上就是一个例证。

目前,鱼类 IFN 的结构特点引发了对其分类定位的讨论。有学者依据鱼类病毒诱导的 IFN 具有内含子的结构特征以及其受体与 III 型 IFN 受体更为同源的事实,把它们归为 III 型 IFN^[17]。另有学者从蛋白结构分析发现鱼类 IFN 与哺乳类 I 型 IFN 更为相近,而且具有 I 型 IFN 保守的 CAWE 基序,认为它们属于古老的 I 型 IFN^[13,18,25,47]。高等动物 I 型 IFN 的出现是因为转座事件取代了古老的 I 型 *IFN* 基因位点所致^[25]。最近在两栖类爪蟾基因组中发现了具有内含子的 I 型 *IFN* 基因,为后一种观点提供了更有利的证据^[47]。在该研究中作者预测在鱼类的基因组中可能存在目前仍没被发现的具有内含子的 III 型 *IFN* 基因^[47]。还有第 3 种观点认为,鱼类 *IFN* 既与高等动物 I 型和 III 型 *IFN* 既有共同点又有不同

点, 因此不能以 I 型或 III 型来简单分类, 建议命名为 $IFN\phi^{24,33}$ 。

此外, 许多保守的鱼类 IFN 系统基因编码蛋白结构发生了歧化, 如报道的 *Trif* 基因和 *IRF3* 基因^[31,37], 而蛋白结构差异可能导致与哺乳类同源蛋白的功能差异。还有如鱼类 *PKR* 在一些种类有不同的拷贝数, N 端 dsRBM 结构域数目各异等等^[48]。基因调控序列的变异也将导致功能的差异, 如鱼类 *IRF3* 的表达调控机制差异揭示了鱼类 IFN 反应的自身特点。

最后, 鱼类 IFN 系统还有自身特有的一些新基因, 如鱼类特有的 *PKZ* 基因^[49-50], 仅发现在鱼类和两栖类基因组中存在的 *Gig2* 基因^[51-52], 鱼类特有的 *IRF11*^[33,47] 等等。这些基因在鱼类 IFN 反应中的角色还有待研究。众所周知, 鱼类经过了一次特定的基因组加倍, 随着二倍化的进程, 许多基因在物种进化过程中丢失, 但是仍有一些基因具有多拷贝, 如斑马鱼基因组中有 2 个 *Stat1* 基因^[33]。这些多拷贝基因在功能上是互补还是冗余, 以至于是否发生了歧化都需要在今后的研究中逐一证实。

REFERENCES

- [1] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957, 147(927): 258-267.
- [2] Pitha PM, Kunzi MS. Type I interferon: the ever unfolding story. Curr Top Microbiol Immunol, 2007, 316(2): 41-70.
- [3] Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. Immunol Rev, 2009, 227(1): 75-86.
- [4] Kawai T, Sato S, Ishii KJ, et al. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. Nat Immunol, 2004, 5(10): 1061-1068.
- [5] Kumagai Y, Kumar H, Koyama S, et al. Cutting edge: TLR-dependent viral recognition along with type I IFN positive feedback signaling masks the requirement of viral replication for IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. J Immunol, 2009, 182(7): 3960-3964.
- [6] Sadler AJ, Williams BRG. Interferon-inducible antiviral effectors. Nat Rev Immunol, 2008, 8(7): 559-568.
- [7] Gravell M, Malsberger RG. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Ann N Y Acad Sci, 1965, 126(1): 555-565.
- [8] Jiang YL, Li ZQ. Study on an interferon-like substance produced by virus-infected grass carp cell lines. Chin J Virol, 1991, 7(1): 30-35.
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. 病毒学报, 1991, 7(1): 30-35.
- [9] Shao JZ, Xiang LX, Li YN, et al. Studies on an anti-hemorrhagic virus proein isolated from culture cell of grass carp. Chin J Virol, 1993, 9(4): 352-362.
邵建忠, 项黎新, 李亚南, 等. 从草鱼细胞分离到一种抗出血病病毒蛋白因子的研究. 病毒学报, 1993, 9(4): 352-362.
- [10] Shao JZ, Qian KX, Xiang LX, et al. Study on interferon production in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) following infection with haemorrhagic virus. Chin J Virol, 1998, 14(4): 346-351.
邵建忠, 钱凯先, 项黎新, 等. 病毒诱导草鱼产生干扰素活性因子的研究. 病毒学报, 1998, 14(4): 346-351.
- [11] Wang TH, Zhang YB, Li GQ, et al. Interferon induction in cultured fish cells. Chin J Virol, 1999, 15(1): 43-49.
王铁辉, 张义兵, 李戈强, 等. 鱼类培养细胞干扰素的诱导. 病毒学报, 1999, 15(1): 43-49.
- [12] Zhang YB, Wang TH, Li GQ, et al. Induction and partial characterization of CAB fish cell (blastulae embryonic cell line of crucian carp) interferon. Viriol Sin, 2000, 15(2): 163-169.
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. 中国病毒学, 2000, 15(2): 163-169.
- [13] Robertsen B. The interferon system of teleost fish. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20(2): 172-191.
- [14] Zhang YB, Jiang J, Chen YD, et al. The innate immune response to grass carp hemorrhagic virus (GCHV) in cultured *Carassius auratus* blastulae (CAB) cells. Dev Comp Immunol, 2007, 31(3): 232-243.
- [15] Zhang YB, Zhang QY, Gui JF. Interferon system and identification of interferon system genes in fish. Acta Hydrobiol Sin, 2004, 28(3): 317-322.
张义兵, 张奇亚, 桂建芳. 鱼类的干扰素系统和干扰素系统基因的鉴定. 水生生物学报, 2004, 28(3): 317-322.
- [16] Altmann SM, Mellon MT, Distel DL, et al. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. J Virol, 2003, 77(3): 1992-2002.

- [17] Lutfalla G, Crollius HR, Stange-Thomann N, et al. Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics*, 2003, 4: 29.
- [18] Robertsen B, Bergan V, Røkenes T, et al. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J Interferon Cytokine Res*, 2003, 23(10): 601–612.
- [19] Yu FF, Zhang YB, Liu TK, et al. Fish virus-induced interferon exerts antiviral function through Stat1 pathway. *Mol Immunol*, 2010, 47(14): 2330–2341.
- [20] Zhu R, Zhang YB, Zhang QY, et al. Functional domains and the antiviral effect of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR from *Paralichthys olivaceus*. *J Virol*, 2008, 82(14): 6889–6901.
- [21] Larsen R, Rokenes TP, Robertsen B. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein. *J Virol*, 2004, 78(15): 7938–7944.
- [22] Zou J, Carrington A, Collet B, et al. Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *J Immunol*, 2005, 175(4): 2484–2494.
- [23] Savan R, Ravichandran S, Collins JR, et al. Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20(2): 115–124.
- [24] Aggad D, Mazel M, Boudinot P, et al. The two groups of zebrafish virus-induced interferons signal via distinct receptors with specific and shared chains. *J Immunol*, 2009, 183(6): 3924–3931.
- [25] Zou J, Tafalla C, Truckle J, et al. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *J Immunol*, 2007, 179: 3859–3871.
- [26] Chang MX, Nie P, Collet B, et al. Identification of an additional two-cysteine containing type I interferon in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* provides evidence of a major gene duplication event within this gene family in teleosts. *Immunogenetics*, 2009, 61(4): 315–325.
- [27] Sun B, Robertsen B, Wang ZQ, et al. Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33(4): 547–558.
- [28] López-Muñoz A, Roca FJ, Meseguer J, et al. New insights into the evolution of IFNs: zebrafish group II IFNs induce a rapid and transient expression of IFN-dependent genes and display powerful antiviral activities. *J Immunol*, 2009, 182(6): 3440–3449.
- [29] Li Z, Xu X, Huang L, et al. Administration of recombinant IFN1 protects zebrafish (*Danio rerio*) from ISKNV infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29(3): 399–406.
- [30] Levraud JP, Boudinot P, Colin I, et al. Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system. *J Immunol*, 2007, 178: 4385–4394.
- [31] Skjesol A, Hansen T, Shi CY, et al. Structural and functional studies of STAT1 from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Immunol*, 2010, 11: 17.
- [32] Oates AC, Wollberg P, Pratt SJ, et al. Zebrafish *stat3* is expressed in restricted tissues during embryogenesis and *stat1* rescues cytokine signaling in a *STAT1*-deficient human cell line. *Dev Dyn*, 1999, 215(4): 352–370.
- [33] Stein C, Caccamo M, Laird G, et al. Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biol*, 2007, 8: R251.
- [34] Biacchesi S, LeBerre M, Lamoureux A, et al. Mitochondrial antiviral signaling protein plays a major role in induction of the fish innate immune response against RNA and DNA viruses. *J Virol*, 2009, 83(16): 7815–7827.
- [35] Matsuo A, Oshiumi H, Tsujita T, et al. Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J Immunol*, 2008, 181(5): 3474–3485.
- [36] Fan S, Chen Sw, Liu Y, et al. Zebrafish TRIF, a Golgi-localized protein, participates in IFN induction and NF- κ B activation. *J Immunol*, 2008, 180(8): 5373–5383.
- [37] Sullivan C, Postlethwait JH, Lage CR, et al. Evidence for evolving Toll-IL-1 receptor-containing adaptor molecule function in vertebrates. *J Immunol*, 2007, 178(7): 4517–4527.
- [38] Sun F, Zhang YB, Liu TK, et al. Characterization of fish IRF3 as an IFN-inducible protein reveals evolving regulation of IFN response in vertebrates. *J Immunol*, 2010, 185(12): 7573–7582.
- [39] Huang B, Qi ZT, Xu Z, et al. Global characterization of interferon regulatory factor (IRF) genes in vertebrates: glimpse of the diversification in evolution. *BMC Immunol*, 2010, 11: 22.
- [40] Caipang CMA, Hirono I, Aoki T. Modulation of the early immune response against viruses by a teleostean interferon

- regulatory factor-1 (IRF-1). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2009, 152(3): 440–446.
- [41] Kato H, Sato S, Yoneyama M, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*, 2005, 23(1): 19–28.
- [42] Deonarain R, Alcami A, Alexiou M, et al. Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon. *J Virol*, 2000, 74(7): 3404–3409.
- [43] Ank N, West H, Bartholdy C, et al. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections *in vivo*. *J Virol*, 2006, 80(9): 4501–4509.
- [44] Ank N, Iversen MB, Bartholdy C, et al. An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *J Immunol*, 2008, 180: 2474–2485.
- [45] Osterlund PI, Pietila TE, Veckman V, et al. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol*, 2007, 179: 3434–3442.
- [46] López-Munoz A, Roca FJ, Sepulcre MP, et al. Zebrafish larvae are unable to mount a protective antiviral response against waterborne infection by spring viremia of carp virus. *Dev Comp Immunol*, 2010, 34(5): 546–552.
- [47] Qi ZT, Nie P, Secombes CJ, et al. Intron-containing type I and type III IFN coexist in amphibians: refuting the concept that a retroposition event gave rise to type I IFNs. *J Immunol*, 2010, 184(9): 5038–5046.
- [48] Rothenburg S, Deigendesch N, Dey M, et al. Double-stranded RNA-activated protein kinase PKR of fishes and amphibians: varying the number of double-stranded RNA binding domains and lineage-specific duplications. *BMC Biol*, 2008, 6: 12.
- [49] Hu CY, Zhang YB, Huang GP, et al. Molecular cloning and characterisation of a fish PKR-like gene from cultured CAB cells induced by UV-inactivated virus. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17(4): 353–366.
- [50] Rothenburg S, Deigendesch N, Dittmar K, et al. A PKR-like eukaryotic initiation factor 2alpha kinase from zebrafish contains Z-DNA binding domains instead of dsRNA binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(5): 1602–1607.
- [51] Jiang J, Zhang YB, Li S, et al. Expression regulation and functional characterization of a novel interferon inducible gene *Gig2* and its promoter. *Mol Immunol*, 2009, 46(15): 3131–3140.
- [52] Zhang YB, Gui JF. Identification of two novel interferon-stimulated genes from cultured CAB cells induced by UV-inactivated grass carp hemorrhage virus. *Dis Aquat Organ*, 2004, 60(1): 1–9.