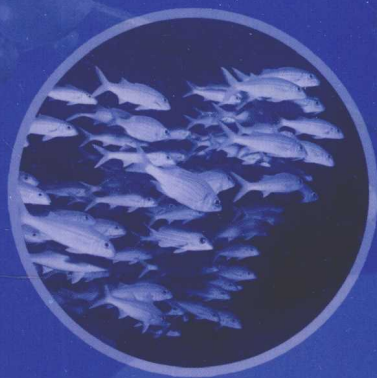



Study on community,
immune gene cloning and its expression
analysis of aquatic animal

水产动物种群、 免疫基因的克隆与表达研究

许巧情 著



 中国农业出版社

水产动物种群、免疫基因的 克隆与表达研究

Study on community, immune gene cloning and its
expression analysis of aquatic animal

许巧情 著

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

水产动物种群、免疫基因的克隆与表达研究 / 许巧情著. —北京: 中国农业出版社, 2010. 6
ISBN 978-7-109-14756-0

I. ①水… II. ①许… III. ①水产动物-种群-研究
②水产动物-免疫-无性系-遗传工程-研究 IV.
①S96

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 128458 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 黄向阳 林珠英

北京昌平环球印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
2010 年 6 月第 1 版 2010 年 6 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 8.5

字数: 250 千字

定价: 38.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)



摘 要

干扰素调节因子,是调节干扰素以及干扰素相关基因的转录因子。到目前为止,在哺乳动物和鸟类中,共发现 10 种干扰素调节因子 IRF-1~10。IRF-5 在 I 型 IFN 表达、RIG-I 和 Toll-like 信号通路,以及淋巴细胞的分化和细胞凋亡中发挥重要作用,但关于它的研究主要集中在哺乳动物,在鱼类中未见报道。本文利用 RACE 方法扩增得到草鱼的干扰素调节因子 IRF-5,并研究其在草鱼各个组织和早期发育阶段的表达以及诱导表达情况。此外,本书还研究了淡水主要育珠蚌三角帆蚌的基因组 DNA 的提取、微卫星文库的构建和微卫星标记的筛选,以及抗菌肽 (theromacin) 基因的克隆和表达研究。

草鱼 IRF-5 cDNA 全长 1821 bp,开放阅读框包含 1 560 bp,编码 519 个氨基酸。比较草鱼 IRF-5 与其他物种的 IRF-5 氨基酸序列发现,草鱼 IRF-5 与哺乳动物、鸟类、两栖类以及其他鱼类的 IRF-5 全长相似性为 34.5%~83.9%,草鱼 IRF-5 与斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 IRF-5 相似性最高,两者在 DNA 结合域和干扰素关联结构域相似性分别高达 96.2%和 95.0%。草鱼 IRF-5 基因组 DNA 全长 6 075 bp,包含 9 个外显子和 8 个内含子。RT-PCR 显示,IRF-5 在健康草鱼脾脏、肝脏、头肾、中肾、心脏、脑、鳃和皮肤中均有表达,其中,脾脏和中肾中表达量很高。早期发育荧光定量 PCR 揭示,IRF-5 在草鱼受精后 6h 的受精卵中表达量很高,在出膜前后表达量较低,随后又逐渐上升。实时荧光定量 PCR 揭示,草鱼呼肠弧病毒 (grass carp reovirus, GCHV) 和柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*),均能诱导草鱼脾脏和头肾中 IRF-5 的表达。

趋化因子 CXCL13 及其受体 CXCR5,在 B 细胞的产生、迁移和归巢中发挥重要作用。因而本研究也克隆了草鱼 CXCR5 cDNA 和基因组 DNA 序列。草鱼 CXCR5 cDNA 全长 1 518 bp,包含 43 bp 的 5'非编码区和 332 bp 的 3'非编码区,开放阅读框长 1 143 bp,编码 381 aa,含有 7 个跨膜区,其典型的结构特征,主要位于胞外区和第 3~7 个跨膜区上,属于 G 蛋白偶联受体家族的成员。系统进化树表明,草鱼 CXCR5 与其他物种的 CXCR5 聚为一支,与哺乳动物、鸟类和其他鱼类的 CXCR5 相似性达 37.6%~66.6%。草鱼 CXCR5 基因组全长 2 081 bp,包含 2 个外显子和 1 个内含子。实时荧光定量 PCR 揭示,CXCR5 在草鱼各个组织或器官均有表达,在中肾中表达量最高,其次为脾脏。CXCR5 在草鱼早期发育各个时期均有表达,包括受精卵和仔鱼。免疫刺激物肽聚糖 (PGN)、脂多糖 (LPS)、聚肌胞苷酸 (Poly I: C)、植物血细胞凝集素 (PHA),均能调控草鱼各个组织 CXCR5 的表达。这些为进一步研究 CXCR5 与其配体结合的结构、功能分析以及信号转换中的作用提供帮助。

通过磁珠富集法,构建了三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 微卫星富集文库。共获得

800 个阳性克隆，其中的 100 个阳性克隆经测序分析，发现共获得微卫星序列 54 个。利用这些微卫星序列可设计 33 对引物，经过 PCR 扩增筛选，获得了 25 对可用引物。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳，对洞庭湖一个种群的 30 只三角帆蚌进行扩增，发现 13 对引物呈现多态性，等位基因数在 4~9 之间。观测杂合度在 0.254 3~0.982 7，期望杂合度在 0.362 9~0.821 7，信息多态含量平均为 0.5198。由于存在无效等位基因，两个微卫星基因座（GenBank 登录号为 GQ302651 和 GQ302658）明显地偏离哈代-温伯格平衡，没有发现连锁不平衡现象。这些说明利用磁珠富集法构建的三角帆蚌微卫星文库质量较好，13 对多态性微卫星引物，可为三角帆蚌微卫星连锁图谱构建、分子进化和系统发育研究、分子标记辅助育种以及经济性状的 QTL 定位提供帮助。

双壳类软体动物依赖细胞免疫和体液免疫来抵御病原菌。大量研究表明：抗菌肽在体液免疫中抵抗外来病原微生物的感染中发挥重要作用。在三角帆蚌差减文库中筛选到一种抗菌肽 *theromacin* 基因，再利用 Race-PCR 方法扩增得到 *theromacin* 的 cDNA 全长。三角帆蚌 *theromacin* 基因全长 547 bp，包含一个 105 bp 的 5'非编码区，148 bp 的 3'非编码区，一个 mRNA 不稳定序列 (ATTTA)，编码 97 个氨基酸，其中成熟肽由 61 个氨基酸编码。此外，*theromacin* 基因还包含 10 个半胱氨酸残基。反转录 PCR 显示，*theromacin* 基因在三角帆蚌血液、心脏、肝脏、肠、外套膜、闭壳肌、腹足中呈现组成型表达，以血液含量最高。在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌诱导后，*theromacin* 基因的表达量均明显上升，尤其是革兰氏阳性菌——金黄色葡萄球菌和双歧杆菌诱导后，分别在诱导后 48 h 和 36 h，*theromacin* 基因表达达到最高峰。

关键词：IRF-5；CXCR5；*theromacin*；基因克隆；组织表达；微卫星富集文库



Abstract

The interferon regulatory factors (IRFs) family are transcription factors that regulate the expression of interferons and interferon-related cytokines. It has been well documented that in mammals IRF-5 plays an important role in expression of IFN- α and - β , in RIG-I and Toll-like pathways and also in differentiation of lymphoid cells and apoptosis. However, IRF-5 has not been identified in any other species of fish so far. In the study, the complete cDNA sequence of grass carp *Ctenopharyngodon idella* IRF-5 (gcIRF5) was cloned using RACE technique.

The gcIRF-5 gene with a full cDNA length of 1821 bp contains an open reading frame (ORF) of 1560 nucleotides, encoding a putative 519 amino acid protein, which showed 34.5%~83.9% identity to IRF-5 homologues from mammals, amphibian, avian and fish, and 96.2% and 95.0% identity to zebrafish IRF-5 in the DNA binding domain (DBD) and IRF association domain (IAD), respectively. The genomic DNA sequence of gcIRF-5 contains 6075 bp consisting of 9 exons and 8 introns. The expression of gcIRF-5 was observed in all tissues examined including spleen, liver, head kidney, trunk kidney, heart, gill and muscle. The analysis of real-time quantitative RT-PCR revealed that GCRV and *F. columnare* can induce the expression of gcIRF-5 in spleen and head kidney.

The chemokine receptor CXCR5 and its ligand CXCL13 play an important role in production, migration and homing of B cells. In the present study, CXCR5 was also isolated from the grass carp *C. idellus*, with the cloning of its full-length genomic sequence. The cDNA of grass carp CXCR5 (gcCXCR5) consists of 1518 bp with a 43 bp 5'-untranslated region (UTR) and a 332 bp 3'UTR. An open reading frame of 1143 bp encodes a 381 amino acid peptide, with seven transmembrane helices. The characteristic residues and/or motifs are located predominantly in the extracellular regions and in the third to seventh transmembrane domains. The deduced amino acid sequence shows 37.6%~66.6% identities with CXCR5 of mammals, avian and other fish species. The grass carp gene consists of two exons, with one intervening intron, spaced over 2081 bp of genomic sequence. Phylogenetic analyses clearly demonstrate that the gcCXCR5 resembles the CXCR5s of other vertebrates. Real-time PCR analysis showed that gcCXCR5 was expressed in all tested organs and the expression level of gcCXCR5 was highest in trunk kidney, followed by spleen. Ontogenesis analysis indicated that the expression of gcCXCR5 was observed in 6

hpf to 30 dpf. The expression of gcCXCR5 in tissues was significantly modulated by immunostimulants such as peptidoglycan (PGN), lipopolysaccharides (LPS), polyinosinic - polycytidylic acid sodium salt (Poly I: C) and phytohemagglutinin (PHA). These data provide a base for structure-function analysis of the CXCR5 ligand binding and signal transduction.

Microsatellite enriched library of *Hyriopsis cumingii* was constructed according to the strong affinity between biotin and streptavidin. Total DNA was extracted using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), digested with restriction enzyme *Mse* I and then ligated to the adapters. The treated DNA sample was then pooled and fragments were separated on a 1.2 % agarose gel prior to size selection. The resulting fragments (200—1 000 bp) were excised, purified and amplified with *Mse* I - N primers. The amplified DNA was hybridized with 5'-biotinylated (CA)_{13-3'} repeat oligos. The hybrid mixture was incubated with magnetic beads coated with streptavidin. The selected DNAs were then amplified using primers designed complementary to the linkers. Cleaned products were ligated into a pMD18 - T vector (TaKaRa) and transformed into DH5a competent cells. Recombinant clones were detected by PCR amplification with *Mse* I - N primers. A total of 100 clones with foreign inserts were sequenced. A total of 54 clones were screened for usable microsatellites. Of this clones, 33 were deemed unique, of sufficient length (more than 8 repeats) and possessed adequate flanking regions for primer designment. Among 33 primer pairs designed, 25 yielded scorable amplification products. Thirteen polymorphic microsatellite markers were separated on 10% denaturing polyacrylamide gel and visualized by silver staining, pBR322 marker was used as standard for scoring. These loci showed high levels of genetic polymorphism testing on 30 individuals sampled from Dongting Lake of Hunan Province, China. The observed number of alleles per locus ranged from 4 to 12. The ranges of observed and expected heterozygosity were 0.167 8 to 1.000 0 and 0.362 9 to 0.849 2, respectively and the average of polymorphic information content was 0.518 2. Two microsatellite loci were significantly deviated from Hardy - Weinberg equilibrium due to the presence of null alleles and no linkage disequilibrium was found. Construction microsatellite enriched library of triangle mussel according to the strong affinity between biotin and streptavidin was succeeded. These microsatellite loci will be useful for assessment of genetic diversity and population structure in *H. cumingii*.

Bivalve molluscs rely on the interaction between cellular and humoral factors for protection against potential pathogens. Antimicrobial peptides (AMPs) have been proven to be one of the most important humoral components that afford resistance to pathogen infection. The AMP gene to be identified was that encoding theromacin in the triangle-shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii* (Hc theromacin); this gene was identified from a suppression subtractive hybridization library, and it was subsequently cloned by 3' and 5' rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction (RACE - PCR). The full-length

theromacin cDNA contains 547 bp, with a 294 – bp open reading frame that encodes a 97 – amino acid peptide, and the deduced peptide sequence contains a 61 – amino acid putative mature peptide. The sequence also contains 10 cysteine residues. Reverse transcriptase (RT) – PCR analysis showed that Hc theromacin transcripts were constitutively expressed in the liver, foot, gill, adductor muscle, heart, mantle, intestine, and hemocytes, with the highest level in hemocytes. Theromacin mRNA levels were found to increase after challenge with Gram-positive and Gram-negative bacteria. After injection of the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bifidobacterium bifidum*, Hc theromacin expression showed the highest fold-change at 48 and 36 h after infection, respectively, and its levels decreased gradually thereafter.

Keywords: IRF – 5, CXCR5, Theromacin, Genome, Expression, Microsatellite enriched library



前 言

草鱼是我国的“四大家鱼”之一，是传统养殖种类。然而，草鱼养殖过程中疾病的频繁暴发，严重影响了草鱼养殖业的发展。草鱼出血病是由一种草鱼呼肠孤病毒引起的病毒性疾病。该病具有发病快，死亡率高，病程长，治愈率低等特点，是渔业生产中危害最为严重的鱼病之一。一旦感染此病，若不加以治疗控制，极有可能导致全塘覆灭，造成不可估量的损失。因而，加强对草鱼病毒性疾病的研究尤为重要，研究抗病毒相关的免疫基因，就是其中一项十分重要的工作，为鱼类体液免疫抗体的制备提供理论指导。

而同样是水产动物的贝类，相对于鱼类免疫学的基础研究和应用研究而言，其免疫还处于初级阶段。贝类动物免疫，同样分为细胞免疫和体液免疫两部分。其细胞免疫主要通过细胞的吞噬作用完成；体液免疫是通过溶酶体酶、凝集素、抗菌肽等体液免疫因子，以杀菌、促进吞噬等方式形成的免疫防御。贝类无抗体免疫机能。本书选择目前淡水中育珠产量和质量均较高的三角帆蚌为研究对象，利用构建微卫星富集文库筛选出微卫星多态性引物，为筛选或选育优良品质的三角帆蚌提供指导，同时，利用分子生物学技术克隆三角帆蚌抗菌肽基因，并研究其组成型表达和诱导型表达。

随着 1953 年沃森和克里克发现了 DNA 双螺旋结构以来，便诞生了分子生物学这一新型科学。分子生物学一诞生，就以惊人的速度发展起来，成为新世纪最重要的学科之一。现在它已全面渗透到生命科学的各个领域，对生命科学各学科的发展起到了不可估量的促进作用。本书采用分子生物学的文库构建、基因克隆、表达、电泳等技术，研究了鱼类代表——草鱼和双壳类软体动物代表——三角帆蚌这两种水产动物的种

群和免疫基因的表达特征，为培育优良品种和预防水产动物疾病提供帮助，为水产动物疫苗研制提供理论指导。

许巧情

2010年3月

目 录

.....
 □□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□

摘要
 Abstract
 前言

- 第一章 草鱼干扰素调节因子 IRF-5 克隆及表达研究 1**
 - 第一节 干扰素调节因子 (IRF) 功能及鱼类 IRF 研究进展 1**
 - 1 干扰素调节因子的结构特征及分类 1
 - 2 干扰素调节因子在宿主免疫反应的作用 3
 - 3 干扰素调节因子抗肿瘤作用 16
 - 4 鱼类干扰素调节因子研究进展 18
 - 第二节 草鱼 IRF-5 基因克隆及表达 20**
 - 1 引言 20
 - 2 材料与amp;方法 20
 - 3 结果 30
 - 4 讨论 42

- 第二章 趋化因子受体 CXCR5 克隆以及表达研究 47**
 - 第一节 CXC 趋化因子及其受体研究概况 47**
 - 1 趋化因子及其受体特征 47
 - 2 趋化因子及其受体生物学功能 48
 - 3 鱼类趋化因子受体研究进展 51
 - 第二节 草鱼 CXCR5 克隆及表达研究 52**
 - 1 引言 52
 - 2 材料与amp;方法 53
 - 3 结果 57
 - 4 讨论 67

- 第三章 育珠蚌——三角帆蚌微卫星多态性 70**
 - 第一节 三角帆蚌不同组织 DNA 提取质量比较 70**

1 引言	70
2 材料与方法	70
3 结果与分析	71
4 讨论	73
第二节 不同固定剂对三角帆蚌 DNA 提取效果的影响	73
1 引言	73
2 材料与方法	74
3 结果	75
4 讨论	77
第三节 三角帆蚌微卫星多态性研究	77
1 引言	77
2 材料与方法	78
3 结果与分析	80
4 讨论	85
第四章 三角帆蚌抗菌肽基因的克隆与表达	87
1 引言	87
2 材料与方法	88
3 结果	91
4 讨论	95
参考文献	98
致谢	120

第一章

□□□□□□□□□□□□□□□□

草鱼干扰素调节因子 IRF-5 克隆及表达研究

第一节 干扰素调节因子 (IRF) 功能及 鱼类 IRF 研究进展

1 干扰素调节因子的结构特征及分类

干扰素家族 (interferons, IFNs), 是由干扰素诱生剂诱导生物细胞后所产生的一类高活性多功能的糖蛋白, 具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等生物学功能。IFN 蛋白家族基于它们的基因序列、染色体定位和受体特异性分为三型, 即 I 型、II 型和 III 型干扰素。I 型干扰素又称抗病毒干扰素, 包括 IFN- α 、 β 、 ω 、 ϵ 、 κ 、 δ 、 τ 、 ξ 等 (Pestka et al., 2004), 均为无内含子的单拷贝或多拷贝基因 (曲建慧和张玲霞, 2006); II 型干扰素由单基因家族 IFN- γ 构成, 又称为免疫干扰素, 主要参与诱导 MHC 类抗原的表达和免疫调节效应, 但其抗病毒作用比 I 型 IFN 弱 (李岩等, 2001); III 型干扰素是一种新发现的细胞因子, 与 I 型干扰素关系密切, 称为 IFN- λ (Kotenko et al., 2003), 研究认为, III 型干扰素有特殊的生理学功能 (Chelbi-Alix and Wietzerbin, 2007)。

Miyamoto 等 (1988) 首次发现, 干扰素调节因子 1 (IRF-1) 能结合 IFN- β 基因的上游调控序列, 从而介导病毒诱导的 IFN- β 基因转录。随后, 他们发现了 IRF-1 的抑制物 IRF-2, 两者结合于 IFN- β 基因的同—顺式作用元件 (IRF 增强子)。随着研究的深入, 干扰素调节因子家族又有七个成员被发现: IRF-3、IRF-4 (Pip/LSIRF/IC-SAT)、IRF-5、IRF-6、IRF-7、IRF-8 (ICSBP)、IRF-9 (ISGF3 γ /p48)。2002 年, 在红原鸡中又发现了 IRF-10 (Nehyba et al., 2002)。IRF 是一类结构特征上保守的转录因子家族, 所有的成员前 115 个氨基酸同源性较高, 具有 4~6 个保守间隔排列的色氨酸, 具有螺旋—转角—螺旋的 DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD)。除 IRF-6 外, 其他 IRFs 还包含一个羧基端干扰素调节因子交联结构域 (IRF association domain, IAD), 促进不同 IRF 形成异二聚体。目前, 得到认定的有两类 IAD: IAD2 包含富含 PEST (脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸和苏氨酸) 的区域, 位于 IRF-1 和 IRF-2 的调控区; IAD1 是一段大约 180 个保守氨基酸序列, 位于其他 IRF 的羧基端。IRF-2、IRF3、IRF4、IRF5 还包含抑制区, 在特定结合物存在或磷酸化时被活化。IRF-1、IRF-2 的羧基端均含有一个由几个酪氨酸残基组成的反式激活结构域 (transactivation domain), 这些酪氨酸残基被酪蛋白激酶磷酸化后增加 IRF-1、IRF-2 活性。一些成员还具有富含

脯氨酸 (Pro) 结构域和磷酸化调控位点等 (图 1-1)。这些修饰连同 IRF 家族不同成员之间的相互作用, 形成一个复杂的 IRF 调控系统。

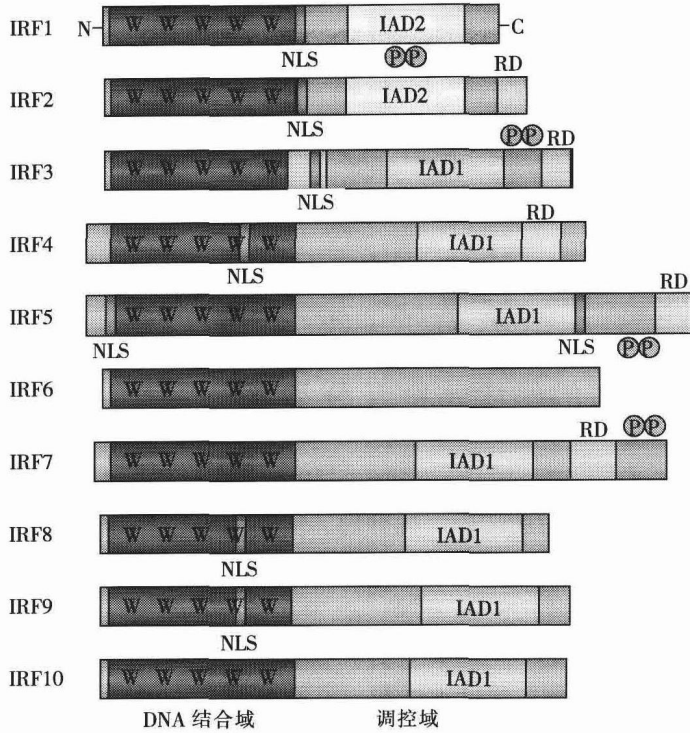


图 1-1 干扰素调节因子结构

(引自 Michael et al., 2005)

Fig. 1-1 Structure of interferon regulatory factors

(cited from Michael et al., 2005)

(所有 IRF 均包含 DNA 结合域 (DBD), 而且绝大部分 IRF 具有 5 个保守的色氨酸残基, 大多数 IRF 包含 1 个 IRF 交联结合域 (IAD)。一些 IRF 还包含抑制结构域 (RD) 和核定位信号 (NLS)。磷酸化位点用 P 表示, C 表示碳末端, N 表示氨基端)

All interferon-regulatory factors (IRFs) are composed of a DNA-binding domain (DBD). For most IRFs, the DBD is defined by 5 tryptophan (W) residues. Most IRFs also contain an IRF-association domain (IAD) of either type 1 or type 2. Some IRFs contain a repression domain (s) (RD) and a nuclear-localization signal (s) (NLS). For IRF1, -3, -5 and -7, activity depends on phosphorylation, as shown. C, carboxyl terminus; N, amino terminus.

干扰素调节因子通过 DNA 结合域结合到特定的 DNA 基序上, 如干扰素刺激反应元件 (IFN stimulated response element, ISRE), 存在于大多数干扰素诱导基因的启动子区域, 序列为 AGTTTCNNCNY; 干扰素共有序列 (IFN consensus sequence, ICS), 可被 ICSBP 识别结合, 发现于 I 型 MHC 启动子区域, 序列为 G/A G/C TTTC; 干扰素调节元件或正向调节区 (IFN regulatory elements I 和 III, IRF-E 或 positive regulatory domains, PRDs), 它发现于 IFN-β 启动子区域 G (A) AAA G/C T/C GAAAG/C T/C。

除了 10 个干扰素调节因子外, 在 Kaposi 恶性肿瘤还发现了三种病毒来源的 IRFs (vIRFs), 即 vIRF-1、vIRF-2 和 vIRF-3/潜伏性核相关抗原 2 (LANA2) (Gao et al., 1997; Offermann, 2007; Paun and Pitha, 2007)。三个 vIRFs N-末端与 IRF 的 DNA 结合域具有较高的同源性, 且 vIRF-1 与宿主细胞的 IRF-8 有很高的同源性 (Russo et al., 1996), vIRF-3 与宿主细胞的 IRF-4 存在较高的序列同源性 (Lubyova and Pitha, 2000)。但是这三个 vIRF 缺乏几个色氨酸残基, 而色氨酸残基是形成 DNA 结合域必需的, 因而, 它们不能直接与 DNA 结合。

2 干扰素调节因子在宿主免疫反应的作用

宿主免疫系统主要的功能是识别入侵的病原体。先天免疫系统依赖数量有限的生殖系编码 (germline-encoded) 模式识别受体 (pattern-recognition receptor, PRR), 来识别病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 如脂多糖和病毒核酸 (Janeway and Medzhitov, 2002)。根据病原体特性和细胞类型的不同, 模式识别受体中的病原体相关分子模式分别激活不同的信号转导通路, 引起 I 型干扰素、促炎细胞因子和趋化因子等目的基因的抗菌反应。核因子 κ B (NF- κ B) 是将模式识别受体转运到细胞核中最主要和特征描述最清楚的因子之一, 实际上它是由所有的模式识别受体激活的。在过去几年内, 大量的研究揭示了 IRFs 也参与大多数模式识别受体信号通路, 因而增强了先天免疫和适应性免疫的免疫激活能力。虽然 IRF-1、IRF-5 和 IRF-8 在 I 型干扰素基因下游的模式识别受体激活的过程中发挥一定的作用, 但起关键作用的是 IRF-3 和 IRF-7。在模式识别受体激活过程中, IRF-1、IRF-3、IRF-5 和 IRF-8 也能增强促炎细胞因子和其他基因的表达。下面归纳 IRFs 在模式识别受体信号通路中的作用。

2.1 IRFs 在细胞模式识别受体信号通路中调节 I 型干扰素产生

细胞模式识别受体, 包括维甲酸诱导基因-I (RIG-I) 家族、干扰素诱导的双链 RNA 蛋白激酶 (PKR)、依赖 DNA 的干扰素调节因子激活剂 (DAI) 和核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 (NOD) (Janeway and Medzhitov, 2002; Akira et al., 2006; Fritz et al., 2006)。

2.1.1 IRF-1 和 IRF-2 调节 I 型干扰素的产生

虽然 IRF-1 是发现的第一个能在体外激活 I 型干扰素的干扰素调节因子, 最初研究表明: IRF-1 能够结合到 IFN- β 启动子区域的正向调节区 I, 对 IFN- β 的转录起促进作用 (Escalante et al., 1998)。但在 IRF-1^{-/-} 小鼠胚胎成纤维细胞中用新城疫病毒诱导后, I 型干扰素表达量却很正常。这说明在病毒激活的细胞质 I 型干扰素产生的通路中, IRF-1 并不是必需的 (Matsuyama et al., 1993)。

IRF-2 对 IRF-1 起着颞颞的作用, 通常被认为是一个转录抑制因子。IRF-2 结合干扰素或干扰素诱导基因 ISRE 序列的竞争能力, 是 IRF-1 的数十倍, 使这些基因的表达处于一种抑制的状态 (Sato et al., 2001)。

2.1.2 IRF-3 和 IRF-7 调节 I 型干扰素的产生

继 IRF-1 和 IRF-2 发现之后, 又发现了 2 个结构非常同源的 IRFs: IRF-3 和 IRF-7, 它们在 RIG-I/MDA5 介导的 I 型干扰素产生的通路中发挥重要的作用。早期研究表明, IRF-3 和 IRF-7 诱导 I 型干扰素表达是一个正调控模式。I 型干扰素根据诱导后出现的时间, 可以分为两类: 早期反应的干扰素 (如 IFN- β 和人 IFN- α 1 或鼠 IFN- α 4) 和延迟反应的干扰素 (包括其他类型的 IFN- α)。IRF-3 在诱导早期反应的干扰素方面起着重要的作用, 主要调节 IFN- β 基因和 ISG 的表达, 它们的产生不需要新的蛋白质的合成。在病毒感染后, IRF-3 在 TANK 结合激酶 1 (TBK1) 作用下经过两次磷酸化后, 从细胞质中转移至细胞核内, 与细胞核内同样被磷酸化的 NF- κ B、ATF-2/c-Jun 结合, 完成转译后的激活。这些激活的转录因子与转录辅激活物 CBP/p300 和染色质高迁移率族蛋白一起, 在 IFN- β 启动子位置形成一个转录激活复合体, 从而启动早期反应的干扰素的转录。早期反应的干扰素, 通过自分泌和旁分泌的方式作用于自身或临近的细胞, 信号通过干扰素受体和 Jak-Stat 途径得以传递, 在这个过程中 IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) 被激活, IRF-7 的转录水平提高 (图 1-2)。病毒的感染通过磷酸化作用激活了 IRF-7, 而磷酸化的 IRF-7 主要促进晚期 IFN- α 基因和 ISG 的表达 (需要细胞新蛋白的合成) (Mamane et al., 1999; Sato et al., 2000; Taniguchi and Takaoka, 2002)。

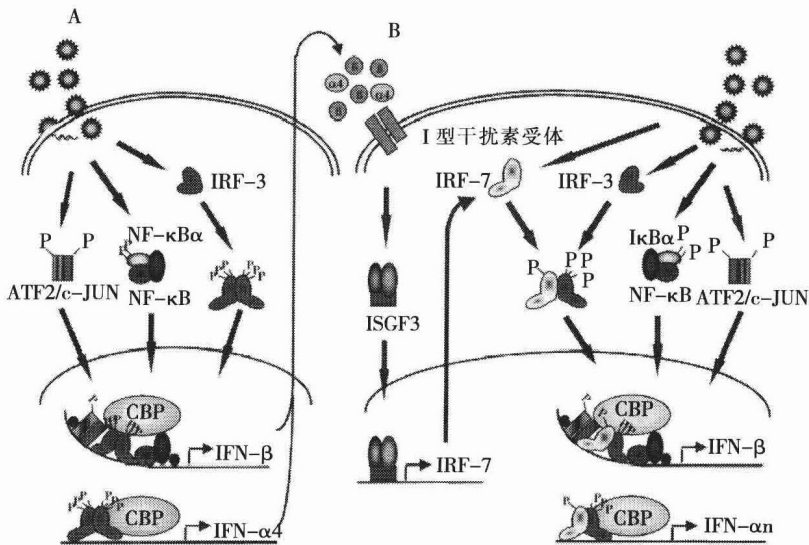


图 1-2 IRF-3 和 IRF7 在干扰素诱导中的作用

A. 早期反应的干扰素 B. 延迟反应的干扰素

(引自 Mamane, 1999)

Fig. 1-2 A schematic model of IFN gene induction in virus infected cells

A. Activation of immediate-early genes B. Activation of delayed-type genes

(cited from Mamane, 1999)

随后研究表明,在 IFN- $\beta^{-/-}$ 小鼠胚胎纤维原细胞中,IFN- α 的表达量下降 (Erlandsson et al., 1998),用新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 免疫 IRF-3 $^{-/-}$ 小鼠胚胎纤维原细胞后发现, I 型干扰素 mRNA 表达量下降 (Sato et al., 2000),用单链 RNA 病毒 [水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV); 脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV)] 免疫 IRF-7 $^{-/-}$ 小鼠胚胎纤维原细胞,结果表明,在早期反应和延迟期反应中,并未出现 I 型干扰素受病毒的诱导表达 (Honda et al., 2005)。这些说明虽然在病毒感染早期 IRF-7 的表达水平很低,但是在 IFN- α 和 IFN- β 的产生过程中,IRF-7 和 IRF-3 缺一不可,起决定作用的是 IRF-7 和 IRF-3 形成的异源二聚体,而非 IRF-3 形成的同源二聚体。随后,IRF-7 通过正反馈调节影响着延迟期反应中 I 型干扰素的产生。

2.1.3 IRF-5 调节 I 型干扰素的产生

2007 年,IRF-5 也被证实能在 RIG-I 信号通路中发挥作用 (Yanai et al., 2007)。研究表明:IRF-5 $^{-/-}$ 小鼠对水疱性口炎病毒易感,且 IRF-5 $^{-/-}$ 小鼠血清中 I 型干扰素表达量下降。IRF-5 对 I 型干扰素是否有调控作用,依细胞不同而有差异。用水疱性口炎病毒或单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV-1) 分别免疫 IRF-5 $^{-/-}$ 小鼠巨噬细胞和胚胎纤维原细胞,结果发现,前一种细胞中 I 型干扰素表达量很低,后一种细胞中 I 型干扰素的表达量却较高,可能是由于 IRF-5 在造血细胞中表达量本身就很高的缘故。此外,在 IRF-5 $^{-/-}$ 小鼠体内促炎细胞因子如 IL-6 表达量下降,用水疱性口炎病毒或单纯疱疹病毒感染小鼠血清和巨噬细胞,显示 IRF-5 对促炎细胞因子的表达有诱导作用。

虽然 IRF-5 和 IRF-3、IRF-7 一样能调节 I 型干扰素的转录,但两者又有差异,如 IRF-5 诱导 I 型干扰素的表达,具有病毒的特异性。新城疫病毒、水疱性口炎病毒、单纯疱疹病毒 I 型能激活 IRF-5,从而促进 I 型干扰素的表达。而能激活 IRF-3 和 IRF-7 的仙台病毒 (Sendai virus, SeV) 和双链 RNA (Poly I: C) 却不能激活 IRF-5 (Barnes et al., 2002b)。此外,在病毒感染后,IRF-5 能和 IRF-3 和 IRF-7 分别形成异源二聚体,但两者发挥截然不同的作用。在病毒感染之后,磷酸化之后的 IRF-3 和 IRF-5 能够形成异源二聚体,结合到 IFN- α 启动子上,促进 IFN- α 的转录。且 IRF-3 和 IRF-5 异源二聚体,比 IRF-5 同源二聚体结合能力要高得多,激活作用也更加有效。虽然在病毒感染的细胞中,IRF-7 和 IRF-5 也能够形成异源二聚体,但是这种异源二聚体对 IFN- α 转录却起着抑制作用。IRF-7 的磷酸化,而不是 IRF-5 的磷酸化,对形成异源二聚体是必需的 (Barnes et al., 2003a)。

2.1.4 IRF-8 调节 I 型干扰素的产生

最近研究表明,IRF-8 参与病毒刺激的树突状细胞 (dendritic cell, DC) 中 I 型干扰素的产生,IRF-8 结合在 I 型干扰素基因的启动子区域,可能参与随后的 IRF-7 介导的干扰素转录延迟时期的表达 (Tailor et al., 2007)。