

• 动物及兽医生物技术 •

CHO 细胞表达重组猪干扰素- γ 及其抗病毒活性

王凌云^{1,2}, 郝荣增¹, 杨洋¹, 李亚军¹, 卢炳州¹, 毛玉涵¹, 张越¹, 龚真莉¹, 刘艳红¹, 齐萌², 茹毅^{1*}, 郑海学^{1,2*}

1 中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学 动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室 国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州 730046

2 塔里木大学动物科学与技术学院, 新疆 阿拉尔 843300

王凌云, 郝荣增, 杨洋, 李亚军, 卢炳州, 毛玉涵, 张越, 龚真莉, 刘艳红, 齐萌, 茹毅, 郑海学. 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.

WANG Lingyun, HAO Rongzeng, YANG Yang, LI Yajun, LU Bingzhou, MAO Yuhan, ZHANG Yue, GONG Zhenli, LIU Yanhong, QI Meng, RU Yi, ZHENG Haixue. Recombinant porcine interferon-gamma expressed in CHO cells and its antiviral activity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4784-4795.

摘要: 为利用中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovarian, CHO)细胞表达系统制备重组猪干扰素- γ (recombinant porcine interferon gamma, rPoIFN- γ), 并分析其体外抗病毒活性, 本研究首先构建 rPoIFN- γ 真核表达质粒 pcDNA3.1-PoIFN- γ , 转染悬浮培养的 CHO 细胞, 进行上清分泌表达, 利用亲和层析纯化目的蛋白, 并进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定; 通过 CCK-8 实验分析 rPoIFN- γ 对细胞的毒性, 用 VSV/PK-15 系统检测其抗病毒活性效价; 最后分析 rPoIFN- γ 对塞内卡病毒 A (Seneca virus A, SVA) 的抗病毒活性及其对细胞内干扰素刺激基因(interferon-stimulated genes, ISGs)和细胞因子的诱导作用。结果显示, 本研究利用 CHO 悬浮细胞表达系统成功制备了纯化的 rPoIFN- γ , 该 rPoIFN- γ 对细胞无毒性, VSV/PK-15 系统检测其活性效价为 5.59×10^7 U/mg; 此外, rPoIFN- γ 可诱导细胞内多种 ISGs 和细胞因子的表达, 并显著抑制 SVA 的复制。总之, 本研究成功利用 CHO 表达系统制备了高活性的 rPoIFN- γ , 并在体外完成其对 SVA 的抗病毒作用分析, 为 rPoIFN- γ 的功能及抗病毒制剂的研究提供了实验材料和基础。

关键词: 猪干扰素- γ ; 塞内卡病毒 A; 中国仓鼠卵巢(CHO)细胞; 蛋白表达与纯化; 抗病毒活性

资助项目: 甘肃省科技重大专项计划(21ZD3NA001-1); 中国农业科学院所级重点任务(CAAS-ASTIP-JBGS-20210401); 中国农业科学院兰州兽医研究所所级基本科研业务费(1610312021013, 1610312022009)

This work was supported by the Key Project for Science and Technologies Research of Gansu Province (21ZD3NA001-1), the Key Scientific Research Tasks for Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-JBGS-20210401), and the Basic Scientific Research Business Expenses Budget Incremental Projects of Lanzhou Veterinary Research Institute, the Chinese Academy of Agricultural Sciences (1610312021013, 1610312022009).

*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Haixue, zhenghaixue@caas.cn; RU Yi, ruyi@caas.cn

Received: 2022-12-13; Accepted: 2023-04-26; Published online: 2023-06-29

Recombinant porcine interferon-gamma expressed in CHO cells and its antiviral activity

WANG Lingyun^{1,2}, HAO Rongzeng¹, YANG Yang¹, LI Yajun¹, LU Bingzhou¹, MAO Yuhan¹, ZHANG Yue¹, GONG Zhenli¹, LIU Yanhong¹, QI Meng², RU Yi^{1*}, ZHENG Haixue^{1,2*}

1 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, National Foot-and-mouth Disease Reference Laboratory, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

2 College of Animal Science and Technology, Tarim University, Alra 843300, Xingjiang, China

Abstract: The aim of this study was to produce recombinant porcine interferon gamma (rPoIFN- γ) by Chinese hamster ovarian (CHO) cells expression system and to analyze its antiviral activity. Firstly, we constructed the recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-PoIFN- γ and transfected into suspension cultured CHO cells for secretory expression of rPoIFN- γ . The rPoIFN- γ was purified by affinity chromatography and identified with SDS-PAGE and Western blotting. Subsequently, the cytotoxicity of rPoIFN- γ was analyzed by CCK-8 test, and the antiviral activity of rPoIFN- γ was evaluated using standard procedures in VSV/PK-15 (virus/cell) test system. Finally the anti-Seneca virus A (SVA) of rPoIFN- γ activity and the induction of interferon-stimulated genes (ISGs) and cytokines were also analyzed. The results showed that rPoIFN- γ could successfully expressed in the supernatant of CHO cells. CCK-8 assays indicated that rPoIFN- γ did not show cytotoxicity on IBRS-2 cells. The biological activity of rPoIFN- γ was 5.59×10^7 U/mg in VSV/PK-15 system. Moreover, rPoIFN- γ could induced the expression of ISGs and cytokines, and significantly inhibited the replication of SVA. In conclusion, the high activity of rPoIFN- γ was successfully prepared by CHO cells expression system, which showed strong antiviral activity on SVA. This study may facilitate the investigation of rPoIFN- γ function and the development of novel genetically engineered antiviral drugs.

Keywords: porcine interferon γ ; Seneca virus A; Chinese hamster ovarian (CHO) cells; expression and purification of protein; antiviral activity

干扰素(interferon, IFN)是一种具有抗病毒、抗肿瘤、抗寄生虫和免疫调节等生物学功能的细胞因子^[1],是机体在受到病毒、细菌内毒素以及其他诱生剂的刺激下,受体细胞分泌的一种糖蛋白。根据基因序列、受体特异性以及染色体定位的不同,IFN 主要分为 3 种类型,即I型、II型和III型^[2]。I型 IFN 主要包括 IFN- α 、 β 、 δ 、 φ 、 ϵ 、 ω 、 τ 、 ζ ^[3]亚型;II型 IFN 为 IFN- γ ^[2],主要由活化的 T 细胞和自然杀伤(natural killer, NK)细胞产生;III型 IFN 功能以抗病毒作用为主,包括

IFN- λ 1 (IL-29)、 λ 2 (IL-28a)、 λ 3 (IL-28b)和 λ 4^[4-5]。

IFN- γ 于 1965 年首先在植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)刺激的白细胞培养上清中被发现^[6],主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生,是可溶性二聚体细胞因子,同时也是 II 型 IFN 的唯一成员。IFN- γ 对于机体抵抗病毒、细菌和原生生物感染,以及调节先天性和适应性免疫至关重要,其异常表达与很多炎症和自身免疫疾病相关。除了直接抑制病毒复制,IFN- γ 对免疫系统的重要性更体现在其免疫

刺激和免疫调控功能方面^[7-8]。猪 IFN- γ (porcine interferon gamma, PoIFN- γ)是由 166 个氨基酸残基组成的前体蛋白,其中信号肽为 23 个氨基酸,可引导 IFN- γ 分泌到细胞外,在胞外切去信号肽后成为成熟的 IFN- γ ,包含 143 个氨基酸,分子量约为 17 kDa,其天然活性状态为同源二聚体蛋白^[9]。PoIFN- γ 与人 IFN- γ 基因编码序列具有 75% 的同源性,氨基酸序列同源性为 59%。IFN- γ 由于具有强大的免疫调节功能,已被广泛应用于预防多种感染相关的疾病,包括癌症、真菌感染和慢性肉芽肿性疾病^[10-11]。

目前,通过基因工程制备的重组人 IFN 已实现商品化,如重组人 IFN- α 2b,该药品被用于治疗急慢性病毒性肝炎、尖锐湿疣、恶性黑色素瘤等疾病,重组人 IFN 对于治疗恶性肿瘤、肝纤维化、系统性硬皮病等也有很好的效果^[12]。重组 IFN 通过诱导多种干扰素刺激基因(interferon-stimulated genes, ISGs)表达,抑制病毒 DNA 和 RNA 的合成,进而抑制病毒复制,发挥抗病毒作用。利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达的 rPoIFN- γ 和 rPoIFN- α 可以抑制非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)在细胞内的复制,并诱导细胞内干扰素诱导蛋白与四肽重复 1 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1 gene, IFIT1)和干扰素诱导的跨膜蛋白 3 (interferon-induced transmembrane protein 3, IFITM3)等多种 ISGs 及主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)分子的产生^[13]。rPoIFN 还具有疫苗佐剂的功能,如 rPoIFN- α 作为疫苗佐剂可以提高疫苗效力,降低猪繁殖与呼吸综合征的发病率^[14]。目前,已批准的兽用 IFN 产品有重组犬 α -IFN (冻干剂)、猪白细胞 IFN 等。猪白细胞 IFN 是鸡新城疫病毒接种健康猪后,由猪体内分泌产生,并经过一系列分离、提纯工艺制成,是一种复杂的混

合物,虽具有毒性低、抗原性弱和生物活性高的优点,但是难以大规模生产、制作工艺复杂且成本较高。研究人员现多利用基因工程技术体外表达制备重组 IFN,以期获得高活性和大量表达,为 IFN 的工业化量产奠定基础。本研究利用 CHO 细胞表达系统制备具有高效生物活性的 rPoIFN- γ ,并以塞内卡病毒(Seneca virus A, SVA)为模式病毒分析其体外抗病毒活性,为 rPoIFN- γ 的功能研究和猪传染病防控制剂的开发提供材料和基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株和主要试剂

猪肾上皮细胞(PK-15 细胞)、猪肾细胞(IBRS-2 细胞)、真核表达载体 pcDNA3.1(+)、水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)及 SVA (CH/FJ/2017)均由中国农业科学院兰州兽医研究所 WOA/H/国家口蹄疫参考实验室保存;ExpiCHO 表达系统试剂盒购自 Thermo Fisher 公司;限制性内切酶 *Hind* III、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;Trans 5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术股份有限公司;RNA 提取试剂盒和 DNA 凝胶纯化回收试剂盒购自 Omega 公司;蛋白 Marker、His-Tag 单克隆抗体和 BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo Fisher 公司;重组 PoIFN 对照品购自 R&D systems 公司;镍离子亲和层析柱购自 GE 公司;DMEM 细胞培养基购自中科迈晨(北京)科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 SIGEMA 公司;质粒提取试剂盒购自 Macherey-Nagel 公司;反转录试剂盒和定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;抗 SVA VP2 蛋白多克隆抗体、抗猪 IFN- γ 单克隆抗体均由本实验室制备并保存。

1.2 重组表达质粒的构建和鉴定

根据 PoIFN- γ 基因序列(GenBank 登录号: NP_999113.1)设计真核表达质粒,在基因开放阅读框 5'端引入信号肽序列,在 3'端引入 His 标签,进行 CHO 密码子优化,在目的基因两端分别引入 *Hind* III 和 *Xho* I 内切酶位点,由华大基因科技有限公司合成目的基因片段。将合成基因片段和载体质粒分别用 *Hind* III 和 *Xho* I 进行双酶切、琼脂糖凝胶电泳纯化回收目的片段, T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接,构建的重组质粒命名为 pcDNA3.1-PoIFN- γ , 重组质粒进行酶切鉴定和测序鉴定。

1.3 重组蛋白的表达、纯化和鉴定

将重组质粒 pcDNA3.1-PoIFN- γ 和对照质粒分别转染 ExpiCHO 悬浮细胞,将转染后的细胞置于 32 °C、5% CO₂、湿度 90%条件下继续悬浮培养 12 d 后, 4 000×g 离心 10 min 收集细胞培养上清,进行 SDS-PAGE 鉴定。将收集的细胞培养上清用 0.22 μ m 滤膜过滤,按说明书进行镍离子亲和层析柱纯化。纯化后的样品经 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定,并用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

1.4 rPoIFN- γ 的细胞毒性检测

按照 CCK-8 试剂盒使用说明进行操作,将 IBRS-2 细胞按照 5×10^3 个细胞/孔接种到 96 孔细胞培养板中,待其贴壁生长后,分别添加不同浓度的 rPoIFN- γ 刺激 IBRS-2 细胞,24 h 后加入 CCK-8 溶液,4 h 后用酶标仪检测 OD₄₅₀,计算相对细胞活率。

1.5 rPoIFN- γ 的抗病毒活性效价测定

基于 VSV/PK-15 系统,采用细胞病变抑制法(cytopathic effect inhibition, CPEI)测定 rPoIFN- γ 的抗病毒活性效价。将 PK-15 细胞铺于 96 孔细胞培养板至单层后,加入 4 倍连续倍比稀释的

rPoIFN- γ , 每一稀释度设置 8 孔重复,37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 之后,弃上清。每孔加入 100 TCID₅₀ 的 VSV,同时设置正常细胞对照组(NC)和病毒感染的阳性对照组(PC),病毒接种 24 h 后观察细胞病变(cytopathic effect, CPE)情况。采用 Reed-Muench 法计算 rPoIFN- γ 的活性效价。

1.6 rPoIFN- γ 抗 SVA 的活性测定

将 rPoIFN- γ 和商品化的 rPoIFN- γ 分别进行 10 倍倍比稀释,每个稀释度 8 个重复,同时设置 NC 和 PC 组,37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 之后接种 SVA;接种后 24 h 观察细胞 CPE 情况。采用 Reed-Muench 法计算 rPoIFN- γ 的抗 SVA 的活性效价;另外,同上述方法处理细胞后接种 SVA,进行 CCK-8 检测,计算不同稀释度 rPoIFN- γ 对细胞的抗病毒保护作用。

1.7 rPoIFN- γ 对 SVA 复制的影响

将 IBRS-2 细胞接种至 12 孔细胞板,每孔 5×10^4 个细胞,在 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养至单层,按 10^{-2} – 10^{-11} 连续 10 倍稀释的 rPoIFN- γ 预处理细胞,分别接种 100 TCID₅₀ 的 SVA,吸附 1 h 后弃掉病毒液,加入维持培养基,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,同时设置 NC 和 PC 组。收集上清和细胞,进行 TCID₅₀ 测定分析 rPoIFN- γ 处理对病毒滴度的影响;Western blotting 分析 rPoIFN- γ 处理对 SVA VP2 蛋白表达水平的影响;另外,提取病毒 RNA,进行实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测病毒 RNA 水平,RT-qPCR 反应体系:总体积 20 μ L,包括 10 μ mol/L 的上下游引物和荧光标记探针各 0.4 μ L, 2×One Step RT-PCR Buffer III 10 μ L, TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μ L) 0.4 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μ L, 90 ng 的 RNA 2 μ L, RNase Free dH₂O 5.6 μ L。反应条件

为: 42 °C 5 min, 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 个循环。其中 RT-qPCR 的引物和探针序列为: 上游引物 5'-ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA-3', 下游引物 5'-GCGAGTCCTGCCACGGA-3', 荧光标记探针 5'-FAM-TCCTTTGCACGCCGTGGGAC-TAMRA-3'。另外将 10^{-3} 稀释度 rPoIFN- γ 预处理细胞后接种病毒, 分别在感染后 8-48 h 收取细胞和上清; 用 RT-qPCR 和 Western blotting 分析在不同时间对病毒 RNA 复制和蛋白表达的影响, RT-qPCR 反应体系和条件同上所述。

1.8 rPoIFN- γ 诱导细胞 ISGs 和细胞因子的测定

将 IBRS-2 细胞按照 5×10^5 个细胞/mL 铺入 35 cm 细胞培养皿, 待细胞长成单层后, 用 10^{-2} 稀释度的 rPoIFN- γ 处理细胞 24 h, 未经 IFN 处理的细胞作为阴性对照 (NC)。提取细胞总 RNA, 反转录 cDNA, 通过 RT-qPCR 检测 ISGs 和细胞因子的相对表达水平。RT-qPCR 引物见表 1, 其中部分引物序列参考自文献[13]。

1.9 数据统计和分析

所有数据通过 GraphPad Prism 8 软件作图, 试验数据通过 GraphPad Prism 8 软件中配对样品 *t* 检验或单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) 计算, 所有实验数据为 $\bar{x} \pm s$ ($n \geq 3$), $P < 0.01$ 被认为有显著性差异, 表明结果具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的鉴定

将重组质粒 pcDNA3.1-PoIFN- γ 用 *Hind* III 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定, 1% 的琼脂糖凝胶电泳后观察到约 5 300 bp 和 730 bp 的 2 条 DNA 条带, 片段大小与预期相符合 (图 1)。基因测序结果也表明, 目的基因序列插入正确。

表 1 本研究所用引物

Table 1 The primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
PKR-F	ATTGCGAGAAGGTAGAGCGT
PKR-R	TTCCATTTGGATGAAAAGGCACC
IFIT1-F	CTGACTCACAGCAACCATG
IFIT1-R	CTTTCAGGTGTTTCACATAGG
BST2-F	GTACACCGTTTGCAACCAGAC
BST2-R	CTGTTGTCTCTCTGAACGCC
IFITM3-F	GTCGTCTGGTCCCTGTTCAAC
IFITM3-R	GAGTAGGCGAAAGCCACGAA
MHC-I-F	GGCTCCAGAAATACCTGCAGAT
MHC-I-R	TCTCCACCAGCTCCATGTCTTG
MHC-II-F	ACCACAACCTCCTGGTCTGCTCT
MHC-II-R	CTCTCCACTCTGAGGAACCGTT
GBP1-F	GAAGGGTGACAACCAGAACGAC
GBP1-R	AGGTTCCGACTTTGCCCTGATT
IL-8-F	TTCCTGCTTTCTGCAGCTCTCT
IL-8-R	GGGTGGAAAGGGTGTGGAATG
IFN- β -F	AGTTGCCTGGGACTCCTCAA
IFN- β -R	CCTCAGGGACCTCAAAGTTCAT
Viperin-F	GGACACTGGTACCTGTCACCTT
Viperin-R	TGAAGTGGTAATTGACGCTAGT
IRF1-F	GCAACAGATGAGGACGAG
IRF1-R	GCTTTCAACTTCTGGCTC
NF- κ B-F	TCCAACACCCGATAAACC
NF- κ B-R	TAAAGCTCACCCGCAACG
IL10-F	GCCTTGTCAGAGATGATCCAGTT
IL10-R	TTCTCCCCAGGGAGTTCAC
TNF-a-F	GGCTGCCTTGGTTCAGATGT
TNF-a-R	CAGGTGGGAGCAACCTACAGTT
ISG15-F	GACTGCATGATGGCATCGGA
ISG15-R	TGCACCATCAACAGGACCAT
CXCL10-F	TGCCACATGTTGAGATCAT
CXCL10-R	CGGCCCATCCTTATCAGTAG
OASL-F	TCCCTGGGAAGAATGTGCAG
OASL-R	CCCTGGCAAGAGCATAGTGT
Mx1-F	TACGACATCGAATACCAGATCAA
Mx1-R	ATGGTCCTGTCTCCTTCGG
β -actin-F	GACCTGACCGACTACCTCAT
β -actin-R	CGTAGAGGTCCTTCCTGATGT

2.2 rPoIFN- γ 的表达、纯化和鉴定

收取转染重组质粒 pcDNA3.1-PoIFN- γ 的细胞上清, 进行 SDS-PAGE 鉴定。结果显示, 在 27 kDa 左右观察到特异性蛋白条带, 大小与

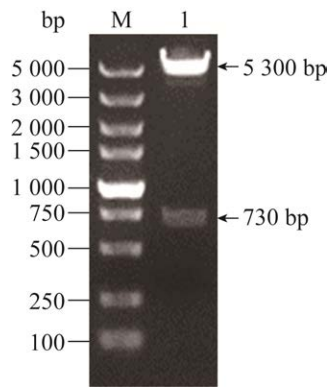


图1 重组表达质粒的酶切鉴定

Figure 1 Identification of the recombinant expressing plasmid by double enzyme digestion. M: DL5000 DNA marker; 1: Enzyme digestion products of pcDNA 3.1-PoIFN- γ .

理论值相符(图 2A)。表达蛋白上清经过滤后上样, 使用镍离子亲和层析柱纯化 rPoIFN- γ , 洗脱样品经 SDS-PAGE 鉴定, 在 27 kDa 位置可见特异性蛋白条带(图 2B)。分别使用 PoIFN- γ 抗体和抗 His-tag 抗体分析纯化的 rPoIFN- γ , 在约 27 kDa 位置可观察到特异性蛋白条带, 并且大小与理论值相符(图 2C)。

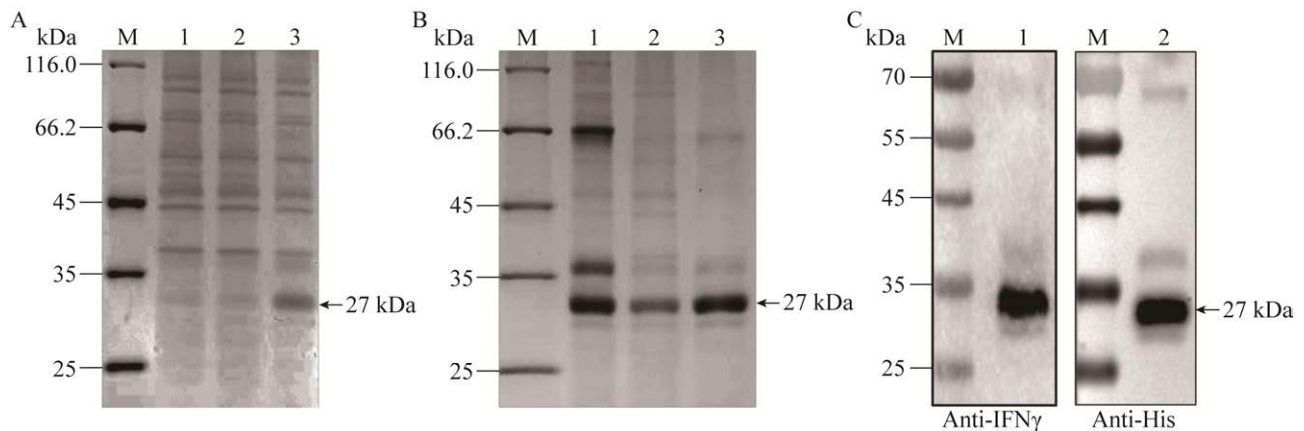


图2 rPoIFN- γ 的表达、纯化和鉴定

Figure 2 Analysis of the expression, purification and identification of rPoIFN- γ . A: SDS-PAGE analysis of rPoIFN- γ expression in CHO cells. M: Protein marker; 1: Blank control; 2: Transfection with pcDNA3.1 vector plasmid; 3: Transfection of pcDNA3.1-PoIFN- γ . B: SDS-PAGE analysis of rPoIFN- γ purification. M: Protein marker; 1: Cell supernatant after filtration; 2: Flow sample; 3: Elution sample. C: Western blotting analysis of rPoIFN- γ . M: Protein marker; 1: Anti-PoIFN- γ antibody; 2: Anti-His-tag antibody.

2.3 rPoIFN- γ 对细胞的毒性分析

不同浓度的 rPoIFN- γ 处理 IBRS-2 细胞对细胞活力的影响结果显示, 与未经过 rPoIFN- γ 处理的对照细胞相比, 各浓度 rPoIFN- γ 处理 IBRS-2 细胞 24 h 后, 细胞相对活力无显著差异, 表明本研究制备的 rPoIFN- γ 对细胞不存在明显的毒性作用(图 3)。

2.4 rPoIFN- γ 活性效价

根据 Reed-Muench 法计算结果, 用 VSV/PK-15 系统检测 rPoIFN- γ 的活性效价可达 5.59×10^7 U/mg。

2.5 rPoIFN- γ 对 SVA 的抗病毒活性

CCK-8 检测结果显示, 本研究制备的 rPoIFN- γ 稀释至 10^{-4} 对 SVA 感染 IBRS-2 细胞具有半数保护作用(图 4), 随着稀释度的增加对细胞的抗病毒保护作用逐渐减弱, 而商品化 rPoIFN- γ -RD 对照品在此稀释度对 SVA 的感染保护作用低于 50% (图 4)。根据 Reed-Muench 法计算结果, 本研究制备的 rPoIFN- γ 抗 SVA 的活性效价为 6.87×10^6 U/mg。

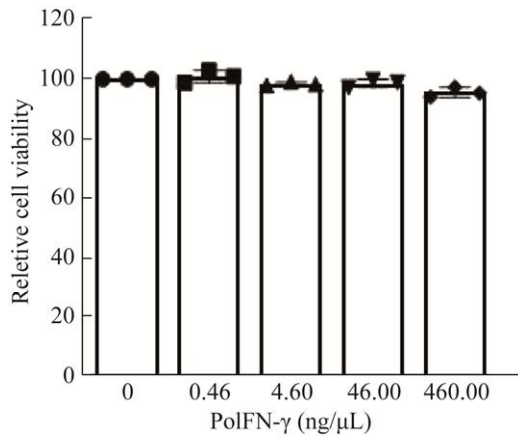


图3 不同浓度 rPoIFN- γ 对 IBRS-2 细胞活力的影响

Figure 3 Cell viability after different concentrations of rPoIFN- γ treated IBRS-2 cells.

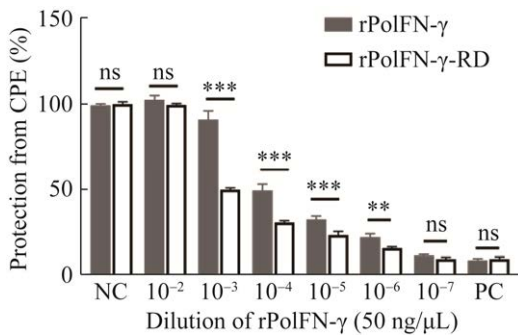


图4 rPoIFN- γ 对 SVA 的抗病毒作用

Figure 4 Antiviral activity of rPoIFN- γ against SVA. NC: Negative control of uninfected cells; PC: Virus infected cells of positive control. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: No significant difference.

2.6 rPoIFN- γ 显著抑制 SVA 的复制

用 10^{-2} – 10^{-4} 稀释度的 rPoIFN- γ 处理细胞后接种 SVA 未出现明显病变, 而在 10^{-5} – 10^{-10} 稀释度时, 细胞出现明显的 CPE, 且细胞病变程度随着 rPoIFN- γ 稀释倍数的增加而加重(结果未呈现)。病毒滴度测定结果表明, 与 PC 组相比, 10^{-2} – 10^{-6} 稀释度 rPoIFN- γ 处理细胞后, 病毒滴度均显著降低(图 5A); RT-qPCR 结果显示, 与 PC 组相比, rPoIFN- γ 的 10^{-2} – 10^{-5} 稀释度处

理细胞, 病毒 RNA 水平被显著抑制(图 5B); 蛋白表达检测结果表明 10^{-2} – 10^{-5} 稀释度的 rPoIFN- γ 处理细胞后均显著抑制了 SVA 的 VP2 蛋白表达(图 5C)。

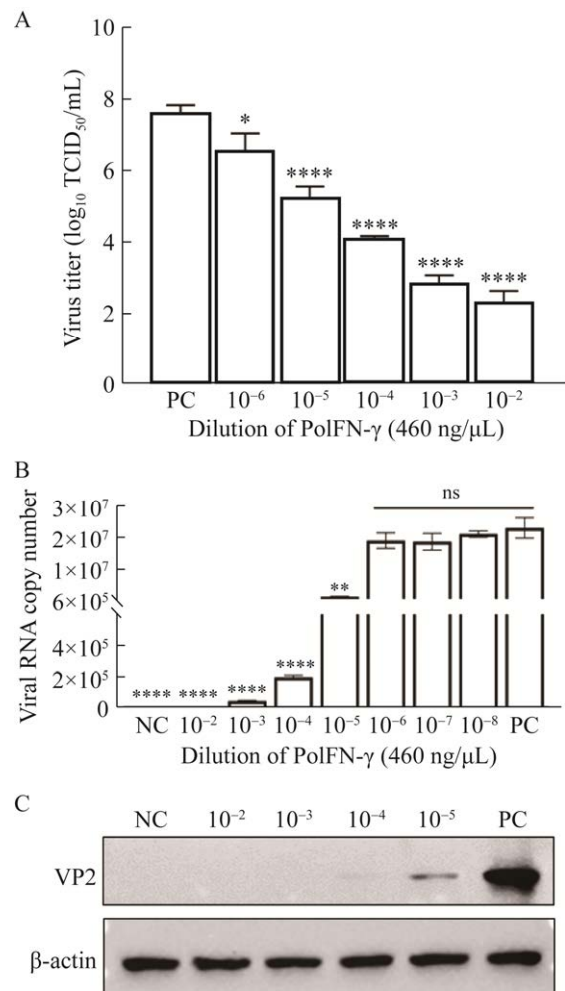


图5 不同剂量的 rPoIFN- γ 对 SVA 复制的影响

Figure 5 Antiviral activity of rPoIFN- γ in different concentration against replication of SVA. A: Antiviral activity of rPoIFN- γ against viral titer of SVA. B: Antiviral activity of rPoIFN- γ against RNA replication of SVA. C: Antiviral activity of rPoIFN- γ against VP2 protein expression of SVA. NC: Negative control of uninfected cells, PC: Virus infected cells of positive control. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.0001$; ns: No significant statistically difference.

另外, 在 rPoIFN- γ 处理 IBRS-2 细胞后接种 SVA, 感染后不同时间点的病毒 RNA 水平检测结果显示(图 6A), 至感染后 24 h, rPoIFN- γ 处理细胞的病毒 mRNA 水平几乎没有升高, 而接种后 32-48 h 病毒 mRNA 水平也显著低于对照组, 这表明该剂量的 rPoIFN- γ 能够有效抑制 SVA 的 RNA 复制。Western blotting 结果也显示, 至感染后 40 h 病毒 VP2 蛋白的表达被显著抑制(图 6B)。

2.7 rPoIFN- γ 诱导细胞 ISGs 和细胞因子的表达

用 rPoIFN- γ 处理 IBRS-2 细胞 24 h, 细胞

中 17 种 ISGs 和细胞因子的表达均显著升高(图 7), 表明本研究制备的 rPoIFN- γ 可有效诱导细胞中 ISGs 和细胞因子的产生从而发挥抗病毒作用。

3 讨论

天然免疫是宿主的第一道免疫屏障, 当病毒感染宿主细胞后能够刺激机体产生 IFN 等细胞因子。IFN 是宿主抵抗病原体侵入的重要细胞因子, 能够识别细胞 IFN 受体, 激活 IFN 信号通路, 诱导 ISGs 的表达从而发挥抗病毒作用^[15]。IFN- γ 是哺乳动物 II 型 IFN 的唯一成员, 在防

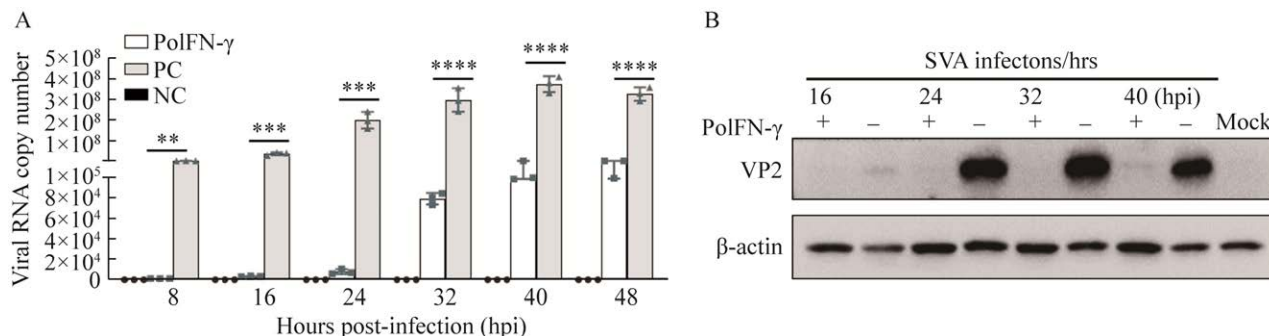


图 6 rPoIFN- γ 在不同时间对 SVA RNA 复制的影响
 Figure 6 Antiviral activity of rPoIFN- γ against SVA in different hours post inoculation. A: Antiviral activity of rPoIFN- γ against RNA replication of SVA. NC: Negative control of uninfected cells; PC: Virus infected cells of positive control. B: Antiviral activity of rPoIFN- γ against VP2 protein expression of SVA. Mock: Uninfected cells of negative control. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

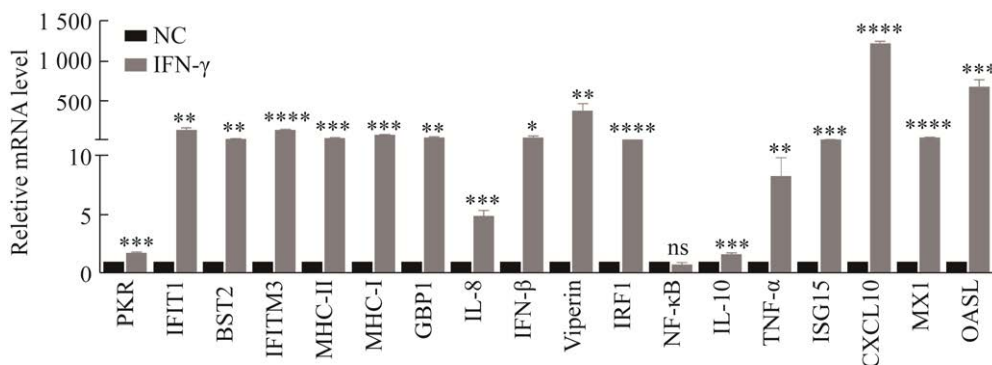


图 7 rPoIFN- γ 诱导细胞 ISGs 的表达
 Figure 7 ISGs and cytokines expression in IBRS-2 cells induced by rPoIFN- γ . NC: Non-treated cells control. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: No significant difference.

御病原体感染过程中起着重要作用^[16]，其又称为免疫干扰素，是细胞免疫的中枢效应因子，能够增强宿主免疫细胞活性，具有免疫和抗病毒功能。它可以通过抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs)通过同源 T 细胞相互作用增强抗原识别来扩增抗原提呈，增加活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮中间体(reactive nitrogen intermediates, RNIS)的产生，诱导抗病毒应答^[16]。同时，IFN- γ 不仅可以诱导 MHC I 类分子表达量大幅度增加，并且对 MHC II 类分子也具有明显的调节作用^[17]，增强细胞抗原递呈能力是 IFN- γ 最主要的免疫调节作用^[18]。因此，IFN- γ 被认为是先天性和适应性免疫调节的关键分子之一^[16]。

SVA 是小 RNA 病毒科(Picornaviridae)塞内卡病毒属(*Senecavirus*)的唯一成员^[19]。主要感染猪，公猪、母猪及各个阶段猪群均易感，潜伏期一般为 4–5 d。SVA 对母猪和育肥猪的致病力较小，而对新生仔猪致病力强，主要影响 1–4 日龄的仔猪，大约 4%–60% 的感染仔猪腹泻持续时间为 1–5 d^[20]。目前，SVA 疫苗仍处于研发阶段，Yang 等^[21]研制的灭活疫苗，具有良好的保护作用；Sharma 等^[22]利用反向遗传学方法研制了 SVA rSVAm SacII 减毒活疫苗，单剂量的减毒活疫苗对异源性 SVA 攻击具有保护作用；魏婷等^[23]成功构建了 SVA P12A-3C 基因的真核表达质粒并在小鼠免疫中初步证实该表达质粒能够诱导动物机体产生一定的免疫反应。虽然关于 SVA 疫苗的研究已取得一定的进展，但目前仍没有商业化的 SVA 疫苗，因此，研制抗病毒制剂以快速抵抗 SVA 感染尤为重要。研究显示，rPoIFN- γ 可以明显抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)在巨噬细胞上的复制，在抗猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)的细胞

免疫中也能发挥重要作用，同时，还对猪囊虫疫苗有良好的免疫佐剂作用^[24-25]。此外，利用 HEK293T 表达的 E2-IFN- γ 融合蛋白增强了猪瘟病毒 E2 蛋白的免疫原性，还可以激活信号传导及转录激活子 1 (signal transducer and activator of transcription 1, STAT1) 的磷酸化^[26]。

PoIFN- γ 在天然状态下是同源二聚体的结构，并且在此结构下具有更高的生物活性。Farrar 等^[27]用大肠杆菌表达系统制备重组 IFN- γ 时，产物不具有活性，通过对产物的变性再复性后才能检测到抗病毒作用。随着基因工程技术的发展，体外表达 rPoIFN- γ 进行免疫增强和抗病毒作用的研究日益增多。万建青等^[28]和姚清侠等^[29]利用毕赤酵母成功表达 rPoIFN- γ ，同时对 PRRSV、VSV 具有较强抗病毒作用；姚清侠等^[30]利用重组逆转录病毒载体成功表达 rPoIFN- γ ，用其处理 PK-15 细胞后，发现细胞可以抵抗口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)感染；秦立廷等^[31]利用 AcNPV 杆状病毒表达系统成功表达 rPoIFN- γ ，抗病毒活性试验显示，rPoIFN- γ 能够有效抑制 VSV 在 PK-15 细胞上的复制；Kim 等^[32]利用重组腺病毒表达的 PoIFN- α , γ 和多个小干扰 RNA 联合治疗对猪 FMDV 具有较强的保护作用。目前常用制备重组蛋白的方法主要有真核表达系统、酵母表达系统、大肠杆菌表达系统和乳酸菌表达系统等，大肠杆菌表达的重组蛋白经常是以包涵体形式存在，不利于重组 IFN 的临床应用^[33]；昆虫细胞杆状表达系统成本高、蛋白表达量低、不能连续表达异源蛋白^[34]。研究表明，CHO 表达系统表达的蛋白的空间结构和生物活性更接近天然蛋白，并且易于纯化^[35]。而前期已利用 CHO 细胞表达系统成功制备了 rPoIFN- $\alpha 6$ 和 rPoIFN- β ，具有较高的活性效价并评估了其对抗 FMDV 的抗病毒活性^[36-37]。

CHO 表达系统制备的重组 IFN 的优势不仅在于较高密度培养、高产表达和易纯化,而且具有较高的活性效价。本研究采用 CHO 细胞表达系统制备的 rPoIFN- γ 用 VSV/PK-15 系统检测活性效价为 5.59×10^7 U/mg, 显著高于秦立廷等^[31]利用 AcNPV 杆状病毒表达系统表达 rPoIFN- γ 在 VSV/PK-15 系统的活性效价 2×10^4 IU/mL; 万建青等^[28]利用毕氏酵母表达系统制备的 rPoIFN- γ 在 VSV/MDBK 系统的活性效价为 450–540 U/mL; 姚清侠等^[30]利用重组逆转录病毒载体 pLXSN 表达的 rPoIFN- γ 利用 VSV/MDBK 系统检测 48 h 的活性效价为 $1\ 200$ IU/ 10^6 cells。本研究进一步分析了 rPoIFN- γ 对 SVA 的抗病毒作用, 结果显示该 rPoIFN- γ 对 SVA 的病毒滴度、病毒 RNA 水平和病毒蛋白表达均有显著的抑制作用, 这表明本研究制备的 rPoIFN- γ 在体外具有很好的抗病毒活性。

IFN- γ 表达产物通过特定信号转导通路, 刺激 ISGs 和细胞因子的转录, 促进机体合成多种具有阻断病毒复制功能的抗病毒酶和蛋白质, 来抵抗病毒对机体细胞的感染^[38]。此外, 在感染过程中, IFN- γ 还通过 FAS-FASL 和 BIM 介导的, 由 STAT1 信号通路诱导的凋亡调节细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应^[38]。因此, 本研究进一步分析了本研究制备的 rPoIFN- γ 对细胞 ISGs 和细胞因子的诱导作用, 结果显示 rPoIFN- γ 显著刺激了重组人 CXC 趋化因子配体 10 (CXC chemokine ligand-10, CXCL10) 等 17 种 ISGs 和细胞因子的产生, 这进一步证明本研究制备的 rPoIFN- γ 具有较高的生物活性, 并能有效地激活下游特定信号转导通路, 从而抑制病毒复制并对 SVA 发挥抗病毒作用。

4 结论

本研究首次采用 CHO 细胞表达系统成功

制备了 rPoIFN- γ , 该 rPoIFN- γ 可以诱导宿主细胞 ISGs 及细胞因子的产生, 并对 SVA 发挥显著的抗病毒作用, 本研究结果为进一步开发重组 PoIFN 类生物制剂及相关抗病毒免疫制剂提供了基础。

REFERENCES

- [1] GRESSER I. Interferon: an unfolding tale[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2007, 27(6): 447-452.
- [2] PESTKA S, KRAUSE CD, WALTER MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 202(1): 8-32.
- [3] LEVY DE, MARIE IJ, DURBIN JE. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection[J]. *Current Opinion in Virology*, 2011, 1(6): 476-486.
- [4] KOTENKO SV. IFN- λ s[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2011, 23(5): 583-590.
- [5] PROKUNINA-OLSSON L, MUCHMORE B, TANG W, PFEIFFER RM, PARK H, DICKENSHEETS H, HERGOTT D, PORTER-GILL P, MUMY A, KOHAAR I, CHEN S, BRAND N, TARWAY M, LIU L, SHEIKH F, ASTEMBORSKI J, BONKOVSKY HL, EDLIN BR, HOWELL CD, MORGAN TR, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene *IFNL4* is associated with impaired clearance of hepatitis C virus[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(2): 164-171.
- [6] WHEELOCK EF. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin[J]. *Science*, 1965, 149(3681): 310-311.
- [7] OSBORNE LC, GEORGIADES JA, JOHNSON HM. Classification of interferons with antibody to immune interferon[J]. *Cellular Immunology*, 1980, 53(1): 65-70.
- [8] LANGFORD MP, WEIGENT DA, GEORGIADES JA, JOHNSON HM, STANTON GJ. Antibody to staphylococcal enterotoxin A-induced human immune interferon (IFN gamma)[J]. *The Journal of Immunology*, 1981, 126(4): 1620-1623.
- [9] VANDENBROECK K, DIJKMANS R, van AERSCHOT A, BILLIAU A. Engineering by PCR-based exon amplification of the genomic porcine interferon-gamma DNA for expression in *Escherichia*

- coli*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991, 180(3): 1408-1415.
- [10] YANG PM, CHOU CJ, TSENG SH, HUNG CF. Bioinformatics and *in vitro* experimental analyses identify the selective therapeutic potential of interferon gamma and apigenin against cervical squamous cell carcinoma and adenocarcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(28): 46145-46162.
- [11] BRAR K, LEUNG DYM. Recent considerations in the use of recombinant interferon gamma for biological therapy of atopic dermatitis[J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2016, 16(4): 507-514.
- [12] 赵广荣. 重组人干扰素的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(12): 1384-1388.
ZHAO GR. Progress in research on recombinant human interferon[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2010, 23(12): 1384-1388 (in Chinese).
- [13] FAN W, JIAO P, ZHANG H, CHEN T, ZHOU X, QI Y, SUN L, SHANG Y, ZHU H, HU R, LIU W, LI J. Inhibition of African swine fever virus replication by porcine type I and type II interferons[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1203.
- [14] MEIER WA, HUSMANN RJ, SCHNITZLEIN WM, OSORIO FA, LUNNEY JK, ZUCKERMANN FA. Cytokines and synthetic double-stranded RNA augment the T helper 1 immune response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2004, 102(3): 299-314.
- [15] SADLER AJ, WILLIAMS BR. Interferon-inducible antiviral effectors[J]. Nature Reviews Immunology, 2008, 8(7): 559-568.
- [16] JIANG J, GU J, ZHAN A, MAO M, LIU Y, WANG H, MAO Y. Cloning, exogenous expression and function analysis of interferon- γ from *Gadus macrocephalus*[J]. Viruses, 2022, 14(10): 2304.
- [17] SCHRODER K, HERTZOG PJ, RAVASI T, HUME DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2004, 75(2): 163-189.
- [18] BILLIAU A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis[M]//Advances in Immunology. Amsterdam: Elsevier, 1996: 61-130.
- [19] LIU F, WANG Q, HUANG L, WANG N, SHAN H. A 5-year review of *Senecavirus A* in China since its emergence in 2015[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7: 567792.
- [20] SEGALÉS J, BARCELLOS D, ALFIERI A, BURROUGH E, MARTHALER D. *Senecavirus A*[J]. Veterinary Pathology, 2017, 54(1): 11-21.
- [21] YANG F, ZHU Z, CAO W, LIU H, ZHANG K, TIAN H, LIU X, ZHENG H. Immunogenicity and protective efficacy of an inactivated cell culture-derived Seneca Valley virus vaccine in pigs[J]. Vaccine, 2018, 36(6): 841-846.
- [22] SHARMA B, FERNANDES MHV, de LIMA M, JOSHI LR, LAWSON S, DIEL DG. A novel live attenuated vaccine candidate protects against heterologous *Senecavirus A* challenge[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 2660.
- [23] 魏婷, 杨帆, 张伟, 王志芳, 孙晓林, 郑海学. A型塞内卡病毒 P12A-3C 基因真核表达质粒的构建及其免疫效力的研究[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(7): 861-868.
WEI T, YANG F, ZHANG W, WANG ZF, SUN XL, ZHENG HX. Construction of eukaryotic expression plasmid for P12A-3C gene of *Senecavirus A* and immunity experiments in mouse[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(7): 861-868 (in Chinese).
- [24] BAUTISTA EM, MOLITOR TW. IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages[J]. Archives of Virology, 1999, 144(6): 1191-1200.
- [25] SURADHAT S, INTRAKAMHAENG M, DAMRONGWATANAPOKIN S. The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2001, 83(3/4): 177-189.
- [26] ZHANG Y, ZHANG W, CHENG J, LIU X, MIAO S, TAN WS, ZHAO L. Designing a novel E2-IFN- γ fusion protein against CSFV by immunoinformatics and structural vaccinology approaches[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(9): 3611-3623.
- [27] FARRAR MA, SCHREIBER RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor[J]. Annual Review of Immunology, 1993, 11: 571-611.
- [28] 万建青, 吴文学, 夏春. 毕赤酵母表达猪干扰素- γ 基因及其抑制蓝耳病病毒效果[J]. 生物工程学报, 2002, 18(6): 683-686.
WAN JQ, WU WX, XIA C. Expression of porcine interferon- γ gene in *Pichia pastoris* and its effect of inhibiting porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2002, 18(6): 683-686 (in Chinese).

- [29] 姚清侠, 黄勤锋, 曹毅, 司有辉, 钱平, 陈焕春. 猪 γ -干扰素在毕赤酵母中的分泌表达及其抗病毒作用[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(4): 451-455.
YAO QX, HUANG QF, CAO Y, SI YH, QIAN P, CHEN HC. Secreting expression of porcine interferon-gamma in *Pichia pastoris* and its antiviral activity[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2008, 28(4): 451-455 (in Chinese).
- [30] 姚清侠, 刘新文, 钱平, 郭东春, 陈焕春. 携带猪 γ 干扰素基因逆转录病毒载体的构建及其在猪肾细胞 (PK-15) 中的表达[J]. 微生物学报, 2007, 47(1): 141-144.
YAO QX, LIU XW, QIAN P, GUO DC, CHEN HC. Construction of recombinant retroviral vector carrying porcine interferon-gamma and its expression in porcine kidney cells (PK-15)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(1): 141-144 (in Chinese).
- [31] 秦立廷, 王喜军, 胡森, 李志中, 陈伟业, 葛金英, 刘思当, 步志高. 猪 γ -干扰素在重组杆状病毒中的表达及其抗病毒活性的测定[J]. 生物工程学报, 2007, 23(3): 386-391.
QIN LT, WANG XJ, HU S, LI ZZ, CHEN WY, GE JY, LIU SD, BU ZG. Expression of porcine gamma-interferon in recombinant baculovirus and determination of its antiviral activity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(3): 386-391 (in Chinese).
- [32] KIM SM, PARK JH, LEE KN, KIM SK, YOU SH, KIM T, TARK D, LEE HS, SEO MG, KIM B. Robust protection against highly virulent foot-and-mouth disease virus in swine by combination treatment with recombinant adenoviruses expressing porcine alpha and gamma interferons and multiple small interfering RNAs[J]. Journal of Virology, 2015, 89(16): 8267-8279.
- [33] 黄玉欣, 李鹏昊, 王孟月, 吴芑, 刘鹏, 逢文强, 田克恭. 基于重组技术的低毒力高效大肠杆菌原核表达系统的改造与应用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 686-696.
HUANG YX, LI PH, WANG MY, WU P, LIU P, PANG WQ, TIAN KG. Improving *Escherichia coli* prokaryotic expression system with low virulence and high efficiency by recombination technology[J]. Microbiology China, 2021, 48(2): 686-696 (in Chinese).
- [34] 范翠英, 冯利兴, 樊金玲, 果德安, 刘璇. 重组蛋白表达系统的研究进展[J]. 生物技术, 2012, 22(2): 76-80.
FAN CY, FENG LX, FAN JL, GUO DA, LIU X. Recent advances on the expression systems for recombinant protein production[J]. Biotechnology, 2012, 22(2): 76-80 (in Chinese).
- [35] 郑鸣, 边传周, 王老七, 王永芬. 猪干扰素 α 、 β 和 γ 的融合表达及活性[J]. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1840-1847.
ZHENG M, BIAN CZ, WANG LQ, WANG YF. Study on the fusion expression and bioactivity of porcine interferon α , β and γ [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(9): 1840-1847 (in Chinese).
- [36] 张丽伟, 茹毅, 郝荣增, 马坤, 李亚军, 伍春平, 张姣燕, 齐萌, 郑海学. 重组猪干扰素 $\alpha 6$ 的表达及抗口蹄疫病毒活性研究[J]. 中国兽医科学, 2021, 51(10): 1233-1238.
ZHANG LW, RU Y, HAO RZ, MA K, LI YJ, WU CP, ZHANG JY, QI M, ZHENG HX. Expression of recombinant porcine interferon $\alpha 6$ and its antiviral activity against foot-and-mouth disease virus[J]. Chinese Veterinary Science, 2021, 51(10): 1233-1238 (in Chinese).
- [37] 王凌云, 郝荣增, 茹毅, 常辉, 杨洋, 李亚军, 张丽伟, 卢炳州, 刘艳红, 龚真莉, 井波, 齐萌, 郑海学. 重组猪干扰素 β 在 CHO 细胞中的表达及其抗口蹄疫病毒活性的研究[J]. 中国兽医科学, 2023, 53(2): 143-149.
WANG LY, HAO RZ, RU Y, CHANG H, YANG Y, LI YJ, ZHANG LW, LU BZ, LIU YH, GONG ZL, JING B, QI M, ZHENG HX. Expression of recombinant porcine interferon β in CHO cells and study on its activity against foot-and-mouth disease virus[J]. Chinese Veterinary Science, 2023, 53(2): 143-149 (in Chinese).
- [38] GOCHER AM, WORKMAN CJ, VIGNALI DAA. Interferon- γ : teammate or opponent in the tumour microenvironment?[J]. Nature Reviews Immunology, 2022, 22(3): 158-172.

(本文责编 郝丽芳)