

文章编号: 1004-0374(2010)11-1102-05

对虾—病毒互作的分子机制研究

王蔚¹, 章晓波^{2*}

(1 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门361005; 2 浙江大学生命科学院, 杭州310058)

摘要: 白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是危害对虾的主要病原, 给全球水产养殖业带来了巨大经济损失, 但至今仍未发现有效的防治方法。过去10年来, 国内外学者在 WSSV 侵染和对虾抗病毒免疫的研究方面取得了长足的进展, 该文主要介绍这方面的研究进展。

关键词: 对虾; WSSV; 免疫

中图分类号: S945.46; S945.462 **文献标识码:** A

Molecular mechanism of shrimp-virus interaction

WANG Wei¹, ZHANG Xiao-bo^{2*}

(1 Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 2 College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) is a major shrimp pathogen causing large economic losses all over the world. So far, however, there is no efficient approach to control this virus. Recently great progresses have been made in WSSV infection and antiviral immune system of shrimp. This review focuses on these progresses.

Key words: shrimp; WSSV; immunity

病害是制约世界对虾养殖业发展的最主要因素, 尤其是对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV), 已成为对虾养殖中危害最严重的病原。WSSV 是 20 世纪 90 年代初出现的新对虾病毒, 在十多年时间里, 每年都造成很大的危害, 迄今为止, 都没有有效的防治方法。因此, WSSV 的有效防治已成为对虾养殖中最主要的问题。

众所周知, 所有病害的发生和发展都有两个方面的原因: 一是病原体对宿主的侵染因素; 二是宿主本身的抗病与易感因素。两者在一定的环境条件下相互作用影响病害的发生。因此, 进行对虾—病毒互作的分子机制研究, 分别从 WSSV 和对虾两方面入手, 研究 WSSV 与感染、对虾抗病毒免疫相关的功能基因及其调控以及免疫信号转导, 有助于阐明 WSSV 与对虾之间互作的分子基础, 为对虾病害的防治提供理论支撑。本文主要结合我们的工作及国内外学者在对虾免疫与 WSSV 感染研究方面

的进展作一简要概述。

1 WSSV 膜蛋白的研究

1.1 WSSV 病毒感染相关膜蛋白的确定

WSSV 是一种具有双层囊膜的双链 DNA 病毒, 其中囊膜蛋白在病毒吸附与入侵中起着关键作用^[1]。迄今为止, 经免疫电镜等研究确定, VP19、VP24、VP26、VP28、VP68、VP281、VP187、VP466 等 10 多种蛋白质为 WSSV 的膜蛋白。将这些膜蛋白的编码基因重组表达, 利用重组蛋白制备抗体, 我们采用抗体中和试验发现, 膜蛋白 VP28、VP68、VP281、VP466 等的抗体能明显降低 WSSV 感染对虾后的病毒拷贝数和对虾死亡率, 具有中和 WSSV 的作用^[2]。因此, 这些膜蛋白可能在 WSSV 的感染中起重要作用。

收稿日期: 2010-06-02

*通讯作者: E-mail: zxb0812@zju.edu.cn

1.2 WSSV 内部核糖体进入位点(IRES)的鉴定

病毒和真核细胞中除了正常的翻译起始机制外,还存在一种不依赖5'帽子结构的翻译起始机制。在mRNA 5'端非翻译区包含顺式作用元件,这种元件本身无启动子活性,但其却能引导mRNA直接进入核糖体开始不依赖于帽子结构的翻译,这就是由内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)介导的翻译起始,其优点在于将IRES与多个非相关基因连接在一起,可同时转录成一条mRNA,但翻译又是各自独立的,这样就可保证用IRES序列连接的非相关基因各自独立的表达。

我们在研究WSSV的膜蛋白VP28时发现,VP28基因的5'端非编码区有一个小顺反子存在终止密码子。在小顺反子和VP28基因之间有一段长180 bp的核苷酸序列,不编码任何蛋白质。对这段序列进行细胞试验,结果表明,它可引导下游报告基因表达,具有IRES作用。研究显示,该IRES的作用具有方向性,并且全长为180 bp时才能发挥作用,其介导的翻译效率为98.77%^[3]。这是目前已知IRES中最短的,也是第一例海洋DNA病毒中的IRES序列。它具有长度短、效率高的优点,可以广泛用于双顺反子载体的构建。通过构建目的基因与报告基因的共表达载体,提高筛选效率或者用于疾病诊断和治疗;另一方面在蛋白质互作的研究中通过IRES序列将待验证的因子构建成双顺反子转染细胞,可以解决两个重组质粒共转染时表达量差异的问题。

最近报道,台湾大学学者在WSSV的VP31/VP39b基因编码区发现了IRES的存在,这个IRES的活性较弱,但位置特殊。迄今为止发现的大多数IRES都在非编码区,这种新发现的编码区IRES调控机制尚未知晓^[4]。

2 siRNA 在对虾抗病毒中的作用

2.1 RNAi 在对虾病毒基因功能研究中的应用

迄今为止,没有对虾细胞系,也没有适合于培养对虾病毒的细胞。因此,进行对虾抗病毒基因和对虾病毒基因的功能研究十分困难。RNAi的出现,为解决这一困难带来了希望。许多研究证明,RNA干扰在真核生物中可以起到良好的抗病毒效果。

为了尝试RNAi方法是否可用于对虾病毒基因和对虾基因功能的研究以及RNAi在对虾抗病毒方面的效果,2005年,Robalino等^[5]利用体外转录获得长的双链RNA成功地抑制了2个对虾内源基因

hemocyanin基因和CDP基因的表达,同时选择白斑综合征病毒的外壳蛋白VP28、核酸还原酶小亚基和DNA聚合酶的编码基因作为目标基因,利用RNA干扰技术成功地降低了感染WSSV对虾的死亡率。利用长的双链RNA进行实验虽然成功的几率较21~23 bp siRNA大,但也有其局限性。因为长的双链RNA与对虾基因组上的基因具有同源序列的几率增大,在抑制病毒基因表达的同时也可能对寄主本身的基因表达产生抑制效应,即所谓的脱靶效应,对寄主造成不可预知的影响^[6]。

为了解决这些问题,我们选择WSSV感染中起重要作用的VP28基因作为干扰的目的基因,进行RNAi相关试验。在体外合成21 bp的VP28 siRNA后,利用体外注射的方法进行干扰试验。结果发现,VP28 siRNA可以抑制VP28编码基因的转录和表达,而且具有序列特异性。用连续重复注射siRNA的方法,在第一次注射VP28-siRNA后,每隔24 h再注射相同量的VP28-siRNA,在最后一次注射VP28-siRNA后48 h,检测对虾体内病毒的拷贝数,结果如图1所示。随着VP28-siRNA注射次数的增加,WSSV的拷贝数下降,连续注射3次VP28-siRNA后,对虾体内的病毒完全被清除,说明RNAi在对虾体内具有抗病毒效果,这为对虾白斑综合症的防治提供一种新的有效方法^[7],同时建立了用于对虾基因和对虾表达基因功能研究的一种方法。

2.2 对虾利用 siRNA 抵抗 DNA 病毒侵染

众所周知,siRNA是动物抵抗RNA病毒感染的一种重要免疫方式,但是是否可利用siRNA抵抗DNA病毒的侵染,这是个尚未知晓的问题。

根据最近的相关报道,natsiRNA来源于由两个重叠基因形成的天然反义转录产物,该转录产物为DCL2加工形成的24 nt的小RNA,进而在DCL1参与下诱导产生大小为21 nt的natsiRNA^[8]。为了确定对虾体内是否存在siRNA抗病毒途径,根据人工合成的VP28-siRNA能够很好地抑制WSSV在对虾中的感染的特性,我们利用抗病毒的VP28-siRNA作为探针进行Northern Blot分析,结果表明,在WSSV感染48 h后的对虾类淋巴器官中有阳性信号,但没有检测到microRNA的前体,因此该小RNA是一种siRNA;将该siRNA克隆后测序,结果显示为VP28-siRNA。采用WSSV感染对虾,感染后不同时间检测VP28-siRNA,结果表明病毒感染后24 h,在对虾类淋巴器官、血淋巴、腮、心

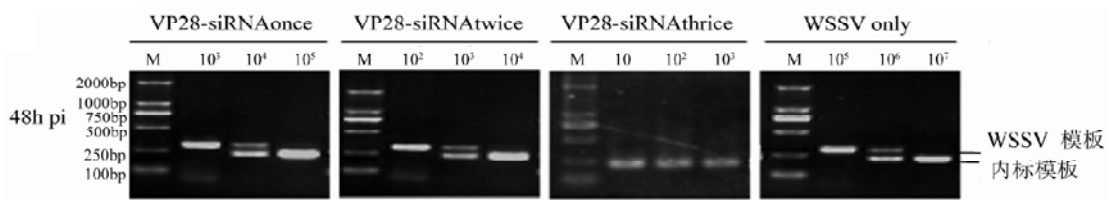


图1 重复注射vp28-siRNA干扰病毒的感染和复制^[7]

脏和胃中均能检测到 VP28-siRNA，而在未感染 WSSV 的对虾的各个组织中均检测不到。因此，我们的研究表明，动物不仅可通过 siRNA 抵抗 RNA 病毒的侵染，同样可通过 siRNA 抵抗 DNA 病毒的感染。

3 对虾免疫反应在抗病毒中的作用

3.1 对虾免疫反应的比较

天然免疫中的凋亡、吞噬和酚氧化酶原系统参与了抗病毒防御，然而迄今为止，对这三种免疫系统的研究主要集中在重要的经济脊椎动物上，凋亡、吞噬和酚氧化酶原系统在无脊椎动物中的抗病毒活性研究较为落后。为此，我们对日本对虾中凋亡、吞噬和酚氧化酶原系统这三种免疫反应在抗病毒感染中作用的重要性进行了比较。

用 cytochalasin B、z-VAD-FMK 和 allylthiourea 这三种特异的抑制剂分别对凋亡、吞噬和酚氧化酶活力进行活体抑制，通过对感染对虾死亡率及其体内 WSSV 拷贝数的跟踪检测，发现凋亡和吞噬的抗病毒活性要高于酚氧化酶系统，说明对无脊椎动物的病毒防御来说，细胞免疫可能有很重要的作用^[9]。

3.2 对虾免疫相关基因在抗病毒中的作用

我们采用抑制差减杂交 (SSH)、差异显示、亲和层析等方法，从抗病对虾获得 70 多个抗病相关基因^[10]。在此基础上，研究重点分析了吞噬相关的小 G 蛋白编码基因 *PjRab* 和 *PjRan*、凋亡相关 *PjCaspase* 基因和酚氧化酶相关基因 *PjQM*。

3.2.1 小 G 蛋白 Rab 和 Ran 在抗病毒吞噬中的作用

通过 3'-RACE 和 5'-RACE 获得对虾 *Rab* 基因 (命名为 *PjRab*) 的 cDNA 全长，其 ORF 为 636 bp，编码 212 个氨基酸。序列分析发现，*PjRab* 具备 Rab 蛋白的基本特征，但在 C-端与已知的 Rab 蛋白不同，可能是一种新的 Rab 蛋白^[11]。

对 *PjRab* 基因进行原核表达，并得到有活性的表达产物。RT-PCR 和 Western Blot 分析发现，*PjRab* 在对虾组织中均有转录和翻译。RT-PCR 分析

发现，在受到病毒刺激后 *PjRab* 基因表达上调，说明 *PjRab* 参与了对虾的免疫过程^[12, 13]。

根据蛋白质相互作用分析发现，*PjRab* 蛋白与对虾白斑综合征病毒的膜蛋白 VP466、肌动蛋白 (actin)、原肌球蛋白 (tropomyosin) 之间存在互作。体内和体外都证明了病毒的膜蛋白 VP466 和 *PjRab*、tropomyosin 以及 actin 之间确实存在互作^[13]。对 VP466-*PjRab*-tropomyosin-actin 这个复合体的功能开展研究，结果发现，其一，VP466 蛋白通过与 *PjRab* 蛋白以及 actin 之间的结合在宿主本身的免疫反应中有重要作用。*PjRab* 基因表达的抑制和上调可控制血细胞的吞噬活性导致病毒拷贝数的下降和上升^[13]。体外体内试验证明，VP466 蛋白可以促进 *PjRab* GTPase 酶活升高。因此，宿主对病毒免疫反应的一条可能途径是，细胞内 *PjRab* 蛋白识别病毒膜蛋白 VP466，与其结合后酶活升高，促进 actin 向有利于吞噬的反方向发生变构，从而提高血细胞吞噬病毒的能力，导致病毒拷贝数的降低。其二，VP466 蛋白通过与 tropomyosin 以及 actin 之间的结合有利于病毒自身的感染。采用 RNAi 分别抑制 *VP466* 和 *tropomyosin* 基因表达时，通过 RT-PCR 分析发现病毒的拷贝数都是下降的，说明了 VP466 和 tropomyosin 蛋白在 WSSV 病毒感染过程中起重要作用。因此，病毒感染的一条可能途径是，病毒膜蛋白 VP466 与细胞骨架蛋白 tropomyosin 及 actin 之间结合，通过骨架蛋白的运动，有利于病毒自身的感染。其三，通过缺失突变发现，VP466 与 *PjRab* 和 tropomyosin 结合的位点在同一结构区域内，说明它们的结合是一种竞争关系，这种竞争会影响到 VP466 是与 tropomyosin 结合而促进病毒自身的感染，还是与 *PjRab* 结合促进宿主的免疫反应。

对虾 *Ran* 基因 (命名为 *PjRan*) cDNA 全长 771 bp，编码的开放阅读框 (ORF) 有 624 bp，预测编码 208 个氨基酸^[14]。对该基因进行重组表达后，GTP 结合试验证明，*PjRan* 蛋白具有 GTP 结合活性，通过昆虫细胞中的表达证明 *PjRan* 蛋白大部分集中在细

胞核。*PjRan*基因在对虾所有组织器官中均可被检测到转录和表达,免疫电镜显示*PjRan*蛋白特异分布于肌肉组织的暗带部分^[15]。

*PjRan*基因在抗病对虾中上调表达,说明*PjRan*蛋白可能在对虾抗病毒免疫中起作用。运用免疫共沉淀等方法,发现肌球蛋白myosin与*PjRan*蛋白存在相互作用,这种相互作用关系通过体内和体外试验进行了验证。对虾血细胞吞噬试验证实,*PjRan*蛋白调控吞噬活性。因此,*PjRan*在抗病毒免疫过程中发挥作用的可能途径之一是*PjRan*-myosin-actin-细胞吞噬^[15]。

3.2.2 对虾*PjCaspase*基因序列多样性在抗病毒中的作用

我们对日本对虾*Caspase*基因全长扩增后进行克隆分析,将其命名为*PjCaspase*基因,含有两个内含子、三个外显子。RNAi试验结果表明,当*PjCaspase*基因的表达受siRNA抑制后,病毒诱导的细胞凋亡活性显著减弱,进而有利于病毒的繁殖,使得WSSV的拷贝数增加,这表明*PjCaspase*基因在对虾抗病毒免疫中直接参与细胞凋亡过程^[16]。

在*PjCaspase*全长cDNA克隆的过程中,发现*PjCaspase*基因序列存在较大的变异。而采用相同条件扩增对虾*actin*基因序列则没有变化,由此推测对虾*PjCaspase*基因可能存在基因序列多样性。为进一步验证,分别对*PjCaspase*基因在cDNA水平、DNA水平的多样性水平进行了研究。结果发现cDNA水平上从同一个体的日本对虾肌肉、肝胰腺、消化道、血、鳃等5种组织器官获得的93个克隆中,没有完全相同的*PjCaspase*基因序列,但是有些序列可以编码相同的蛋白质;而在DNA水平上,同一对虾个体提取基因组模板扩增片段获得44个克隆也没有完全相同的序列;Southern Blot分析结果显示,*PjCaspase*基因在对虾基因组中为单拷贝。可见该基因的多样性不是转录过程造成的,而是在DNA水平上已经存在。作为对照,同样方法对*actin*基因进行分析,结果在DNA水平和cDNA水平上序列都是一致的,说明*PjCaspase*基因序列多样性无个体特异性和组织特异性。

为了解基因多样性的作用,我们比较分析了抗病对虾和正常对虾*PjCaspase*基因序列多样性,发现有一段序列在病毒诱导的细胞凋亡中起作用,称为抗病毒特异的序列(片段3)。以这段特异的抗病毒序列设计siRNA,然后分别用WSSV和弧菌感染对虾,诱导对虾细胞凋亡。结果表明,当采用抗

病毒特异的*PjCaspase*序列为探针时,检测不到含有这段特异序列的*PjCaspase* mRNA;采用随机标记的*PjCaspase*为探针时,可以检测到*PjCaspase*其他mRNA的转录。因此,抗病毒特异序列的siRNA可特异干扰含有这段特异序列的*PjCaspase*分子的表达,但是不含有这段特异序列的其他*PjCaspase*分子可正常转录。在含抗病毒特异序列的*PjCaspase*分子转录受到抑制的情况下,分别检测WSSV和弧菌诱导的对虾细胞凋亡,结果显示,用WSSV感染对虾时,不能诱导细胞凋亡的发生,但当用弧菌感染时,对虾细胞凋亡可以正常发生。因此,含抗病毒特异序列的*PjCaspase*只在病毒诱导细胞凋亡中起作用。将合成的含抗病毒特异序列的*PjCaspase* mRNA注射对虾,结果显示对虾体内的*PjCaspase*表达量增加。在含抗病毒特异序列的*PjCaspase*分子转录量提高的情况下,分别检测WSSV和弧菌诱导的对虾细胞凋亡,结果表明,用WSSV感染对虾时,诱导的细胞凋亡活性显著增加,但当用弧菌感染时,对虾细胞凋亡没有发生变化。以片段3特异的siRNA干扰含有这段特异序列的*PjCaspase*分子的表达,结果表明,WSSV的拷贝数显著增加;另一方面,当用合成的含抗病毒特异序列的*PjCaspase* mRNA注射对虾,WSSV的拷贝数显著减少。综合上述结果,含抗病毒特异序列的*PjCaspase*只在病毒诱导细胞凋亡中起作用。因此,无脊椎动物可能采用基因序列多样性这种方式抵抗不同病原的侵染。

3.2.3 *PjQM*基因在对虾免疫中的作用

我们对对虾*QM*基因(*PjQM*)进行全长克隆,该基因包含一个长度为663 bp的开放阅读框(ORF),预测编码221个氨基酸,具有*QM*家族高度保守的信号位点,分析发现该基因转录和表达没有组织特异性。在受病毒感染4 h后,*PjQM*的转录即出现上调表达,在感染72 h后其表达水平约为正常对虾的150%;与此同时,RT-PCR的结果表明,在抗病对虾中,*PjQM*基因的表达显著上调,说明该基因参与了对虾的抗病毒免疫过程^[17]。

通过GST下拉、质谱鉴定等分析发现,*PjQM*蛋白与血蓝蛋白、肌球蛋白(myosin)之间存在相互作用,进一步的体外和体内试验证明,*PjQM*与血蓝蛋白之间确实存在互作。蛋白质互作提示,*PjQM*可能通过酚氧化酶激活系统等途径参与对虾免疫。Northern Blot和Western Blot结果显示,*PjQM*基因的转录和表达被*PjQM*序列特异的siRNA抑制时,对虾酚氧化酶(PO)活性显著下降,表明*PjQM*可调

控对虾 P O 活性。

综合上述结果, 对虾 PjQM 通过与血蓝蛋白相互作用, 调控对虾体内 P O 活性, 从而参与对虾抗病毒免疫^[17]。

4 展望

自从 1992 年 WSSV 爆发以来, 一直未能找到有效的防治方法, 目前仍然是以预防病毒流行为主要手段, 切断其传播途径。近 10 多年来, 在分子水平上研究 WSSV 的感染机理和对虾抗病毒免疫机制已成为主要的研究方向, 随着研究不断深入, 有可能从分子水平为对虾病害的防治开辟新的途径。

[参 考 文 献]

- [1] Zhang XB, Huang C, Xu X, et al. Identification and location of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. *J Gen Virol*, 2002, 83: 1069-74
- [2] Wu WL, Wang L, Zhang XB. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology*, 2005, 332(2): 578-83
- [3] Han F, Zhang XB. Internal initiation of mRNA translation in insect cell mediated by an internal ribosome entry site (IRES) from shrimp white spot syndrome virus (WSSV). *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344: 893-9
- [4] Kang ST, Leu JH, Wang HC, et al. Polycistronic mRNAs and internal ribosome entry site elements (IRES) are widely used by white spot syndrome virus (WSSV) structural protein genes. *Virology*, 2009, 387(2): 353-63
- [5] Robalino J, Bartlett T, Shepard E, et al. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *J Virol*, 2005, 79(21): 13561-71
- [6] 杨官品, 董超华. RNA干扰技术与对虾病毒病防治. 中国海洋大学学报, 2009, 39(1): 71-6
- [7] Xu JY, Han F, Zhang XB. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Res*, 2007, 73(2): 126-31
- [8] Lu C, Jeong DH, Kulkarni K, et al. Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12): 4951-6
- [9] Wang W, Zhang XB. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25: 522-7
- [10] He NH, Qin QW, Xu X. Differential profile of genes expressed in hemocytes of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Res*, 2005, 66: 39-45
- [11] Wu WL, Zhang XB. Characterization of a Rab GTPase up-regulated in the shrimp *Penaeus japonicus* by virus infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23: 438-45
- [12] Zong RR, Wu WL, Xu JY, et al. Regulation of phagocytosis against bacterium by Rab GTPase in shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25: 258-63
- [13] Wu WL, Zong RR, Xu JY, et al. Antiviral phagocytosis is regulated by a novel Rab-dependent complex in shrimp *Penaeus japonicus*. *J Proteome Res*, 2008, 7: 424-31
- [14] Han F, Zhang XB. Characterization of a ras-related nuclear protein (Ran protein) up-regulated in shrimp antiviral immunity. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23: 937-44
- [15] Liu WF, Han F, Zhang XB. Ran GTPase regulates hemocytic phagocytosis of shrimp by interaction with myosin. *J Proteome Res*, 2009, 8(3): 1198-206
- [16] Wang L, Zhi B, Wu WL, et al. Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32: 706-15
- [17] Xu JY, Wu SJ, Zhang XB. Novel function of QM protein of shrimp (*Penaeus japonicus*) in regulation of phenol oxidase activity by interaction with hemocyanin. *Cell Physiol Biochem*, 2008, 21: 473-80