

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180521001

http://www.yykxjz.cn/

田园园, 焦真真, 孙成飞, 董浚键, 江小燕, 胡婕, 叶星. 草鱼*jam-a*分子在胚胎幼鱼期及受GCRV感染PSF细胞的表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(5): 126-133

Tian YY, Jiao ZZ, Sun CF, Dong JJ, Jiang XY, Hu J, Ye X. Expression analysis of *jam-as* in GCRV-infected grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) PSF cells and during the embryo and juvenile stages. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(5): 126-133

## 草鱼 *jam-a* 分子在胚胎幼鱼期及受 GCRV 感染 PSF 细胞的表达分析\*

田园园 焦真真 孙成飞 董浚键 江小燕 胡婕 叶星<sup>①</sup>

(中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室 广州 510380)

**摘要** 草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)可引发草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)出血病, 导致高死亡率。草鱼吻端成纤维细胞(Grass carp snout fibroblast cells, PSF)是 GCRV 的敏感细胞系。JAM-A (Junctional adhesion molecule A)为免疫球蛋白超家族成员, 是多种病毒的细胞受体。本研究在前期克隆到草鱼 3 种 *jam-a* 基因, 命名为 *gcjam-a1*, *gcjam-a2* 和 *gcjam-a3*。在获取 ORF 序列的基础上, 利用 qRT-PCR 分析了 3 种 *gcjam-a* 在草鱼胚胎及幼鱼不同发育时期及 PSF 细胞中受 GCRV(GD108 株)感染前后的表达模式。结果显示, 检测的 13 个胚胎及幼鱼发育时期中, *gcjam-a1* 在未受精卵中高表达, 在受精卵至出膜前的胚胎表达水平均较低; 从出膜后 1~3 d 表达量开始上升; 出膜 6~15 d 均呈高水平表达。*gcjam-a2* 与 *gcjam-a3* 在草鱼胚胎及幼鱼发育各阶段表达水平较低。在无病毒感染的 PSF 细胞中, *gcjam-a* 只有少量表达。受 GCRV-GD108 感染后, 病毒 S7 基因在 PSF 细胞中的拷贝数随时间呈显著上调趋势, *gcjam-a* 的表达量也有不同程度的上调, mRNA 上调水平为 *gcjam-a1*>*gcjam-a2*>*gcjam-a3*。本研究证实了 3 种 *gcjam-a* 基因在 PSF 细胞中的表达均与 GCRV-GD108 感染相关, 其中, *gcjam-a1* 的表达水平受 GCRV-GD108 感染影响最大, 同时, 它在孵化出膜后表达上升, 推测它可能与病毒的感染更相关。*gcjam-a1* 可作为下一步 GCRV 与宿主互作研究中的候选分子。

**关键词** 草鱼吻端成纤维细胞; GCRV; *gcjam-a*; qRT-PCR; 胚胎及幼鱼发育; 病毒受体  
**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)05-0126-08

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是全国最大宗的淡水养殖品种, 2016 年产量达 589.88 万 t, 约占淡水养殖鱼产量 18.55% (王莎, 2017), 是我国水产科学研究的重要对象(赵睿等, 2016; 曾本和等, 2017)。草鱼

养殖期间尤其是鱼种阶段易暴发出血病, 导致高死亡率, 给草鱼养殖业造成巨大损失。1983 年, 我国首次报道引起草鱼出血病的主要病原为草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)。GCRV 属于呼肠孤病

\* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2016HY-ZC0602)和广东省省级科技计划项目(2017B090901001)共同资助[This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2016HY-ZC0602), and Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, China (2017B090901001)].

田园园, E-mail: tianyuan320@163.com

① 通讯作者: 叶星, 研究员, E-mail: gzyexing@163.com

收稿日期: 2018-05-21, 收修改稿日期: 2018-08-22

毒科(Reoviridae)、水生呼肠孤病毒属(*Aquareovirus*), 代表株为 GCRV873。GCRV 被认为是水生呼肠孤病毒中致病力最强的一个毒株(Rangel *et al.*, 1999)。近年, 本实验室在广东地区养殖草鱼病鱼体中分离到的出血病致病原 GCRV-GD108 株, 与 GCRV873 分子水平上具有显著差异, 与正呼肠孤病毒属(*Orthoreovirus*) 病毒具有较近的进化关系(Ye *et al.*, 2012)。随着越来越多 GCRV 毒株被分离并报道, 根据基因组序列差异将它们分成 GCRV I、II、III 3 个型, GCRV-GD108 被认为是 II 型的代表株(Zhang *et al.*, 2017; Pei *et al.*, 2014)。对广东、福建、湖南、江苏等地的草鱼病毒流行株检测结果显示, 它们均具有与 GCRV-GD108 相似的分子特征, 提示 GCRV-GD108 株在南方流行株中具有代表性(迟妍妍等, 2011)。病毒感染的第一步是侵入宿主细胞, 目前对 GCRV 入侵宿主机制的研究甚少, 因此, 深入研究 GCRV-GD108 的入侵及感染机制, 明确其细胞受体, 可为草鱼出血病的治疗和预防药物的研发提供科学依据。

JAM-A(Junctional adhesion molecule-A)为免疫球蛋白超家族的成员, 是由突出于细胞表面的 N 端免疫球蛋白样结构域连接形成的同源二聚体, 属于紧密连接(Tight junction, TJ)分子的一种(Severson *et al.*, 2009)。哺乳动物中, JAM-A 参与一系列生理及病理活动, 包括细胞极性(Rehder *et al.*, 2006)、炎症反应(Vetrano *et al.*, 2008)、血脑屏障(Yeung *et al.*, 2008)、白血球迁移(Bradfield *et al.*, 2007)、血管再生(Zhao *et al.*, 2017)等, 并与浸润及转移癌密切相关(Kurose *et al.*, 2016)。在鱼类中 JAM-A 的报道较少, 斑马鱼(*Danio rerio*)中的研究发现, JAM-A 在造血干细胞分化及肌肉发育中起重要作用(Kobayashi *et al.*, 2014), 红鼓鱼(*Sciaenops ocellatus*)中的研究表明, JAM-A 可能是胞内菌免疫逃逸的靶位点(Zhang *et al.*, 2014)。某些病毒可利用宿主细胞紧密连接的不同组件以完成其感染周期, 目前已经证实, JAM-A 是哺乳动物呼肠孤病毒(Mammalian reovirus, MRV) (Guglielmi *et al.*, 2007)、猫杯状病毒(Feline calicivirus) (Makino *et al.*, 2006)以及轮状病毒(Rotaviruses) (Torres-Flores *et al.*, 2015)的受体。Du 等(2013)首次在草鱼中克隆到 *jam-a* 基因全长, 并推测 JAM-A 可能是 GCRV 的受体分子。Zhang 等(2017)进一步利用蛋白质组学及生物信息学方法分析蛋白之间基序-结构域互作(Motif-domain interactions), 预测 JAM-A 与 GCRV fiber 蛋白的基序互相作用, 并发现其互作类似于 MRV 与 JAM-A 的作用模式。

本课题组前期研究在草鱼组织中克隆到 3 种

JAM-A cDNA, 分别命名为 *gcjam-a1*, *gcjam-a2*, *gcjam-a3*, 编码 294~295 个氨基酸多肽, 其推演氨基酸序列相似性为 93%~97%, 均具有 2 个 JAM-A 典型的免疫球蛋白 Ig 结构域(田园园等, 2017)。在此基础上, 本研究利用 qRT-PCR 分析了 3 种 *gcjam-a* 在草鱼胚胎不同发育时期的表达模式, 以及 GCRV-GD108 感染前后在病毒敏感株 PSF 细胞中的表达模式, 为进一步明确 GCRV II 型受体提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病毒及细胞

细胞培养: 草鱼吻端成纤维细胞(PSF)在 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中培养, 培养温度为 28℃ 左右, 经 2~3 d 即可长成致密单层贴壁细胞。

GCRV-GD108 组织病毒液的制备和保存: 实验室保存的毒价 10<sup>4.87</sup> LD<sub>50</sub>/ml 的 GCRV-GD108 病毒液按照 1:10 用生理盐水稀释, 腹腔注射攻毒 2 月龄草鱼(体长约为 10 cm, 体重为 10~15 g), 观察 2 周。发病草鱼肌肉、肠道、口腔、下颌、鳃盖充血, 体表发黑, 7 d 后开始死亡。收集发病草鱼, 取鳃、肝、肠、肾等充血组织约 0.1 g, 加入 1 ml 冷生理盐水充分匀浆, 于 4℃ 12000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 保存于 -70℃ 冰箱。

### 1.2 草鱼胚胎及幼鱼

实验用草鱼胚胎取自广东省佛山百容水产良种有限公司。取源自同一对草鱼亲本的受精卵, 显微镜下观察其胚胎发育时期, 分别取未受精卵、受精卵、囊胚期、神经胚期、尾芽期、肌肉效应期、心脏出现期、出膜期、出膜后第 2、3、6、10、15 天共 13 个时期的胚胎和幼鱼, 出膜前各期样品 10 枚卵/组, 出膜后幼鱼 4 尾/组, 每个时期各 3 组。

### 1.3 qRT-PCR 分析胚胎发育时期 *gcjam-a* 表达模式

草鱼胚胎发育各时期的样品置于离心管中, 经 Trizol 快速润洗后, 再加入 1 ml Trizol (Invitrogen, 美国), 匀浆后保存于 -70℃。收集各发育时期的胚胎后, 按照 Trizol 说明书提取 RNA。总 RNA 用 DNase I (TaKaRa, 大连)去除基因组 DNA。利用分光光度计 Biophotometer (Eppendorf, 德国)及琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度及纯度。使用反转录试剂盒 First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (全式金, 北京)合成 cDNA, 反应体系如下: 总 RNA 100 ng, 5×Transcript All-in-One Super Mix 4 μl, gDNA Remover 1 μl, RNase-free H<sub>2</sub>O 补至 20 μl。反应程序: 42℃

15 min; 85℃酶灭活 5 s; -20℃保存。所有反转录反应均为 2 个重复。

设计引物扩增 3 种 *gcjam-a* 特异片段(qRT-primerA1, A2, A3, 表 1), 18S *rRNA* 作为内参基因(定量引物 18S *rRNA*, 表 1)。利用草鱼组织 cDNA 为模

板, PCR 扩增目的片段, 经胶回收、纯化后连入 pEASY-Blunt Zero 克隆载体(全式金, 北京)进行测序, 确认插入正确。纯化质粒经 Biophotometer 浓度检测后, 进行梯度稀释制作标准品, 用于标准曲线的构建(田园园等, 2017)。

表 1 用于草鱼 *gcjam-a*、GCRV-GD108 S7 基因扩增及 qRT-PCR 的引物  
Tab.1 Primers of *gcjam-a* and GCRV-GD108 S7 used in PCR and qRT-PCR

目的片段 Target fragment	引物名 Primers	引物序列 Primer sequences(5'~3')	用途 Purpose
qRT-primer A1	A1F	GTGGAATAGCCTATTTTGAAG	qRT-PCR(110 bp)
	A1R	ACTAAAGGGTTAGCAACGG	
qRT-primer A2	A2F	CTGTTCTTAATCCCTCAGTAAA	qRT-PCR(116 bp)
	A2R	AGAAAACGAATGACTGAGAG	
qRT-primer A3	A3F	ATCTTTTACGGTTAGCATTAG	qRT-PCR(106 bp)
	A3R	TAGATGAAAACTGATATCCC	
S7	S7F	TGTCGCTGTCCAGGAATCAA	qRT-PCR(95 bp)
	S7R	AAGGAATAGTCACACGGGGC	
18S <i>rRNA</i>	18SF	ATTTCCGACACGGAGAGG	qRT-PCR(90 bp)
	18SR	CATGGGTTTAGGATACGCTC	
pEASY-Blunt Zero	M13F	GTA AACGACGGCCAG	阳性克隆筛选
	M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	Positive clone screening

qRT-PCR 按以下步骤进行: 根据 TransStart Tip Green qPCR SuperMix(全式金, 北京)说明书设置反应体系: cDNA 模板 1  $\mu\text{l}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.4  $\mu\text{l}$ , 2 $\times$  Super Mix 10  $\mu\text{l}$ , Passive Reference Dye I (50 $\times$ ) 0.4  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.8  $\mu\text{l}$ 。扩增时设置 3 个重复, 循环体系如下: 94℃ 30 s; 40 个循环: 94℃ 5 s, 60℃ 30 s。溶解曲线: 95℃ 15 s; 60℃ 1 min; 95℃ 15 s; 60℃ 15 s。每个实验样本重复 3 次, 所有样本都与管家基因 18S *rRNA* 一同运行, 所有标准曲线的相关系数 *R* 值均大于 0.998, 相应的实时 PCR 效率为 0.90~1.10。mRNA 表达量用双标准曲线相对定量法计算, 用归一化值表示, 归一化值=目的基因浓度均值/内参基因浓度均值, 用归一化值 $\pm$ 标准误(SE)的形式表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。利用 Origin 6.0 对统计结果进行作图。

#### 1.4 qRT-PCR 分析 GCRV-GD108 在 PSF 细胞中的增殖

GCRV-GD108 感染 PSF 细胞, 具体步骤如下: 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶(Corning, 美国)中培养的 PSF 细胞密度约为 15.3 $\times 10^4$  个/ml 时, 倒去培养液, 用 3 ml PBS 洗涤 2 次, 加入 1 ml 胰酶(Difco, 美国)消化, 前后摇匀。细胞脱落后, 将细胞吹打均匀, 以 1:500 体积比将组织病毒液加入 15 ml 无血清的 M199 细胞培养液(Gibco, 美国)中, 均分装于 3 个 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶

中, 28℃ 吸附 45 min 后倒掉病毒液, 每瓶加入 5 ml 含 8% 犊牛血清(Gibco, 美国)的细胞培养液, 28℃ 培养。

PSF 细胞总 RNA 提取步骤如下: 每 24 h 取 3 瓶 PSF 细胞弃培养液, 连续取 8 d。分别用 3 ml 预冷 PBS 洗 2 次, 然后分别加入 1 ml Trizol 裂解, 保存于 -70℃。按照 Trizol 说明书提取 RNA。总 RNA 用 DNase I 去除基因组 DNA 并检测其浓度及纯度。使用反转录试剂盒 First-Strand cDNA Synthesis Super Mix for qPCR(全式金, 北京)合成 cDNA, 反应体系如下: 细胞总 RNA 100 ng, 5 $\times$ Transcript All-in-One Super Mix 4  $\mu\text{l}$ , gDNA Remover 1  $\mu\text{l}$ , RNase-free H<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{l}$ 。反应程序: 42℃ 15 min; 85℃ 酶灭活 5 s; -20℃ 保存。所有反转录反应均为 2 个重复。

利用 S7 qRT-PCR 引物(表 1), 保存的全长 S7 克隆载体为模板对 S7 进行 PCR 扩增目的片段, 经胶回收、纯化后连入 pEASY-Blunt Zero 克隆载体进行测序确认插入正确。纯化质粒经 Biophotometer 浓度检测后, 进行梯度稀释制作标准品用于标准曲线的构建。采用绝对定量法检测细胞中病毒 S7 表达量。

根据 TransStart Tip Green qPCR SuperMix 说明书设置反应体系: 上述 cDNA 模板 1  $\mu\text{l}$ , 上、下游引物(10 mmol/L)各 0.4  $\mu\text{l}$ , 2 $\times$  Super Mix 10  $\mu\text{l}$ , Passive Reference Dye I (50 $\times$ ) 0.4  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 7.8  $\mu\text{l}$ 。扩增时设置 3 个重复, 循环体系如下: 94℃ 30 s; 40 个循环: 94℃ 5 s, 60℃ 30 s。溶解曲线: 95℃ 15 s,

60°C 1 min, 95°C 15 s, 60°C 15 s。每个实验样本重复 3 次, 所有标准曲线的相关系数  $R$  值均大于 0.998, 相应的实时 PCR 效率为 0.90~1.10。S7 表达量以均值 $\pm$ 标准误(SE)的形式表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 利用 Origin 6.0 对统计结果进行作图。

### 1.5 qRT-PCR 分析 GCRV-GD108 感染前后 *gcjam-a* 表达模式

提取病毒感染前后 PSF 细胞总 RNA 做模板进行反转录, 参照 1.3 所述, 利用 *gcjam-a* 特异引物(qRT-primerA1, A2, A3, 表 1), 根据 TransStart Tip Green qPCR SuperMix (全式金)说明书设置反应体系进行 qRT-PCR 反应, 18S *rRNA* 作为内参基因(定量引物 18S *rRNA*, 表 1)。qRT-PCR 反应体系及数据处理参照 1.3。

## 2 结果

### 2.1 *gcjam-a* 胚胎幼鱼期表达模式分析

利用 qRT-PCR 对 3 种 *gcjam-a* 在草鱼胚胎不同发育时期及幼鱼期的表达量进行检测, 其中, 包括未受精卵、受精卵、囊胚期、心脏出现期等至出膜第 15 天共 13 个发育阶段。结果显示, *gcjam-a1* 在未受精卵中的表达水平最高; 受精卵至孵化出膜前的幼鱼表达水平均较低; 从出膜后 1~3 d 表达量开始上升, 出膜 6~15 d 均呈现高表达水平。*gcjam-a2* 与 *gcjam-a3* 的结果相似, 与 *gcjam-a1* 相比在草鱼胚胎发育时期为极低水平表达(图 1)。

### 2.2 GCRV-GD108 在 PSF 细胞中的增殖

病毒感染后, 草鱼 PSF 细胞中 S7 的表达量出现显著变化, 具体表现为感染后的第 3 天开始出现上升趋势, 第 5 天出现显著上升, 到第 8 天达到最大值(为第 1 天的 432 倍)(图 2)。

### 2.3 GCRV-GD108 感染 PSF 细胞前后 *gcjam-a* 的表达变化

在无感染的 PSF 细胞中, 3 种 *gcjam-a* mRNA 只有少量表达, 维持在较低水平, 其中, *gcjam-a2* 表达水平高于其他 2 个分子(图 3)。GCRV-GD108 感染 PSF 细胞后, 3 种 *gcjam-a* 在细胞中的表达量呈现不同程度的上调趋势(图 3)。各基因 mRNA 上调水平(表达量变化)为 *gcjam-a1*>*gcjam-a2*>*gcjam-a3*。*gcjam-a1* 表达量在病毒感染后第 3 天开始上升, 第 7 天达到最大值(为感染第 1 天的 3329 倍), 第 8 天有下降趋势, 但仍维持在较高水平;*gcjam-a2* 的表达量自感染后第 3 天开

始出现上升趋势, 第 6 天开始上升幅度变大, 第 7 天时呈下降趋势, 在第 8 天时达到最大值(为感染第 1 天的 784 倍); *gcjam-a3* 自病毒感染后 3 d 开始出现表

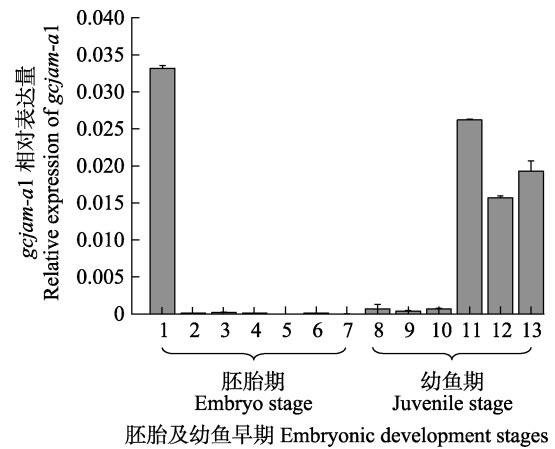


图 1 qRT-PCR 分析 *gcjam-a1* 在草鱼胚胎发育各时期及早期幼鱼期中的相对表达量

Fig.1 qRT-PCR analysis on expression levels of *gcjam-a1* during grass carp embryonic and juvenile development

1~13 分别代表未受精卵、受精卵、囊胚期、神经胚期、尾芽期、肌肉效应期、心脏出现期、出膜期、出膜第 2、3、6、10、15 天 13 个时期。mRNA 表达量用双标准曲线相对定量法计算, 用归一化值表示, 归一化值=目的基因浓度均值/内参基因浓度均值, 用归一化值 $\pm$ 标准误(SE)的形式表示 1~13 represent unfertilized egg, fertilized egg, gastrula stage, nerve embryonic stage, tail bud stage, muscle effecting phase, heart beating phase, hatching phase, 2 days post hatching (dph), 3 dph, 6 dph, 10 dph, and 15 dph, respectively. mRNA relative expression values were calculated by the relative quantification method using double standard curve, and results were showed as normalized values, normalized value=mean value of target gene concentration/mean value of internal reference gene, showed as normalized value $\pm$ standard error (SE)

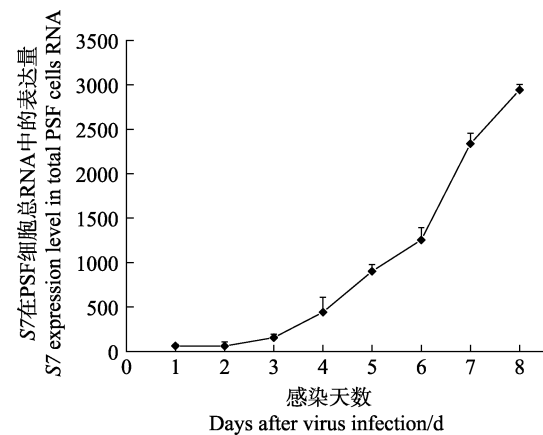


图 2 qRT-PCR 分析 GCRV-GD108 S7 在病毒感染 PSF 细胞中的表达量(平均值 $\pm$ 标准误差)

Fig.2 The qRT-PCR analysis of GCRV-GD108 S7 copies in infected PSF cell(Means $\pm$ SE)

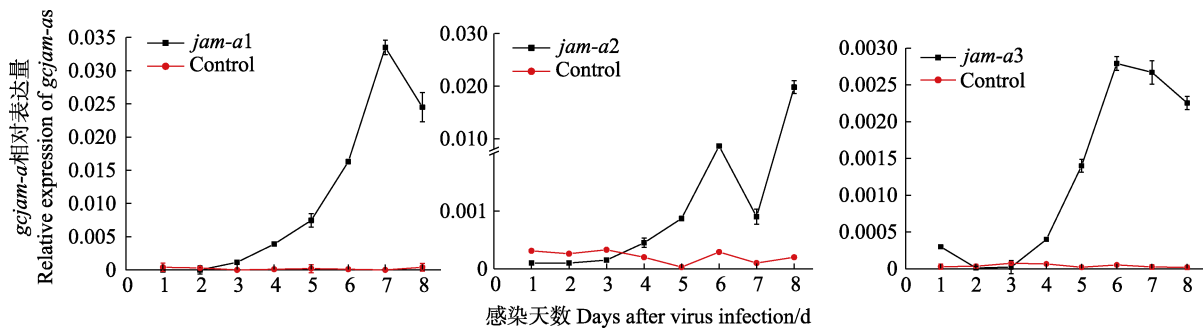


图3 qPCR分析 *gcjam-a* 在细胞中的表达情况(归一化值±标准误差)

Fig.3 The qPCR analysis of *gcjam-as* mRNA expression in GCRV-GD108 infected PSF cells (Means±SE)

达上调,从第4天开始上升幅度变大,在6d时达到最大值(为感染第1天的47倍)。

### 3 讨论

病毒感染宿主需要经过一个完整的复制周期,包括病毒的吸附、穿入细胞内、脱壳、生物合成、病毒颗粒装配、释放等过程(Schulz *et al.*, 2012)。细胞表面受体在病毒吸附和侵入细胞时能特异性的与病毒表面衣壳蛋白结合,是病毒入侵的首要步骤,也被认为是病毒宿主范围的一个决定因素。有囊膜的病毒如人体免疫缺损病毒(艾滋病毒 HIV)(Bartesaghi *et al.*, 2013)、流感病毒(Influenza virus)(Skehel *et al.*, 2000)等,其通过膜融合入侵宿主的机制已得到深入研究。在侵染过程中,病毒的磷脂双分子层跟细胞膜融合,从而经过内吞作用入膜(Harrison *et al.*, 2015)。无囊膜病毒中哺乳动物呼肠孤病毒 MRV 入侵宿主机制已有较为详尽的研究(Banerjee *et al.*, 2008)。MRV 的 outer-fiber 蛋白  $\sigma 1$  蛋白呈高度伸展的构型,以带有头尾的长纤维状突出于病毒粒子表面,在病毒感染时结合宿主细胞(Danthi *et al.*, 2010)。细胞表面受体 JAM-A 由突出于细胞表面的 N 端免疫球蛋白样结构域连接形成同源二聚体结构,病毒感染入膜时  $\sigma 1$  破坏 JAM-A 二聚物,并与其中一个 JAM-A 分子连接,随后细胞  $\beta 1$  整合素介导病毒发生内吞作用,接着病毒的核心颗粒进入细胞质中(Kirchner *et al.*, 2008)。JAM-A 二聚体的解体、 $\sigma 1$  与 JAM-A 单体的连接是哺乳动物正呼肠孤病毒感染开始的观点已被普遍接受(Danthi *et al.*, 2013)。进一步的研究发现, JAM-A 对病毒的血行性传播起决定作用(Antar *et al.*, 2009)。

水生呼肠孤病毒与正呼肠孤病毒亲缘关系较近,蛋白序列间有较高的同源性,有9个同源蛋白,在结构上也具有相似性(Kim *et al.*, 2004; Nibert *et al.*, 2013)。根据基因组序列分析, GCRV-GD108 与其他已知水生呼肠孤病毒相比,与 MRV 进化关系上更近

(Ye *et al.*, 2012),在前期研究中,通过中和实验与细胞结合实验证实 GCRV-GD108 S7 编码的  $\sigma 1$  同源蛋白 fiber 可与 PSF 细胞稳定结合,是病毒的细胞吸附蛋白(Tian *et al.*, 2017)。并从草鱼中克隆到 *gcjam-a1*, *gcjam-a2*, *gcjam-a3* cDNA 序列,3个 *gcjam-a* 的跨膜结构域 D2 序列完全一致,而病毒结合结构域 D1 序列则稍有差别,其中, *gcjam-a3* 与 Du 等(2013)报道的草鱼 JAM-A 序列相同。qRT-PCR 分析显示,草鱼幼鱼受病毒感染后,3种 *gcjam-a* mRNA 在草鱼鳃组织中的表达均出现显著上调,而在肝脏、脾脏、肠、肾与脑中只有 *gcjam-a1* 的表达有不同程度的上调,说明 *gcjam-a1* 与病毒感染关系更密切(田园园等, 2017)。

本研究发现, *gcjam-a1* 在未受精卵中有较高表达,但在受精卵至心脏效应期表达水平较低;出膜第1~3天的幼鱼表达开始上调,第6~15天呈现高水平表达。其他2个 *gcjam-a* 在受精卵及检测的胚胎发育阶段及幼鱼期的表达量均较低。本研究 *gcjam-a1* 在胚胎发育时期及幼鱼的表达趋势与 Du 等(2013)的研究相似。Du 等(2013)研究发现, *gcjam-a* 在未受精卵中表达,受精后48h内表达逐渐下调,受精后56h表达水平又开始升高,表现出母源性表达。斑马鱼 *jam1a* 在未受精卵中无表达,受精14h后在侧中胚层后部两侧表达,这个部位将发育成内皮组织及造血系统(Kobayashi *et al.*, 2014)。对小鼠 JAM-A 在胚胎发育时期的表达分析显示,小鼠 JAM-A 也是在受精后才开始表达(Aurrand-Lions *et al.*, 2001)。

草鱼吻端成纤维细胞是 GCRV 的敏感株,李焕林等(1988)建立了草鱼吻端成纤维细胞系,许淑英等(1994)利用该敏感细胞系使用离体细胞培养法制备 GCHV-841 株弱毒疫苗,其免疫保护性高达100%。在对草鱼出血病病原学、流行病学以及免疫学的研究过程中,研究人员建立了多株草鱼细胞系,如草鱼肾细胞系和草鱼性腺细胞系等(王津津等, 2016)。李贤等(2016)利用 GCRV HZ08 株接种 PSF 细胞发现,与其他

几种细胞系相比, GCRV II 在 PSF 中增殖量较其他草鱼细胞系大。GCRV-GD108 感染 PSF 细胞发现, 不产生细胞病变效应(Ye *et al.*, 2012), 可能是因为 GCRV II 型缺少其他水生呼肠孤病毒如 GCRV I 型中的“FAST”蛋白(Fusion-associated small transmembrane protein), 不能使被感染细胞形成合胞体从而产生细胞病变效应(Nibert *et al.*, 2013), 因此, 增加了对病毒增殖观察的难度。本研究通过检测 GCRV-GD108 S7 基因的表达量以了解病毒在 PSF 的增殖情况。

GCRV-GD108 感染草鱼 PSF 细胞后, 病毒 S7 基因的拷贝数即病毒的增殖量随时间呈显著上调趋势, 到感染后第 8 天达到最大值。PSF 细胞感染病毒后, 3 种 *gcjam-a* 的表达量随病毒增殖均有不同程度的上调趋势, 但其上升水平存在差异, *gcjam-a1* 的表达量升幅最高, 表明 PSF 细胞中 3 种 *gcjam-a* 表达均与病毒的感染相关, 但 *gcjam-a1* 受病毒感染影响更大。这与病毒攻毒后 *gcjam-a* 在草鱼幼鱼鳃等组织中的表达量变化结果一致, 说明 *gcjam-a1* 与病毒感染关系更紧密。在本研究基础上, 已经构建了 3 种 *gcjam-a* 的真核表达载体以及 RNAi 载体, 拟进一步在细胞水平上了解 *gcjam-a* 与 GCRV-GD108 感染的相关性。

本研究采用 qRT-PCR 检测 3 种 *gcjam-a* 在草鱼胚胎发育期及幼鱼期以及在 PSF 细胞中的表达水平, 结果表明, 3 种 *gcjam-a* 随病毒的感染呈现不同程度的上调表达, 证实它们与病毒感染密切相关。其中, *gcjam-a1* 在草鱼中呈母源性表达, 在草鱼幼鱼组织和 PSF 细胞中的表达量均高于 *gcjam-a2* 和 *gcjam-a3*, 并且其在 PSF 细胞中的表达受病毒感染影响最大, 因此, 推测 *gcjam-a1* 与 GCRV-GD108 感染关系更密切。本研究为进一步研究 GCRV 入侵机制提供科学依据, 并为草鱼出血病防治提供新靶标和新途径。

## 参 考 文 献

- Antar AAR, Konopka JL, Campbell JA, *et al.* Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus. *Cell Host and Microbe*, 2009, 5(1): 59–71
- Aurand-Lions M, Johnson-Leger C, Wong C, *et al.* Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood*, 2001, 98(13): 3699–3707
- Banerjee M, Johnson JE. Activation, exposure and penetration of virally encoded, membrane-active polypeptides during non-enveloped virus entry. *Current Protein and Peptide Science*, 2008, 9(1): 16–27
- Bartesaghi A, Merk A, Borgnia MJ, *et al.* Prefusion structure of trimeric HIV-1 envelope glycoprotein determined by cryo-electron microscopy. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2013, 20(12): 1352–1357
- Bradfield PF, Nourshargh S, Aurand-Lions M, *et al.* JAM family and related proteins in leukocyte migration (Vestweber series). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005, 27(10): 2104–2112
- Chi YY, Tian YY, Ye X, *et al.* Molecular properties of grass carp reovirus in southern China and establishment of a duplex PCR detection method. *Chinese Journal of Virology*, 2011, 27(4): 358–364 [迟妍妍, 田园园, 叶星, 等. 南方养殖草鱼呼肠孤病毒的分子特性比较及双重 PCR 检测方法的建立. *病毒学报*, 2011, 27(4): 358–364]
- Danthi P, Guglielmi KM, Kirchner E, *et al.* From touchdown to transcription: The reovirus cell entry pathway. *Cell Entry by Non-Enveloped Viruses*, 2010, 343: 91–119
- Danthi P, Holm GH, Stehle T, *et al.* Reovirus receptors, cell entry, and proapoptotic signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2013, 790: 42–71
- Du F, Su J, Huang R, *et al.* Cloning and preliminary functional studies of the JAM-A gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(6): 1476–1484
- Guglielmi KM, Kirchner E, Holm GH, *et al.* Reovirus binding determinants in junctional adhesion molecule-A. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(24): 17930–17940
- Harrison SC. Viral membrane fusion. *Virology*, 2015, 479–480: 498–507
- Kim J, Tao Y, Reinisch KM, *et al.* Orthoreovirus and Aquareovirus core proteins: Conserved enzymatic surfaces, but not protein-protein interfaces. *Virus Research*, 2004, 101(1): 15–28
- Kirchner E, Guglielmi KM, Strauss HM, *et al.* Structure of reovirus sigma1 in complex with its receptor junctional adhesion molecule-A. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(12): e1000235
- Kobayashi I, Kobayashi-Sun J, Kim AD, *et al.* Jam1a-Jam2a interactions regulate haematopoietic stem cell fate through Notch signalling. *Nature*, 2014, 512(7514): 319–323
- Kurose M, Kakuki T, Takano K, *et al.* Junctional adhesion molecule-A in head and neck squamous cell Carcinoma. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, 2016, 77: 92–97
- Li HL, Xu SY, Deng GC, *et al.* Establishment of cell line PSF from the fibroblast cell of grass carp snout tissue and studies of its biological characteristics. *Journal of Chinese Academy of Fishery Sciences*, 1988, 1(1): 1–8 [李焕林, 许淑英, 邓国成, 等. 草鱼吻端成纤维细胞系 PSF 的建立及其生物学特性. *中国水产科学研究院学报*, 1988, 1(1): 1–8]
- Li X, Zeng WW, Wang Q, *et al.* The study on the proliferation of GCRV II in different fish cell lines. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(8): 1249–1257 [李贤, 曾伟伟, 王庆, 等. 草鱼呼肠孤病毒 II 型在不同鱼类细胞中的增殖情况. *水*

- 产学报, 2016, 40(8): 1249–1257]
- Makino A, Shimojima M, Miyazawa T, *et al.* Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *Journal of Virology*, 2006, 80(9): 4482–4490
- Nibert ML, Duncan R. Bioinformatics of recent aqua- and orthoreovirus isolates from fish: Evolutionary gain or loss of FAST and fiber proteins and taxonomic implications. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68607
- Pei C, Ke F, Chen ZY, *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of grass carp reovirus strain 109 (GCRV-109) with other grass carp reovirus strains reveals no significant correlation with regional distribution. *Archives of Virology*, 2014, 159(9): 2435–2440
- Rangel AA, Rockemann DD, Hetrick FM, *et al.* Identification of grass carp haemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus. *Journal of General Virology*, 1999, 80 (Pt 9): 2399–2402
- Rehder D, Iden S, Nasdala I, *et al.* Junctional adhesion molecule-A participates in the formation of apico-basal polarity through different domains. *Experimental Cell Research*, 2006, 312(17): 3389–3403
- Schulz WL, Haj AK, Schiff LA. Reovirus uses multiple endocytic pathways for cell entry. *Journal of Virology*, 2012, 86(23): 12665–12675
- Severson EA, Parkos CA. Structural determinants of junctional adhesion molecule A (JAM-A) function and mechanisms of intracellular signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 2009, 21(5): 701–707
- Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69: 531–569
- Tian YY, Jiao ZZ, Dong JJ, *et al.* Cloning and expression analysis of *jam-a* genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *South China Fisheries Science*, 2017, 13(6): 30–40 [田园园, 焦真真, 董浚键, 等. 草鱼 *jam-a* 基因的克隆及表达分析. 南方水产科学, 2017, 13(6): 30–40]
- Tian YY, Jiao ZZ, Dong JJ, *et al.* Grass carp reovirus-GD108 fiber protein is involved in cell attachment. *Virus Genes*, 2017, 53(4): 613–622
- Torres-Flores JM, Silva-Ayala D, Espinoza MA, *et al.* The tight junction protein JAM-A functions as coreceptor for rotavirus entry into MA104 cells. *Virology*, 2015, 475: 172–178
- Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, *et al.* Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2008, 135(1): 173–184
- Wang JJ, Liu Y, Yu L, *et al.* Characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) ovary cell line and its susceptibility to spring viremia of carp virus. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 56–61 [王津津, 刘莹, 于力, 等. 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)性腺细胞系(GCO)特性和对鲤春病毒的敏感性. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 56–61]
- Wang S. National fisheries economic statistics bulletin of 2016. *China Fisheries*, 2017(7): 23–24 [王莎. 2016年全国渔业经济统计公报. 中国水产, 2017(7): 23–24]
- Xu SY, Li HL, Deng GC, *et al.* The preparation and immune effect of attenuated live vaccine obtained through cell culture for hemorrhage of grass carp. *Journal of Fisheries of China*, 1994, 18(2): 110–117 [许淑英, 李焕林, 邓国成, 等. 草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果. 水产学报, 1994, 18(2): 110–117]
- Ye X, Tian Y, Deng G, *et al.* Complete genomic sequence of a reovirus isolated from grass carp in China. *Virus Research*, 2012, 163(1): 275–283
- Yeung D, Manias JL, Stewart DJ, *et al.* Decreased junctional adhesion molecule-A expression during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathologica*, 2008, 115(6): 635–642
- Zeng BH, Liao ZY, Xiang X, *et al.* Effects of bile acids on growth performance, muscle composition and digestive enzyme activities of *Ctenopharyngodon idellus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 99–106 [曾本和, 廖增艳, 向泉, 等. 胆汁酸对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的生长性能、肌肉营养成分及消化酶活性的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 99–106]
- Zhang A, He L, Wang Y. Prediction of GCRV virus-host protein interactome based on structural motif-domain interactions. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(1): 145
- Zhang J, Zhang M, Sun L. Junctional adhesion molecule A of red drum (*Sciaenops ocellatus*): A possible immunomodulator and a target for bacterial immune evasion. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2014, 161(1–2): 99–107
- Zhao R, Lou FR, Ding FH, *et al.* The nutritional value and processing quality of *Ctenopharyngodon idellus*, *Liza haematocheila*, and *Centropristis striata*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(6): 62–67 [赵睿, 娄方瑞, 丁福红, 等. 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、梭鱼(*Liza haematocheila*)、黑石斑鱼(*Centropristis striata*)的营养成分及加工品质比较. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 62–67]
- Zhao Z, Vajen T, Karshovska E, *et al.* Deletion of junctional adhesion molecule A from platelets increases early-stage neointima formation after wire injury in hyperlipidemic mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2017, 21(8): 1523–1531

## Expression Analysis of *jam-as* in GCRV-infected Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) PSF Cells and During the Embryo and Juvenile Stages

TIAN Yuanyuan, JIAO Zhenzhen, SUN Chengfei, DONG Junjian, JIANG Xiaoyan, HU Jie, YE Xing<sup>①</sup>

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510380)

**Abstract** Grass carps are seriously threatened by GCRV (grass carp reovirus) that can cause high mortality to fingerling and yearling grass carps. Grass carp snout fibroblast cells (PSF) are highly sensitive to GCRV. Junctional adhesion molecule A (JAM-A), an immunoglobulin superfamily member, acts as a viral cell receptor. In our previous study, the cDNA sequences of grass carp *jam-a1*, *jam-a2*, and *jam-a3* (named *gcjam-a1*, *gcjam-a2*, and *gcjam-a3*) were cloned. Based on this, qRT-PCR was used to analyze the expression pattern of *gcjam-as* at different embryonic and juvenile development stages and in GCRV-GD108-infected PSF cells. The results showed that the expression pattern of *gcjam-a1*, 2, and 3 differed during the embryonic development stages. mRNA expression of *gcjam-a1* could be detected in unfertilized eggs and at a lower level from the fertilized egg stage to 1 dph (day post hatch). However, the mRNA was highly expressed at 1~3 dph and high levels were maintained from 3 dph to the end of the experiment (15 dph). The expression of *gcjam-a2* and *gcjam-a3* was very low at different embryonic development stages compared to that of *gcjam-a1*. *gcjam-as* were only slightly expressed in non-infected PSF cells. After GCRV-GD108 infection, the expression of *S7* in PSF cells increased significantly, and the expression of *gcjam-as* in PSF cells also increased to different levels after GCRV-GD108 infection. Upregulation of the *gcjam-as* was in the order: *gcjam-a1* > *gcjam-a2* > *gcjam-a3*. The results showed that the expression of *jam-as* was related to GCRV infection in PSF cells and that the expression of *jam-a1* was most influenced by GCRV-GD108 infection. It is also expressed in early embryonic development, suggesting that *jam-a1* is the most relevant to GCRV infection. This study will lay the foundation for further research on GCRV receptors.

**Key words** PSF; GCRV; *gcjam-a*; qRT-PCR; Embryonic and juvenile development; Viral receptor

<sup>①</sup> Corresponding author: YE Xing, E-mail: gzyexing@163.com