

秦启伟, 黄晓红. 石斑鱼虹彩病毒 SGIV 感染致病的细胞分子基础及免疫防控对策 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 78-90.
QIN Qiwei, HUANG Xiaohong. Pathogenesis of Singapore grouper iridovirus (SGIV) and its immune control strategies[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(5): 78-90.

石斑鱼虹彩病毒 SGIV 感染致病的细胞分子基础及免疫防控对策

秦启伟, 黄晓红

(华南农业大学 海洋学院/教育部海洋生物资源保护与利用粤港澳联合实验室(培育)/广东省水产免疫与健康养殖工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要: 虹彩病毒 (Iridovirus) 是目前海水和淡水养殖鱼类最严重的病毒性病原之一, 已从 100 多种鱼类中分离鉴定出该病毒。石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) 是从新加坡养殖的患病石斑鱼中分离鉴定的高致病性虹彩病毒, 是虹彩病毒科 Iridoviridae 蛙病毒属 *Iridovirus* 1 种新的病毒。本文从以下几个方面对 SGIV 的研究进行综述: SGIV 的形态、超微结构及其在石斑鱼细胞中的复制和装配过程; SGIV 病毒基因组、转录组、囊膜蛋白质组及 miRNAs 的解析; SGIV 感染宿主靶标组织的鉴定; 病毒侵染的入侵方式、运动轨迹和胞内运输的实时追踪; SGIV 感染宿主引起类凋亡的死亡机制及介导的信号通路的揭示; 多种宿主免疫抗病基因对病毒感染的调节作用; 多种 SGIV 的检测技术, 包括基于抗体的流式细胞技术、微流控芯片检测技术、环介导等温扩增技术及核酸适配体检测方法等; SGIV 的灭活疫苗、亚单位疫苗和 DNA 疫苗的研制等。以期深入阐明 SGIV 感染致病机理奠定坚实的理论基础, 为发展抗病毒对策提供技术支撑。

关键词: 石斑鱼虹彩病毒; 病原分子特征; 病原-宿主互作; 检测技术; 免疫防控

中图分类号: Q939.4; S965.334

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)05-0078-13

Pathogenesis of Singapore grouper iridovirus (SGIV) and its immune control strategies

QIN Qiwei, HUANG Xiaohong

(College of Marine Sciences, South China Agricultural University/Joint Laboratory of Guangdong Province, Hong Kong and Macao Regions on Marine Bioresource Conservation and Exploitation, Ministry of Education (Incubation)/Guangdong Aquatic Animal Immunity and Health Aquaculture Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Iridovirus is one of the most serious viral pathogens in marine and freshwater cultured fish. Up to now, iridoviruses have been isolated and identified from more than 100 fish species worldwide. Singapore grouper iridovirus (SGIV), a novel species of *Ranavirus*, was isolated from diseased grouper in Singapore. On the basis of establishing a virus-sensitive cell infection model, morphology, ultrastructure, replication and biochemical characterization of SGIV in grouper host cells were studied by electron microscopy and biochemical analysis. The molecular biological characterizations of SGIV, including viral genome, transcriptome, envelope proteome and viral microRNAs, were systematically analyzed by Omics analysis. The interactions between SGIV and host were investigated from many aspects, including identifying the target tissues of SGIV infection, tracking the single virus

收稿日期: 2019-06-10 网络首发时间: 2019-07-22 17:08:55

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20190722.1521.012.html>

作者简介: 秦启伟 (1964—), 男, 教授, 博士, E-mail: qinqw@scau.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC0311302, 2017YFC1404504)

entry and transport, non-apoptosis cell death induced by SGIV infection, functions of host immune related genes in virus infection. Meanwhile, a variety of SGIV detection technologies have been developed, including antibody-based flow cytometry, microfluidic chip detection technology platform system, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and nucleic acid aptamer detection method. In addition, SGIV inactivated vaccine, subunit vaccine and DNA vaccine were developed. The results provide a theoretical basis for better understanding of the pathogenic mechanism of SGIV infection, and offer technical supports for the prevention and control of SGIV.

Key words: Singapore grouper iridovirus; molecular characteristic; viral-host interaction; detection method; immune control

随着水产养殖品种的增多和养殖规模的扩大,各种传染性疾病不断暴发和流行,已成为制约水产养殖业健康可持续发展的主要瓶颈。虹彩病毒(Iridovirus)是目前海水和淡水养殖鱼类最严重的病毒性病原之一,在世界各地已从100多种鱼类中分离鉴定出虹彩病毒^[1]。虹彩病毒是一类具正二十面体的双链大DNA病毒,直径为125~380 nm,基因组140~303 kb。目前虹彩病毒科Iridoviridae分为2个亚科5个属,即感染鱼类、两栖和爬行动物的虹彩病毒 α 亚科,包括蛙病毒属*Ranavirus*、肿大细胞病毒属*Megalocytivirus*、淋巴囊肿病毒属*Lymphocystivirus*,以及感染无脊椎动物的虹彩病毒 β 亚科,包括虹彩病毒属*Iridovirus*和绿虹彩病毒属*Chloriridovirus*^[2]。其中蛙病毒属成员是近年来在鱼类、两栖类和爬行类等低等水生脊椎动物中严重暴发和流行的病毒性病原,不仅严重威胁水生脊椎动物的多样性和生态安全,而且给水产养殖业造成重大经济损失。石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)是从新加坡患病的石斑鱼中分离鉴定出的高致病性虹彩病毒,2017年出版的第10版国际病毒分类手册中把SGIV正式确定为蛙病毒属的1个新种^[2]。SGIV极易感染中国和东南亚等国家和地区养殖的石斑鱼等海水鱼类。本文系统全面地综述了近年在SGIV分离鉴定、形态结构与复制装配、组学研究与功能基因分析、感染致病的细胞基础、宿主抗病毒免疫功能基因分析、分子检测和免疫防控技术等方面的研究进展。

1 SGIV的分离鉴定、形态结构和复制装配

1.1 建立对SGIV敏感的海水鱼类新细胞系

病毒作为简单的生物体不能自由存活,必须依赖宿主细胞进行复制和繁殖。鱼类细胞培养是进行鱼类病毒分离增殖,进而研究病毒致病机理、病毒宿主相互作用以及研制疫苗的基础。1962年Wolf

和Quimby建立了世界上第1个鱼类细胞系,截止2019年5月已建立至少200种鱼类细胞系。但是,仅少部分鱼类细胞系提交到美国典型培养物收藏库(ATCC)等国际性细胞收藏中心。提交的这些细胞系大多来源于传统的淡水鱼类,而对暴发和流行的重要海水鱼类病毒如虹彩病毒和神经坏死症病毒不敏感。近年来,根据海水鱼类的生理特点,通过改进培养基配方和摸索合适的培养条件,已自主建立10多种海水鱼类组织的永久细胞系,包括来源于石斑鱼脾、肾脏、肝脏、脑、鳃和尖吻鲈胚胎、卵形鲳鲹尾鳍、卵形鲳鲹脑及卵形鲳鲹头肾等组织的细胞系^[3-9]。上述细胞系对虹彩病毒、神经坏死症病毒和弹状病毒等多种新型鱼类病毒敏感,已在国内外广泛应用于海水鱼类病毒的分离培养、病毒-宿主相互作用、海洋生物功能基因分析及疫苗开发和药物筛选等研究。

1.2 SGIV的分离鉴定

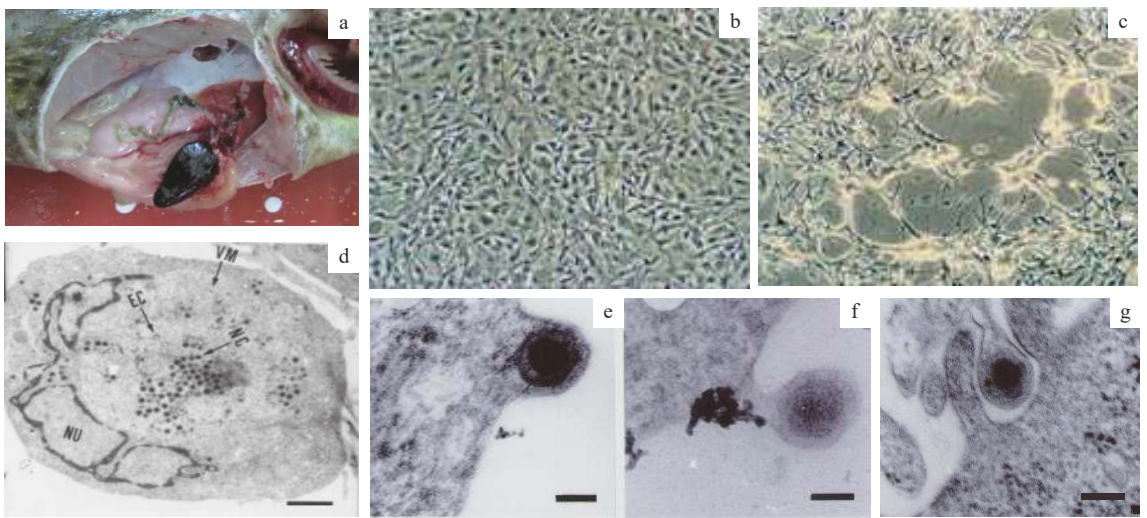
1994年,新加坡、印尼和马来西亚等东南亚国家养殖的石斑鱼暴发了一种类似于虹彩病毒病的严重传染性疾病,称为昏睡石斑鱼病(Sleepy grouper disease, SGD)。但采用当时现有的细胞系并没有分离出病毒,对病原缺乏相应的生化和分子生物学分析和鉴定。1998年,当类似的疾病再次暴发流行时,利用自主建立的细胞系,从患病石斑鱼*Epinephelus tauvina*脾脏中成功分离出病毒。该病毒感染力很强,在1周内造成石斑鱼的死亡率可达90%以上。生理、生化、分子生物学和基因测序结果表明,该石斑鱼病毒与虹彩病毒科蛙病毒属的模式种——蛙病毒3型(Frogvirus3, FV3)较接近,其主要衣壳蛋白在DNA和氨基酸水平的序列相似性分别为70%和69%。根据病毒的分子分类学原则,研究者认为这是一种新的病毒,并将其定名为SGIV(Singapore grouper iridovirus, SGIV)^[10-11]。目前,SGIV已得到国际病毒分类委员会的确认,在第10版国际病毒分类手册中被列为虹彩病毒科蛙病

毒属的 1 个新种^[2]。

1.3 SGIV 的形态结构及在宿主细胞内的复制和装配

在 SGIV-敏感细胞模型建立的基础上,应用电镜技术结合生化分析研究 SGIV 的形态、超微结构及其在细胞中的复制和装配过程。SGIV 存在于宿主细胞质中,为正二十面体,直径介于 154~176 nm,双层膜包围着一个 93 nm 的电子致密核,其核衣壳亚单位约为 5 nm。纯化的细胞外病毒颗粒具有 3 层膜结构,包括最外层的脂蛋白囊膜,中间层为具有规律排列的蛋白质衣壳,最内层为脂质膜。在电子显微镜下,初次观察到虹彩病毒粒子在细胞内发生和复制的各个阶段(图 1)。病毒粒子首

先吸附在宿主的细胞膜上,通过内吞作用进入细胞质中,被内吞入细胞的细胞质膜形成球形包围着病毒,病毒囊膜逐渐与细胞质膜融合并向外扩张,把细胞核推挤向一边并导致细胞核变形,从而在细胞中央形成一个巨大的病毒包涵体。在包涵体内可观察到大量病毒粒子复制和组装的不同阶段。同时,电镜观察结果揭示了虹彩病毒特有的自组装过程,病毒的核酸-蛋白质复合体核物质首先进入部分形成的开放式核衣壳中,然后开放式核衣壳封闭形成完整的病毒核衣壳,病毒核衣壳获得由宿主细胞质膜来源的囊膜包被,以出芽方式释放到细胞外,开始新一轮感染和复制^[10](图 1e~图 1g)。



a: 患病石斑鱼肿大的脾脏; b: 正常的石斑鱼脾细胞; c: SGIV 感染引起脾细胞明显的细胞病变; d: 感染细胞的超微结果观察, VM: 病毒装配区, EC: 空衣壳, MC: 成熟核衣壳, NU: 细胞核, 标尺 1 μm; e~g 分别表示 SGIV 病毒粒子的出芽、释放及重感染邻近细胞, 标尺为 100 nm

a: The enlarged spleen of diseased grouper; b: Mock grouper spleen cells; c: The cytopathic effects induced by SGIV infection; d: Ultrastructural observation of infected cells, VM: viromatrix, EC: empty capsid, MC: matured nucleocapsid, NU: nucleus, scale bar is 1 μm; e~g indicate budding, release and reinfection of SGIV particles respectively, scale bars are 100 nm

图 1 SGIV 病毒的分离、纯化及细胞内的复制增殖^[3, 10-11]

Fig. 1 Isolation and purification of SGIV and its replication in cells

2 SGIV 的组学研究及功能基因分析

2.1 SGIV 的基因组、转录组、囊膜蛋白质组及病毒 miRNAs 解析

通过基因组、蛋白质组和转录组等技术全面开展 SGIV 的病原分子生物学特征分析。率先完成 SGIV 的全基因组序列测定(登录号 AY521625)。SGIV 基因组为 140 kb 的双链 DNA, 包含 162 个开放阅读框(Open reading frame, ORF), 分别编码 41~1 268 个氨基酸的蛋白质。其中, 超过一半的 ORF(85 个)为未知基因。

蛋白质组学研究分析鉴定到 29 个编码病毒蛋白的基因, 发现与致病和抗原等有关的 20 个新病

毒基因^[12]。同时, 通过 Triton X-100 处理纯病毒采用 SDS-PAGE 成功分离病毒囊膜和核衣壳。应用 SDS-PAGE 结合 MALDI-TOF-MS/MS(1-DE-MALDI-TOF-MS/MS) 技术成功分离并鉴定 9 个 SGIV 的囊膜蛋白, 而应用 LC-MALDI-TOF-MS/MS 技术鉴定出 19 个病毒囊膜蛋白。其中, 用 2 种技术均鉴定出 4 个病毒基因(*ORF 016L*、*ORF 019R*、*ORF 088L* 和 *ORF 039L*) 编码的囊膜蛋白。随后, 通过免疫胶体金电镜等技术进一步验证了 019R、088L 和 039L 为病毒的囊膜蛋白^[13-15]。有趣的是在病毒囊膜成分中还鉴定到 5 个宿主编码的蛋白, 包括病毒诱导胁迫蛋白、类似核糖体结合蛋白、离子通道蛋白、发动蛋白和类似血影蛋白, 推测这些蛋白可能是整合于病毒囊膜的宿主蛋白, 在病

毒感染细胞、内吞以及组装等过程中起重要作用^[13]。

在 SGIV 病毒的转录组学研究方面,制备了包含 SGIV 所有 ORF 的全基因组基因芯片,并运用基因芯片技术完成 SGIV 体外感染石斑鱼脾细胞(GS)和体内感染石斑鱼脾组织的转录图谱,初步界定出 SGIV 的 3 类不同表达时相的转录本。SGIV 基因在体内体外感染过程中的转录模式有很大的差异,SGIV 在体外感染 GS 细胞中,共有 15 个立即早期(Immediate early, IE)、89 个早期(Early, E)和 53 个晚期(Late, L)转录本。SGIV 在体内感染的转录模式更为复杂,宿主可能主要通过抑制与病毒复制有关的 IE 和 E 期转录本来破坏病毒的复制机制,从而产生免疫清除效应^[16]。

为揭示 SGIV 在其感染过程中是否编码 miRNA,将感染了 SGIV 不同时期的石斑鱼胚胎细胞混合后构建小 RNA 库,通过 Illumina/Solexa 深度测序,共得到 34 400 个病毒来源小 RNAs,经过一系列生物信息学分析鉴定出 16 个 SGIV 编码的 miRNAs。其中 SGIV-miR-homoHSV 与 HSV-2 miR-H4-5p 序列相似度较高,提示 miRNAs 在远源病毒种中比较保守。SGIV miRNAs 分散分布于基因组中,在其 3'端或 5'端存在序列或长度的异质性。茎环实时量荧光-PCR 及荧光素酶报告基因试验证实,其中 11 个 miRNAs 在 SGIV 感染的细胞中有表达,且具有生物学活性^[17]。

2.2 SGIV 的功能基因组学研究

2.2.1 IE 基因

IE 基因的转录出现在病毒 DNA 复制之前,可以对病毒基因和宿主细胞基因的表达进行调控,并能够影响宿主细胞周期、细胞凋亡和细胞免疫反应。生物信息学分析及转录组学分析推测 *ORF086R(ICP18)* 和 *ORF162L(ICP46)* 为 SGIV 的 2 个 IE 基因。利用放线菌酮和阿糖胞苷进行的药物抑制试验证实了 *ICP18* 和 *ICP46* 为 IE 基因。*ICP18* 和 *ICP46* 分别为 SGIV 核衣壳蛋白和新的病毒结构蛋白。由于病毒感染细胞中 2 个病毒蛋白的相对分子质量与推定的相对分子质量有差异,推测在感染过程中产生了一定的修饰。亚细胞定位观察结果表明, *ICP18* 和 *ICP46* 为胞质型蛋白。过表达 *ICP18* 和 *ICP46* 均能促进细胞的生长和 SGIV 的增殖,表明 SGIV 的 IE 基因可能通过调控细胞的生长而促进病毒复制^[18-19]。

2.2.2 囊膜蛋白

囊膜在病毒侵染致病过程中发挥着重要作用,对囊膜蛋白的深入研究有利于发现与阐明虹彩病毒囊膜蛋白的生物学功能,并为病毒防治提供理论依据。在 SGIV 囊膜蛋白质组学研究的基础上,对部分 SGIV 的囊膜蛋白进行了验证和

功能分析。SGIV VP88 是虹彩病毒科 1 个保守的病毒蛋白,该蛋白具有跨膜结构、糖蛋白修饰、精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列(Arg-Gly-Asp, RGD)结构域。VP88 存在于病毒囊膜组分中,并定位于病毒囊膜上,证明 VP88 为 SGIV 的囊膜蛋白。此外,黏附试验表明,VP88 黏附于细胞表面,且 VP88 重组蛋白能够竞争性抑制病毒感染宿主细胞,推测其可能具有介导病毒黏附宿主细胞的功能^[13]。

囊膜蛋白组学研究结果也表明,SGIV VP19 可能为病毒的囊膜蛋白。与 VP88 类似的是,VP19 也存在于病毒囊膜组分中,且定位于病毒囊膜,证实 VP19 也是病毒的外囊膜蛋白。表达时序和药物抑制试验结果同时显示,VP19 是 SGIV 的晚期转录本。在感染细胞中,VP19 呈现与病毒加工厂共定位的特征。此外,VP19 抗体对病毒入侵具有强烈的抑制作用,推测 VP19 可能在病毒入侵阶段发挥重要作用^[14]。

2.2.3 免疫调节蛋白

虹彩病毒和哺乳类 DNA 病毒类似,也通过编码一些免疫调节蛋白类似物来调控病毒感染后的细胞命运。全基因组注释表明,SGIV *VP136* 编码脂多糖诱导肿瘤坏死因子(LITAF)类似物;而 *VP50*、*VP51* 和 *VP96* 编码肿瘤坏死因子受体(Tumor necrosis factor receptor, TNFR)类似物。研究发现 SGIV *LITAF* 作为早期基因,主要在细胞质内表达,并和线粒体相关。*LITAF* 的表达能够明显地诱导细胞凋亡,同时伴随线粒体膜电势减低和 Caspase-3 的活性增强。此外,在 SGIV *LITAF* 过表达的细胞中,NF- κ B 和 NFAT 的活性也增强了^[20]。有意思的是,SGIV *LITAF* 与石斑鱼细胞来源 *LITAF* 存在共定位,推测两者可能通过互作调节细胞凋亡^[21]。

对 SGIV TNFR 类似物的研究表明,尽管 SGIV *VP50*、*VP51* 和 *VP96* 均编码肿瘤坏死因子受体基因类似物,但含有的 TNFR 功能结构域-半胱氨酸富集结构域(Cysteine-rich domain, CRD)的数目存在明显差异,分别为 4、3 和 2 个,且三者细胞中的亚细胞定位更是完全不一样,其中 *VP50* 在细胞质内呈弥散性均匀分布,第 1 个 CRD 对其细胞内定位和功能有影响。SGIV *VP51* 也定位于细胞质中,CRD1、CRD2 和跨膜结构域的缺失对 *VP51* 亚细胞定位有较大影响。在表达时序上,3 个病毒基因也不尽相同。*VP50* 和 *VP51* 为病毒的立即早期基因,*VP96* 为病毒早期基因,揭示这 3 个病毒的 TNFR 类似物可能在病毒的感染过程中发挥不同的作用。过表达和缺失重组病毒的试验结果表明,体外过表达 *VP96* 能够促进细胞生长,并抑制病毒诱导的细胞凋亡,而过表达 *VP51* 促进细胞的生长和调节细

胞周期,且过表达 VP51 显著抑制病毒诱导的细胞凋亡及 Caspase-3 活性,而促进病毒复制。相反地,缺失 VP51 诱导细胞凋亡的能力增强,而病毒的毒力显著减弱,提示 VP51 是病毒感染复制的重要毒力因子。VP51 缺失调节了病毒感染细胞或鱼体后宿主干扰素相关免疫因子或炎症因子的表达。推测 VP51 作为病毒重要毒力因子,可能通过调节宿主细胞凋亡和免疫炎症反应,从而影响病毒的感染与增殖^[22-24]。对 SGIV TNFR 类似物的功能研究对于阐明 SGIV 感染过程中的免疫逃避机制具有重要意义。

2.2.4 病毒编码与细胞生长、信号转导相关基因的功能分析 SGIV 全基因组的生物信息学分析结果表明,病毒编码的一些基因可能参与调节细胞的生长和信号转导,如 SGIV ORF049R 编码 1 个尿嘧啶脱氧核糖核苷酸磷酸酶 (dUTPase),该基因为病毒的 IE 基因,分布在细胞核外的胞质区,且基因序列中的核输出信号对该基因的输出细胞核起决定性作用^[25]。SGIV ORF062R 含有 1 个保守的胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF) 结构域,为 IGF 类似物。SGIV-IGF 以点状定位于胞质中,过表达 SGIV IGF 可促进细胞生长和调节细胞周期从 G1 期向 S 期转换^[26]。SGIV ORF155R 编码信号素 Semaphorin 类似物,为病毒早期基因。SGIV semaphorin 在病毒感染的细胞中主要定位于胞质及细胞膜上。过表达 SGIV semaphorin 对细胞生长没有影响,但可以通过改变细胞骨架结构促进 SGIV 复制^[27]。

2.2.5 SGIV miRNA 对病毒基因的调控 在前期鉴定 SGIV 编码 miRNA 的基础上,进一步对部分病毒编码的 miRNA 靶基因进行验证。病毒基因主要衣壳蛋白 MCP 的序列与 SGIV miR-13 互补,且 miR-13 可通过抑制 SGIV MCP 的表达,从而影响 SGIV 感染,证明 SGIV MCP 是 miR-13 的靶基因^[28]。此外,生物信息学分析显示,SGIV miR-homoHSV 的靶基因是 SGIV LITAF。miR-homoHSV 可以抑制 SGIV 诱导的细胞凋亡,且该作用可能通过抑制 SGIV LITAF 实现^[29]。

3 SGIV 感染致病的细胞基础

3.1 SGIV 在石斑鱼宿主体内的感染分布

对感染 SGIV 的石斑鱼进行传统的病理解剖观察发现,脾是 SGIV 感染最重要的靶器官。根据 SGIV 标志性蛋白—主要衣壳蛋白特异性基因序列,由地高辛标记的核酸分子探针对 SGIV 感染的石斑鱼组织器官进行原位杂交。结果发现,肾组织中的病毒信号最强,其次是脾、肝、肠道、胃和鳃等。SGIV 主要感染这些器官组织的上皮和内皮细胞^[30]。

3.2 SGIV 感染宿主细胞的入侵方式、运动轨迹及侵染机制

病毒吸附进入细胞是病毒感染的第一步。已有研究表明,虹彩病毒进入寄主细胞多依赖于网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞途径。运用单病毒粒子示踪技术结合分子生物学及免疫学技术,从时间、空间尺度多层次揭示 SGIV 的侵染机制。研究结果表明 SGIV 进入宿主细胞是通过网格蛋白和巨胞饮途径,而非小窝蛋白介导的胞吞途径。同时在活细胞水平实时监测到 SGIV 病毒沿着微管和微丝运动,经过早、晚期内吞体,最后到达溶酶体,且病毒的进入依赖于低 pH。进一步研究证实 SGIV 编码的病毒蛋白 VP69 和 VP101 可能与内吞体 Rab7 发生相互作用^[31-32](图 2)。

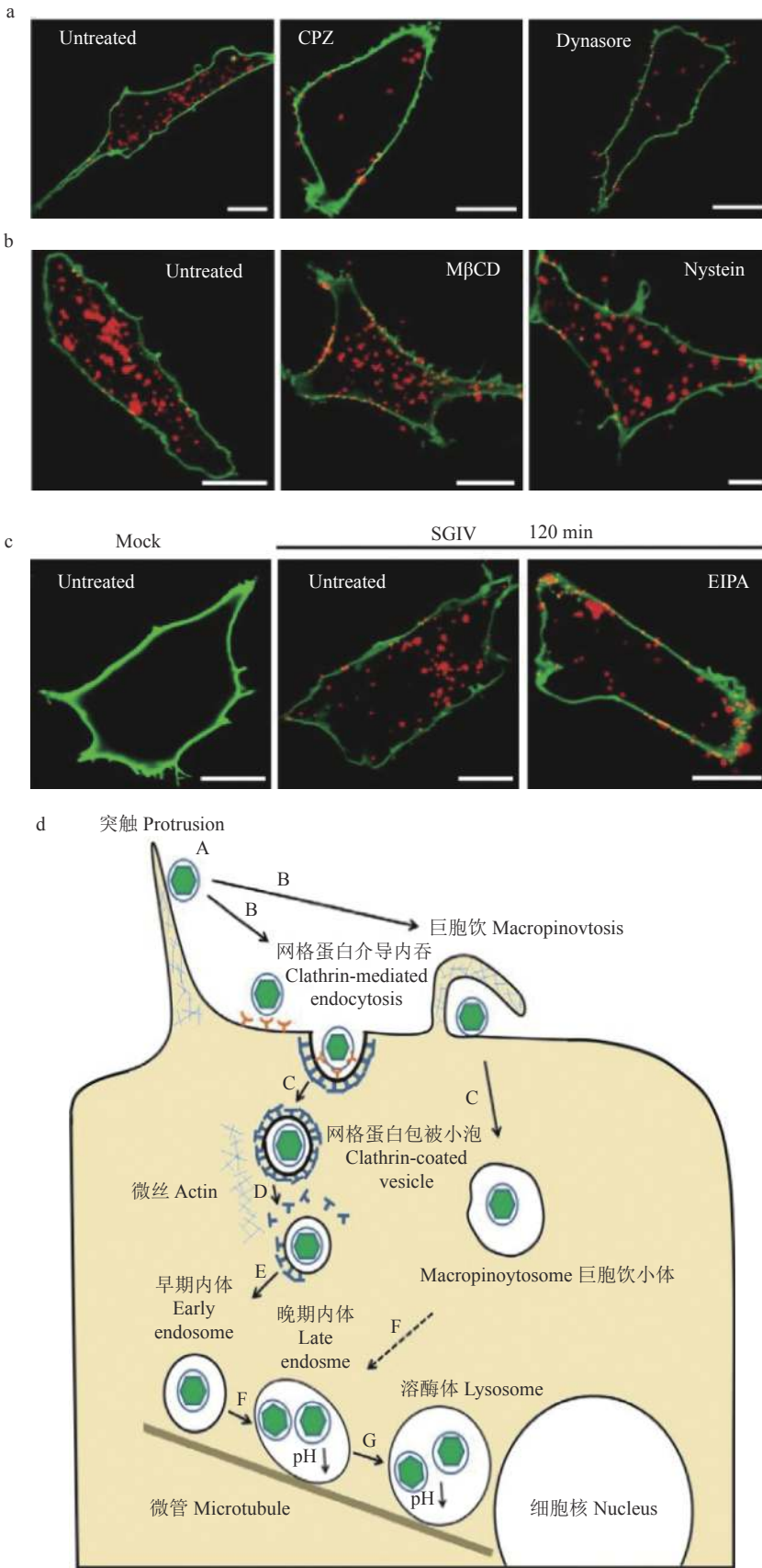
通过自主建立的基于原子力显微镜的微观生物力测量新方法—力示踪技术应用于研究 SGIV 侵染宿主细胞机制。病毒粒子进入细胞的位移峰值分别为 180.2 和 81.0 nm,分别对应于病毒粒子连接在探针尖端或侧面时进入细胞的情况;2 种情况下,病毒粒子进入细胞的时间分别为 1.42 和 0.82 s。病毒粒子的最大瞬时速度约为 200 nm/s。而应用恒定位置模式的力示踪技术能够测量单个 SGIV 病毒粒子进入宿主细胞的作用力,单个 SGIV 病毒粒子受到细胞的内吞作用力为 60.8 pN^[33]。相关研究结果极大地丰富了对虹彩病毒进入宿主细胞方式的认识,也拓展了单病毒粒子示踪技术在水生动物大分子 DNA 病毒研究中的应用。

3.3 SGIV 感染诱导的细胞死亡机制

细胞死亡是多细胞生物生命过程中重要的生理或病理现象。病毒在感染过程中,会引起细胞发生一系列形态变化,最终走向死亡,然而不同病毒诱发细胞死亡的方式和机制存在差别。我们利用自主建立的 GS,比较 SGIV 感染引起宿主细胞 GS 和非宿主胖头鲤细胞 (Fathead monnow cell line, FHM) 死亡的异同,结果表明 SGIV 诱导细胞死亡具有细胞类型依赖性,即 SGIV 感染 GS 引起类凋亡,而感染 FHM 引起经典的凋亡^[34],且 SGIV 诱导的类凋亡依赖于病毒复制和新生蛋白合成,而 SGIV 诱导的细胞凋亡不需要病毒复制,表明病毒编码的蛋白能够诱导细胞凋亡。类凋亡是 2000 年 Sperandio 发现的一种新的细胞死亡类型,而 SGIV 引起的类凋亡是病毒感染诱导类凋亡的首次报道。

3.4 SGIV 对宿主细胞信号通路的调节作用

为更好地阐明 SGIV 感染致病的分子机制,利用转录组高通量测序分析 SGIV 感染石斑鱼前后脾



a~c: SGIV 病毒进入依赖于网格蛋白和巨胞饮, 而不依赖于小窝蛋白, 标尺为 10 μm; d: SGIV 进入细胞的模式图

a~c: SGIV enters grouper cells via the clathrin-mediated endocytic pathway and micropinocytosis, but not via caveola-dependent endocytosis, scale bars are 10 μm; d: Model entry route of SGIV into GS cells

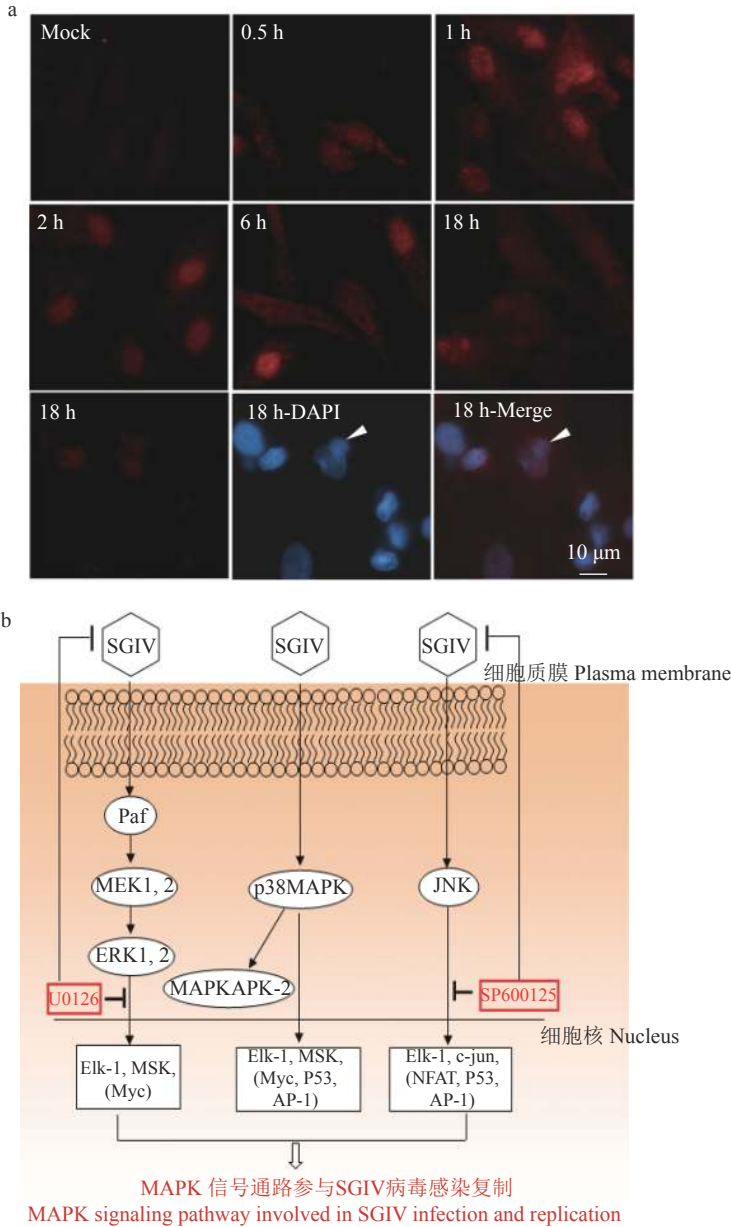
图 2 SGIV 病毒进入介导的内吞方式^[32]

Fig. 2 The endocytosis mediated by SGIV entry

组织中的基因表达情况,发现细胞内信号通路,如 MAPK 在 SGIV 感染后发生不同程度上调或下调,推测 MAPK 在病毒感染过程中可能发挥着关键的作用^[35]。进一步研究表明,SGIV 能显著激活 ERK、p38MAPK 和 JNK 分子的磷酸化,但激活形式有明显差别。对病毒 SGIV 感染复制而言,仅 ERK 和 JNK 信号是必需的, p38MAPK 信号则参与 SGIV 诱导的细胞死亡^[34, 36](图 3)。为深入了解 SGIV 对 MAPK 信号的操控机制,克隆并鉴定了石斑鱼丝裂

原活化蛋白激酶激酶 7(MAPkinase kinase 7, MKK7)、p38MAPK、JNK1、JNK2、JNK3 及 c-Jun 在 SGIV 感染过程中的功能,发现 c-Jun 在 SGIV 感染晚期转位到病毒装配区,推测 c-Jun 可能与病毒蛋白发生相互作用从而调控病毒复制^[37-42]。

泛素-蛋白酶体系统是真核细胞内蛋白质降解的重要组成部分,在多种细胞进程中发挥着重要作用。此外,病毒侵染宿主细胞后,细胞的泛素系统与一些关键病毒蛋白发生复杂的相互作用,从而参与



a: SGIV 能激活 ERK 的磷酸化; b: SGIV 感染对 MAPK 信号通路的激活情况及 MAPK 信号通路在病毒感染过程中的作用模式图, SGIV: 新加坡石斑鱼虹彩病毒, MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶, MEK: MAPK 激酶, ERK: 细胞外调节蛋白激酶, JNK: c-Jun 氨基末端激酶, MAPKAPK: MAPK 激活蛋白激酶

a: SGIV induces phosphorylation of ERK; b: Activation of MAPK signaling pathway induced by SGIV infection and the action of MAPK signaling pathway during virus infection, SGIV: Singapore grouper iridovirus, MAPK: mitogen-activated protein kinase, MEK: MAPK kinase, ERK: extracellular regulated protein kinases, JNK: c-Jun amino-terminal kinase, MAPKAPK: MAPK-activated protein kinase

图 3 SGIV 能显著激活 MAPK 信号通路中关键的信号分子^[34, 36]

Fig. 3 SGIV infection significantly activates the key molecules in the MAPK signaling pathway

调节病毒的生活周期,包括病毒进入和运输以及病毒基因转录、蛋白合成、核酸复制、病毒出芽和释放等过程^[43-44]。SGIV 感染细胞的转录组学分析数据显示,泛素-蛋白酶体信号途径中 65 个基因受到不同程度的调控。抑制蛋白酶体的活性能够明显减少 SGIV 体外复制,抑制病毒装配区的形成,以及病毒基因转录和蛋白胞内的转运。而过表达石斑鱼泛素能部分回补蛋白酶体抑制剂对 SGIV 复制的抑制作用,表明蛋白酶体系统能够参与 SGIV 的复制。采用二维电泳和基质辅助吸附/电离时间-荧光质谱法,筛选 SGIV 感染过程中蛋白酶体系统调节的病毒或宿主蛋白,共鉴定出 62 种不同表达蛋白,包括 15 种病毒和 47 种宿主蛋白。宿主蛋白参与泛素介导的蛋白质降解、代谢、细胞骨架、大分子生物合成和信号转导^[45]。三重基序蛋白(The tripartite motif-containing protein, TRIM) 家族是一类结构保守、进化快速的 E3 泛素蛋白连接酶,参与生物诸多重要的生理生化过程。研究证明石斑鱼的多个 TRIM 蛋白参与调节免疫反应,从而影响病毒复制,TRIM25、TRIM8 和 TRIM32 正调控干扰素反应或炎症因子,抑制病毒复制^[46-48],而 TRIM62、TRIM82、TRIM35、TRIM16L 和 TRIM13 负调控干扰素信号相关因子和促炎因子,促进 SGIV 的病毒复制^[49-53]。

4 SGIV 的分子检测技术

迄今为止,尚无有效防治鱼类虹彩病毒病的方法。对病毒进行早期诊断和检测,是防控病毒病暴发和流行的重要措施。基于免疫学及分子生物学的原理,已研制开发出多种针对 SGIV 及病毒感染细胞的快速检测技术。

4.1 流式细胞技术

基于免疫荧光抗体染色的流式细胞技术已经应用于人类医学病毒如爱滋病毒和登革热病毒的快速检测诊断。被病毒感染的细胞与耦联有荧光染料的特异性抗体结合后,可被流式细胞仪捕捉到并定量检出。利用自主制备的抗 SGIV 单克隆抗体,研制出一种新型的流式细胞检测技术,对感染鱼体和存在于海洋环境中的虹彩病毒进行大规模、快速和定量的检测^[54]。流式细胞技术对于 SGIV 疫苗研制和抗病毒药物的快速和高通量筛选具有很高的研究和应用价值。

4.2 SGIV 的微流控芯片检测技术平台系统

近年发展的微流控或称芯片实验室技术平台(Lab-on-a-chip) 可以实现在微升级的反应器内对病原微生物进行快速免疫学检测,极大降低检测样品

和反应试剂的用量,缩短检测的时间。针对 SGIV,利用硅和有机高分子材料研究开发出一系列大小只有 2 cm×2 cm 的芯片实验室系统。基于抗体作探针的 Lab-on-a-chip 系统只需 3~5 min 即可检测出感染 SGIV 的单个细胞。此外,利用量子点(Quantum dot, QD) 荧光标记结合抗体包被微珠技术直接检测到 SGIV 病毒粒子,检测信号灵敏、稳定^[55]。该系统在海洋微生物功能基因组学,以及新药筛选、病原检测、环境保护、食品安全和外来生物入侵等方面具有重要的研究和应用价值。

4.3 SGIV 的 LAMP 检测方法

针对 SGIV 特异基因(*ORF-014L*) 的核酸序列,建立了一种简单、快速、敏感而且特异性高的检测方法 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)。该方法的检测灵敏度为 0.02 fg 质粒 DNA(相当于 6.3 拷贝病毒基因组 DNA)。应用该方法成功检测感染细胞以及鱼组织中的 SGIV,并有潜力应用于野外检测^[56]。

4.4 SGIV 核酸适配体的筛选及检测方法

指数富集的配基系统进化技术(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 是一种生物文库筛选技术,由于核酸适配体具有筛选靶物质广泛、特异性强、亲和力高等诸多优点,目前已发展成为一种备受关注的新型检测和治疗工具。以 SGIV 病毒或病毒感染细胞为筛选靶标,综合运用 SELEX、磁性分离、流式细胞分析、凝胶阻滞和荧光显微观察等技术筛选获得高特异性的核酸适配体。筛选得到的核酸适配体无任何毒副作用;部分适配体可以抑制病毒的感染^[57-58]。基于病毒感染细胞筛选得到的核酸适配体,研发出新型的酶联免疫检测技术(Aptamer-based enzyme-linked apta-sorbent assay, Apt-ELASA)。Apt-ELASA 可以在石斑鱼养殖过程中快速检测虹彩病毒的感染,具有操作简便快捷、稳定性强、灵敏度高等优点^[59]。

5 石斑鱼抗病毒免疫相关基因的鉴定和功能研究

5.1 一种新型抗 SGIV 蛋白的分离和鉴定

为从海洋生物中获得能与病毒结合的抗病毒蛋白,用纯化的石斑鱼虹彩病毒作配体,采用亲和层析技术从斑节对虾血淋巴中分离出一种能与 SGIV 结合的蛋白,经蛋白质组学技术鉴定为血蓝蛋白。鱼类病毒感染抑制试验结果表明,该血蓝蛋白具有非特异性广谱抗病毒活性,能抑制 SGIV 和神经坏死症病毒等多种鱼类病毒^[60]。这为鱼类抗病

毒研究提供了一种新的思路。

5.2 石斑鱼免疫相关基因的筛选和功能分析

利用抑制性消减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 结合基因芯片技术, 成功构建了石斑鱼感染 SGIV 的 SSH 文库, 获得 413 个差异表达基因, 其中有 13 个免疫相关基因^[61]。利用 454 高通量测序技术, 完成了 SGIV 感染前后石斑鱼的转录组分析, 揭示多个基因与免疫和抗病毒相关^[35]。在石斑鱼模式识别受体及信号通路中关键分子研究方面, 已克隆并鉴定一系列 RLR 或 cGAS/STING 信号通路中接头分子及干扰素刺激基因, 包括黑色素瘤分化相关基因 5 (Melanoma differentiation associated gene 5, MDA5)、LGP2 (Laboratory of genetics and physiology 2)、线粒体抗病毒信号蛋白 (Mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)、肿瘤坏死因子受体相关因子 (TNF receptor associated factor, TRAF)、干扰素基因刺激剂 (Stimulator of interferon genes, STING) 和 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1)、干扰素调节因子 3 (Interferon regulator factor, IRF)、IRF7 和核因子 κ B 激酶抑制剂 (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase, IKK α), 并完成了部分基因的抗体制备和抗病毒功能活性的验证^[62-70], 证明在石斑鱼的 GS 细胞中存在完整的 RLR 或 cGAS/STING 的信号通路。前期的研究结果推测 SGIV 能够调节 Janus 激酶/信号转导与转录激活子 (JAK-STAT) 信号通路, 为探讨该信号通路是否参与病毒复制, 克隆和证明了 JAK-STAT 信号通路及下游关键分子在 SGIV 感染过程中的作用, 包括 STAT1、STAT3 和干扰素刺激基因 15 (Interferon stimulated gene 15, ISG15)^[71-72]。此外, 还克隆表达了多个石斑鱼凝集素基因, 包括 C 型凝集素 (C-type lectin, CTL), C 型凝集素样 (C-type lectin-like) 和半乳糖凝集素基因, 过表达石斑鱼的半乳糖凝集素基因能抑制 SGIV 病毒的复制^[73-75]。

在石斑鱼抗病功能蛋白研究方面, 克隆鉴定了石斑鱼抗菌肽、溶菌酶和防御素等重要的抗病基因。如石斑鱼抗菌肽 Hecpudin 1 和 Hecpudin 2 不仅具有明显的抗菌活性, 也能明显地抑制 SGIV 复制^[76]。防御素是一类在宿主先天性免疫中具有重要作用的内源性抗菌肽。石斑鱼的防御素能够诱导 I 型干扰素相关的免疫反应, 对病毒 SGIV 和 VNNV 表现出双重抗病毒活性^[77]。在石斑鱼中克隆到 C 型和 G 型 2 类溶菌酶, 其中 C 型溶菌酶的重组蛋白对溶壁微球菌、溶藻弧菌、金黄色葡萄球菌和海豚链球菌都有一定的抑制作用, 且过表达该基因能抑制

SGIV 复制, 而 G 型溶菌酶仅显示出较强的溶菌活性, 对病毒复制没有明显影响^[78-79], 推测石斑鱼 G 型溶菌酶可能主要参与石斑鱼抗菌天然免疫反应。石斑鱼抗病功能蛋白的筛选和鉴定可为石斑鱼抗病毒药品的研制提供重要的理论信息。

6 SGIV 免疫防控的研究

化学药物的滥用容易造成环境污染和药物残留, 也使得病原对抗生素的耐药性日益增强, 因此开发低成本、高效疫苗以及具有抗菌、抗病毒功能的产品, 对重大流行性疾病进行免疫防治, 已成为国际主流的研发方向。使用甲醛和 β -丙内酯对 SGIV 进行灭活, 制备病毒感染细胞的灭活疫苗, 所制得的 SGIV 灭活疫苗具有高度安全性, 对病原的相对免疫保护率为 92.3%。说明 SGIV 灭活疫苗具有较好的免疫保护效力, 对防治 SGIV 病毒病有很高的应用价值^[80]。免疫学分析结果表明, SGIV 灭活疫苗可能通过激活 I 型干扰素信号通路或鱼类体液和细胞免疫反应从而达到抵抗病原感染的目的。此外, 根据 SGIV 全基因组序列信息, 运用反向疫苗学分析方法, 从大量的病毒编码基因中鉴定到了 3 个能产生明显保护作用的基因: SGIV VP36、SGIV VP39 和 SGIV VP72, 其相对保护率分别是 50.00%、66.67% 和 66.67%^[81], 其中, 将 SGIV VP72 表达的蛋白与氢氧化铝佐剂配伍后制备成亚单位疫苗, 免疫鱼体后疫苗相对保护率约达到 68%。鉴于 DNA 疫苗和亚单位疫苗免疫效果欠佳, 需要配伍合适的佐剂才能有效提高疫苗的免疫保护效果。

7 展望

对 SGIV 的研究从病毒分离、纯化、理化性质、感染致病分子机制及免疫防控等多方面已取得重要进展。未来还需要从以下方面开展研究工作: 1) 深入研究病毒基因的功能, 由于 SGIV 是蛙病毒属的新种, 存在大量未知的功能基因, 针对这些未知功能的基因开展研究不仅能够帮助我们了解病毒更深层次的致病机制, 而且可以为弱毒疫苗研发提供参考; 2) 继续开展病毒与宿主互作机制的研究, 对 SGIV 进入宿主细胞的受体开展研究, 将帮助我们理解病毒进入宿主细胞的精细机制, 同时可为有效抗病毒药物的开发提供有效靶标; 3) 开展病毒感染的代谢免疫组学研究, 结合多组学、病理学、生物化学和细胞分子生物学等技术手段, 从病毒感染引起宿主体内外的代谢物-基因-蛋白及病理变化等多层次整合分析病毒感染导致细胞代谢变化与

病理变化的关联性,阐明病毒调节和利用宿主代谢、以及宿主应对病毒侵染的代谢免疫调控作用机制,深入揭示 SGIV 病毒与宿主细胞相互作用的分子机制。

参考文献:

- [1] GRAY M J, CHINCHAR V G. *Ranaviruses: Lethal pathogens of ectothermic vertebrates*[M]. SpringerOpen, 2015.
- [2] CHINCHAR V G, WALTZEK T B, SUBRAMANIAM K. *Ranaviruses and other members of the family Iridoviridae: Their place in the virosphere*[J]. *Virology*, 2017, 511: 259-271.
- [3] QIN Q W, WU T H, JIA T L, et al. Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus[J]. *J Virol Methods*, 2006, 131(1): 58-64.
- [4] HUANG X H, HUANG Y H, SUN J, et al. Characterization of two grouper *Epinephelus akaara* cell lines: Application to studies of Singapore grouper iridovirus (SGIV) propagation and virus-host interaction[J]. *Aquaculture*, 2009, 292(3): 172-179.
- [5] OUYANG Z L, HUANG X H, HUANG E Y, et al. Establishment and characterization of a new marine fish cell line derived from red-spotted grouper *Epinephelus akaara*[J]. *J Fish Biol*, 2010, 77(5): 1083-1095.
- [6] GOGN J, HUANG Y H, HUANG X H, et al. Establishment and characterization of a new cell line derived from kidney of grouper, *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel), susceptible to Singapore grouper iridovirus (SGIV)[J]. *J Fish Dis*, 2011, 34(9): 677-686.
- [7] ZHOU L L, LI P F, LIU J X, et al. Establishment and characterization of a mid-kidney cell line derived from golden pompano *Trachinotus ovatus*, a new cell model for virus pathogenesis and toxicology studies[J]. *In Vitro Cell Dev-An*, 2017, 53(4): 320-327.
- [8] LI P F, ZHOU L L, NI S W, et al. Establishment and characterization of a novel cell line from the brain of golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *In Vitro Cell Dev-An*, 2016, 52(4): 410-418.
- [9] WEI S N, YU Y P, QIN Q W. Establishment of a new fish cell line from the caudal fin of golden pompano *Trachinotus ovatus* and its susceptibility to iridovirus[J]. *J Fish Biol*, 2018, 92(6): 1675-1686.
- [10] QIN Q W, LAM T J, SIN Y M, et al. Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*[J]. *J Virol Methods*, 2001, 98(1): 17-24.
- [11] QIN Q W, CHANG S F, NGOH-LIM G H, et al. Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina*[J]. *Dis Aquat Organ*, 2003, 53(1): 1-9.
- [12] SONG W J, QIN Q W, QIU J, et al. Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: Complete sequence determination and proteomic analysis[J]. *J Virol*, 2004, 78(22): 12576-12590.
- [13] ZHOU S, WAN Q J, HUANG Y H, et al. Proteomic analysis of Singapore grouper iridovirus envelope proteins and characterization of a novel envelope protein VP088[J]. *Proteomics*, 2011, 11(11): 2236-2248.
- [14] HUANG X H, GONG J, HUANG Y H, et al. Characterization of an envelope gene VP19 from Singapore grouper iridovirus[J]. *Virol J*, 2013, 10: 354.
- [15] ZHANG H L, ZHOU S, XIA L Q, et al. Characterization of the VP39 envelope protein from Singapore grouper iridovirus[J]. *Can J Microbiol*, 2015, 61(12): 924-937.
- [16] TENG Y, HOU Z W, GONG J, et al. Whole-genome transcriptional profiles of a novel marine fish iridovirus, Singapore grouper iridovirus (SGIV) in virus-infected grouper spleen cell cultures and in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Virology*, 2008, 377(1): 39-48.
- [17] YAN Y, CUI H C, JIANG S, et al. Identification of a novel marine fish virus, Singapore grouper iridovirus-encoded microRNAs expressed in grouper cells by Solexa sequencing[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19148.
- [18] XIA L Q, CAO J H, HUANG X H, et al. Characterization of Singapore grouper iridovirus (SGIV) ORF086R, a putative homolog of ICP18 involved in cell growth control and virus replication[J]. *Arch Virol*, 2009, 154(9): 1409-1416.
- [19] XIA L Q, LIANG H, HUANG Y H, et al. Identification and characterization of Singapore grouper iridovirus (SGIV) ORF162L, an immediate-early gene involved in cell growth control and viral replication[J]. *Virus Res*, 2010, 147(1): 30-39.
- [20] HUANG X H, HUANG Y H, GONG J, et al. Identification and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF) homolog from Singapore grouper iridovirus[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(1): 140-145.
- [21] CAI J, HUANG Y H, WEI S N, et al. Characterization of LPS-induced TNF α factor (LITAF) from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 35(6): 1858-1866.
- [22] HUANG X H, HUANG Y H, CAI J, et al. Identification and characterization of a tumor necrosis factor receptor like protein encoded by Singapore grouper iridovirus[J]. *Virus Res*, 2013, 178(2): 340-348.
- [23] YU Y P, HUANG Y H, WEI S N, et al. A tumour necrosis factor receptor-like protein encoded by Singapore grouper iridovirus modulates cell proliferation, apoptosis and viral replication[J]. *J Gen Virol*, 2016, 97(3): 756-766.
- [24] YU Y P, HUANG Y H, NI S W, et al. Singapore grouper iridovirus (SGIV) TNFR homolog VP51 functions as a

- virulence factor via modulating host inflammation response[J]. *Virology*, 2017, 511: 280-289.
- [25] GONG J, HUANG Y H, HUANG X H, et al. Nuclear-export-signal-dependent protein translocation of dUTPase encoded by Singapore grouper iridovirus[J]. *Arch Virol*, 2010, 155(7): 1069-1076.
- [26] YAN Y, CUI H C, GUO C Y, et al. An insulin-like growth factor homologue of Singapore grouper iridovirus modulates cell proliferation, apoptosis and enhances viral replication[J]. *J Gen Virol*, 2013, 94: 2759-2770.
- [27] YAN Y, CUI H C, GUO C Y, et al. Singapore grouper iridovirus-encoded semaphorin homologue (SGIV-sema) contributes to viral replication, cytoskeleton reorganization and inhibition of cellular immune responses[J]. *J Gen Virol*, 2014, 95: 1144-1155.
- [28] YAN Y, GUO C Y, NI S W, et al. Singapore grouper iridovirus (SGIV) encoded SGIV-miR-13 attenuates viral infection via modulating major capsid protein expression[J]. *Virus Res*, 2015, 205: 45-53.
- [29] GUO C Y, YAN Y, CUI H C, et al. miR-homoHSV of Singapore grouper iridovirus (SGIV) inhibits expression of the SGIV pro-apoptotic factor LITAF and attenuates cell death[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83027.
- [30] HUANG C H, ZUANG X, GIN K Y, et al. In situ hybridization of a marine fish virus, Singapore grouper iridovirus with a nucleic acid probe of major capsid protein[J]. *J Virol Methods*, 2004, 117(2): 123-128.
- [31] FU J, HUANG Y H, CAI J, et al. Identification and characterization of Rab7 from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 36(1): 19-26.
- [32] WANG S W, HUANG X H, HUANG Y H, et al. Entry of a novel marine DNA virus, Singapore grouper iridovirus, into host cells occurs via clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis in a pH-dependent manner[J]. *J Virol*, 2014, 88(22): 13047-13063.
- [33] PAN Y, WANG S W, SHAN Y, et al. Ultrafast tracking of a single live virion during the invagination of a cell membrane[J]. *Small*, 2015, 11(23): 2782-2788.
- [34] HUANG X H, HUANG Y H, OUYANG Z L, et al. Singapore grouper iridovirus, a large DNA virus, induces nonapoptotic cell death by a cell type dependent fashion and evokes ERK signaling[J]. *Apoptosis*, 2011, 16(8): 831-845.
- [35] HUANG Y H, HUANG X H, YAN Y, et al. Transcriptome analysis of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) spleen in response to Singapore grouper iridovirus[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 556.
- [36] HUANG X H, HUANG Y H, OUYANG Z L, et al. Roles of stress-activated protein kinases in the replication of Singapore grouper iridovirus and regulation of the inflammatory responses in grouper cells[J]. *J Gen Virol*, 2011, 92: 1292-1301.
- [37] CAI J, HUANG Y H, WEI S N, et al. Characterization of p38 MAPKs from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* involved in SGIV infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31(6): 1129-1136.
- [38] WEI S N, HUANG Y H, HUANG X H, et al. Characterization of c-Jun from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* involved in SGIV infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 43(1): 230-240.
- [39] GUO M L, WEI J G, ZHOU Y S, et al. MKK7 confers different activities to viral infection of Singapore grouper iridovirus (SGIV) and nervous necrosis virus (NNV) in grouper[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 57: 419-427.
- [40] GUO M L, WEI J G, ZHOU Y S, et al. c-Jun N-terminal kinases 3 (JNK3) from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, inhibiting the replication of Singapore grouper iridovirus (SGIV) and SGIV-induced apoptosis[J]. *Dev Comp Immunol*, 2016, 65: 169-181.
- [41] GUO M L, WEI J G, ZHOU Y S, et al. Molecular clone and characterization of c-Jun N-terminal kinases 2 from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 49: 355-363.
- [42] GUO M L, WEI J G, HUANG X H, et al. JNK1 derived from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, involving in the evasion and infection of Singapore grouper iridovirus (SGIV)[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 121.
- [43] BANKS L, PIM D, THOMAS M. Viruses and the 26S proteasome: Hacking into destruction[J]. *Trends BiochemSci*, 2003, 28(8): 452-459.
- [44] RANDOW F, LEHNER P J. Viral avoidance and exploitation of the ubiquitin system[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(5): 527-534.
- [45] HUANG X H, WEI S N, NI S W, et al. Ubiquitin-proteasome system is required for efficient replication of Singapore grouper iridovirus[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2798.
- [46] HUANG Y H, YU Y P, YANG Y, et al. Fish TRIM8 exerts antiviral roles through regulation of the proinflammatory factors and interferon signaling[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 54: 435-444.
- [47] YANG Y, HUANG Y H, YU Y P, et al. RING domain is essential for the antiviral activity of TRIM25 from orange spotted grouper[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 55: 304-314.
- [48] YU Y P, HUANG X H, LIU J X, et al. Fish TRIM32 functions as a critical antiviral molecule against iridovirus and nodavirus[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 60: 33-43.
- [49] YANG Y, HUANG Y H, YU Y P, et al. Negative regulation of the innate antiviral immune response by TRIM62 from orange spotted grouper[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 57: 68-78.
- [50] LV S Y, ZHAN Y, ZHENG J Y, et al. Negative regulation of the interferon response by finTRIM82 in the or-

- ange spotted grouper[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 88: 391-402.
- [51] HUANG Y H, ZHANG J C, LIU J X, et al. Fish TRIM35 negatively regulates the interferon signaling pathway in response to grouper nodavirus infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 69: 142-152.
- [52] YU Y P, HUANG X H, ZHANG J C, et al. Fish TRIM16L exerts negative regulation on antiviral immune response against grouper iridoviruses[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 59: 256-267.
- [53] HUANG Y H, YANG M, YU Y P, et al. Grouper TRIM13 exerts negative regulation of antiviral immune response against nodavirus[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 55: 106-115.
- [54] QIN Q W, GIN K Y, LEE L Y, et al. Development of a flow cytometry based method for rapid and sensitive detection of a novel marine fish iridovirus in cell culture[J]. *J Virol Methods*, 2005, 125(1): 49-54.
- [55] LIU W T, ZHU L, QIN Q W, et al. Microfluidic device as a new platform for immunofluorescent detection of viruses[J]. *Lab Chip*, 2005, 5(11): 1327-1330.
- [56] MAO X L, ZHOU S, XU D, et al. Rapid and sensitive detection of Singapore grouper iridovirus by loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 105(2): 389-397.
- [57] LI P F, YAN Y, WER S N, et al. Isolation and characterization of a new class of DNA aptamers specific binding to Singapore grouper iridovirus (SGIV) with antiviral activities[J]. *Virus Res*, 2014, 188: 146-154.
- [58] LI P F, WEI S N, ZHOU L L, et al. Selection and characterization of novel DNA aptamers specifically recognized by Singapore grouper iridovirus-infected fish cells[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(11): 3348-3359.
- [59] LI P F, ZHOU L L, WEI J G, et al. Development and characterization of aptamer-based enzyme-linked aptasorbent assay for the detection of Singapore grouper iridovirus infection[J]. *J Appl Microbiol*, 2016, 121(3): 634-643.
- [60] ZHANG X B, HUANG C H, QIN Q W. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Antiviral Res*, 2004, 61(2): 93-99.
- [61] XU D, WEI J G, CUI H C, et al. Differential profiles of gene expression in grouper *Epinephelus coioides*, infected with Singapore grouper iridovirus, revealed by suppression subtractive hybridization and DNA microarray[J]. *J Fish Biol*, 2010, 77(2): 341-360.
- [62] HUANG Y H, ZHANG J C, OUYANG Z L, et al. Grouper MAVS functions as a crucial antiviral molecule against nervous necrosis virus infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 72: 14-22.
- [63] WEI J G, GUO M L, GAO P, et al. Isolation and characterization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) from grouper, *Epinephelus tauvina*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 39(1): 61-68.
- [64] YU Y P, HUANG Y H, YANG Y, et al. Negative regulation of the antiviral response by grouper LGP2 against fish viruses[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 56: 358-366.
- [65] HUANG Y H, YU Y P, YANG Y, et al. Antiviral function of grouper MDA5 against iridovirus and nodavirus[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 54: 188-196.
- [66] HUANG Y H, OUYANG Z L, WANG W, et al. Antiviral role of grouper STING against iridovirus infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 47(1): 157-167.
- [67] HU Y, HUANG Y H, LIU J X, et al. TBK1 from orange-spotted grouper exerts antiviral activity against fish viruses and regulates interferon response[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 73: 92-99.
- [68] HUANG Y H, HUANG X H, CAI J, et al. Identification of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) interferon regulatory factor 3 involved in antiviral immune response against fish RNA virus[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 42(2): 345-352.
- [69] CUI H C, YAN Y, WEI J G, et al. Identification and functional characterization of an interferon regulatory factor 7-like (IRF7-like) gene from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Dev Comp Immunol*, 2011, 35(6): 672-684.
- [70] GAO R, HUANG Y H, HUANG X H, et al. Molecular cloning and characterization of two types of IκBα orthologues in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 38(1): 101-110.
- [71] HUANG Y H, HUANG X H, YANG Y, et al. Involvement of fish signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in nodavirus infection induced cell death[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 43(1): 241-248.
- [72] ZHANG J C, HUANG X H, NI S W, et al. Grouper STAT1a is involved in antiviral immune response against iridovirus and nodavirus infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 70: 351-360.
- [73] WEI J G, XU D, ZHOU J G, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a C-type lectin (Ec-CTL) in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 28(1): 178-186.
- [74] JI H S, WEI J G, WEI S N, et al. Molecular cloning and expression of a C-type lectin-like protein from orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*[J]. *J Fish Biol*, 2014, 84(2): 436-447.
- [75] CHEN X L, WEI J G, XU M, et al. Molecular cloning and characterization of a galectin-1 homolog in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 54: 333-341.
- [76] ZHOU J G, WEI J G, XU D, et al. Molecular cloning and characterization of two novel hepcidins from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Fish Shellfish*

- Immunol*, 2011, 30(2): 559-568.
- [77] GUO M L, WEI J G, HUANG X H, et al. Antiviral effects of β -defensin derived from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 32(5): 828-838.
- [78] WEI S N, HUANG Y H, CAI J, et al. Molecular cloning and characterization of c-type lysozyme gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 33(2): 186-196.
- [79] WEI S N, HUANG Y H, HUANG X H, et al. Molecular cloning and characterization of a new G-type lysozyme gene (Ec-lysG) in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 46(2): 401-412.
- [80] OUYANG Z L, WANG P R, HUANG X H, et al. Immunogenicity and protective effects of inactivated Singapore grouper iridovirus (SGIV) vaccines in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Dev Comp Immunol*, 2012, 38(2): 254-261.
- [81] OUYANG Z L, WANG P R, HUANG Y H, et al. Selection and identification of Singapore grouper iridovirus vaccine candidate antigens using bioinformatics and DNA vaccination[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 149(1/2): 38-45.

【责任编辑 霍 欢】



秦启伟，二级教授、博士生导师、华南农业大学海洋学院院长，国际学术期刊《*Fish & Shellfish Immunology*》副主编。国家杰出青年基金获得者、国务院政府特殊津贴专家、“新世纪百千万人工程”国家级人选、第五届全国优秀科技工作者；国家现代海水鱼产业技术体系岗位科学家、第二届农业部水产养殖病害防治专家委员会委员、中国海洋湖沼学会理事、中国水产学会理事、广东海洋协会副会长。曾经在英国威尔士大学海洋学院、日本国立水产养殖研究所、东京海洋大学、新加坡国立大学、中山大学、以及中国科学院南海海洋研究所等国内外著名大学和研究机构长期从事海洋与水产生物资源保护和利用科研与教学，在海洋鱼类病毒学、免疫学和水产病害防控等领域取得了一系列创新研究成果。近年来主持完成了国家杰出青年基金、国家重点基金和国家重点研发计划课题等多项国家重要科研项目，在本领域重要国际期刊《*Journal of Virology*》和《*Antiviral Research*》等已发表 100 多篇 SCI 收录论文，出版专著 3 部，获授权国家发明专利 8 项。