

网络出版时间:2023-11-01 12:00 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2024.05.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1390.S.20231031.1636.002

Rho A-Rock 1 信号通路对传染性脾肾坏死病毒感染的调控及作用

谭有燕^{1,2}, 牛银杰², 李宁求², 罗霞², 林强², 梁红茹², 付小哲²

(1 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 农业农村部渔用药物创制重点实验室, 广东省水产动物免疫与绿色养殖重点实验室, 广东 广州 510380)

【摘要】【目的】探究传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)复制增殖与 Rho A-Rock 1 通路的关系。【方法】采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 ISKNV 感染 CPB 细胞 12, 24, 48, 72 和 96 h 后病毒 DNA 拷贝数的变化; 同时采用 RT-qPCR 和蛋白免疫印迹方法检测病毒感染 CPB 细胞 12, 24, 48 和 72 h 后 Rho A 与 Rock 1 转录及蛋白表达水平的变化; 通过 Rho A 抑制剂(CCG-1423 和 Rhosin)、Rock 1 抑制剂(Thiazovivin 和 Y-27632)及 siRNA 抑制 Rho A-Rock 1 通路, 研究 Rho A-Rock 1 通路抑制对 ISKNV 复制增殖的影响。【结果】ISKNV 感染 12~48 h, 病毒的 DNA 拷贝数无显著变化, 感染 72 h 病毒 DNA 拷贝数显著上升, 感染 96 h 病毒的拷贝数上升变缓, 说明 ISKNV 感染 72 h 时病毒正处于复制增殖的高峰期。RT-qPCR 及蛋白免疫印迹结果表明, ISKNV 感染 72 h 时, Rho A 和 Rock 1 mRNA 转录水平和蛋白水平均显著上调。Rho A 抑制剂 Rhosin 和 CCG-1423 及 Rock 1 抑制剂 Y-27632 和 Thiazovivin 均可使 ISKNV 基因组拷贝数和病变的 CPB 细胞数显著下调; 利用 siRNA 敲降 Rho A 和 Rock 1 时, ISKNV 的基因组拷贝数也显著下调。【结论】Rho A-Rock 1 信号通路可正调控 ISKNV 的感染, 抑制 Rho A-Rock 1 通路可显著抑制 ISKNV 复制增殖。

【关键词】 脾肾坏死病毒; 病毒复制; Rho A-Rock 1 信号通路

【中图分类号】 S852.659.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2024)05-0012-09

Regulation and effect of Rho A-Rock 1 signaling pathway on infectious spleen and kidney necrosis virus infection

TAN Youyan^{1,2}, NIU Yinjie², LI Ningqiu², LUO Xia², LIN Qiang²,
LIANG Hongru², FU Xiaozhe²

(1 School of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2 Key Laboratory of Fishery Drug Creation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Aquatic Animal Immunology Technology, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510380, China)

Abstract:【Objective】This study explored the relationship between infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) replication and Rho A-Rock 1 signaling pathway.【Method】RT-qPCR was used to detect the changes of viral DNA copy numbers at 12, 24, 48, 72 and 96 h after infection of CPB cells with ISKNV. RT-qPCR and Western Blotting were used to detect changes of Rho A and Rock 1 transcription

【收稿日期】 2023-02-17

【基金项目】 广东省基础与应用基础研究基金项目(2021A1515012057); 广东省现代农业产业技术创新团队专项基金项目(2019KJ140, 2019KJ141); 广东省海洋经济发展(海洋六大产业)专项资金项目(GDOE[2022]A13)

【作者简介】 谭有燕(1997—), 女, 重庆人, 在读硕士, 主要从事水生动物疾病防控技术研究。E-mail: tanyouyan201516@163.com

【通信作者】 付小哲(1978—), 女, 吉林临河人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事水生动物免疫防治技术研究。

E-mail: fuxiaozhe-1998@163.com

and protein expression in CPB cells at 12, 24, 48 and 72 h after virus infection. The effect of Rho A-Rock 1 pathway inhibition on ISKNV replication and proliferation was determined by Rho A inhibitors (CCG-1423 and Rhosin), Rock 1 inhibitors (Thiazovivin and Y-27632) and siRNA inhibition of Rho A-Rock 1 pathway. 【Result】 There was no significant change in DNA copy number of ISKNV from 12 to 48 h after infection, but it increased significantly at 72 h and slowed down at 96 h, indicating that peak of replication and proliferation was at 72 h. RT-qPCR and Western Blotting showed that the mRNA transcription levels and protein levels of Rho A and Rock 1 were significantly up-regulated at 72 h after ISKNV infection. Rho A inhibitors of Rhosin and CCG-1423 and Rock 1 inhibitors of Y-27632 and Thiazovivin significantly down-regulated copy number of ISKNV genome and number of cytopathic cells. Rho A and Rock 1 knockdown by siRNA also significantly down-regulated genomic copy number of ISKNV. 【Conclusion】 Rho A-Rock 1 signaling pathway positively regulated ISKNV infection and inhibition of Rho A-Rock 1 signaling pathway significantly inhibited ISKNV replication and proliferation.

Key words: spleen and kidney necrosis virus; viral replication; Rho A-Rock 1 signaling

传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)属于双链 DNA 病毒,是虹彩病毒科(Iridoviridae)、细胞肿大病毒属(Megairidovirus)的模式种,可感染 50 多种鱼类,以脾肾作为主要靶器官,可造成鱼类脾肾细胞肿大和坏死^[1-4]。病毒作为严格的胞内寄生者,通常会利用细胞的信号通路完成自身增殖,这一过程常涉及细胞信号通路的激活^[5]。

小鸟苷酸三磷酸酶(Rho GTPase)家族调控多种细胞活动进程,包括肌动蛋白聚合与组装、细胞极性、细胞迁移和膜运输等^[6]。Rho GTPase 超家族的亚家族成员 A(Rho member A, Rho A)一旦被激活会从细胞质移位至细胞膜,并与下游 Rho 关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶 1(Rho associated coiled coil forming protein kinase 1, Rock 1)效应分子结合,调控肌动蛋白微丝重组^[7]。Rock 1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,是 Rho A 下游的重要效应分子,可使多种底物磷酸化^[8]。Rock 1 能磷酸化并激活 LIM 结构域激酶(LIM domain kinase, LIMK), LIM 结构域是一种蛋白质结构域,由 2 个疏水氨基酸残基连接 2 个锌指结构组成,能介导下游肌动蛋白解聚因子调控微丝重排^[9]。研究发现,流感病毒(influenza A virus, IAV)可通过活化 Rho A-Rock 1 信号通路,调控微丝向胞质聚集,形成大量应力纤维,加剧病毒的致病性^[10]。已知多种病毒的复制增殖与肌动蛋白密切相关^[11-14]。目前, Rho A-Rock 1 信号通路是否参与 ISKNV 感染调控的研究尚未见报道。本研究探究了 Rho A-Rock 1 通路对 ISKNV 复制增殖的关系,阐明 Rho A-Rock 1 通路对 ISKNV 复制增殖的调控作用,旨在为 ISKNV 的防控提供有

效的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

鳊脑组织细胞系(Chinese perch brain cells, CPB),由中国水产科学研究院珠江水产研究所农业农村部渔用药物创制重点实验室制备,在含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 L-15 培养基中传代培养。ISKNV,由中国水产科学研究院珠江水产研究所农业农村部渔用药物创制重点实验室保存,在 CPB 细胞中传代增殖。FBS 和 L-15 培养基,购自 Hyclone 公司;兔抗 Rho A(67B9)、Rock 1(C8F7)单克隆抗体,购于 CST 公司;鼠抗 β -actin(66009-1-Ig),购于 Proteintech 公司;Rho A 抑制剂 Rhosin、CCG-1423 及 Rock 1 抑制剂 Y-27632、Thiazovivin,购于 Med Chem Express 公司;病毒基因组提取试剂盒(DP315),购自北京天根生化科技有限公司;SYBR Green Pro Taq HS 预混试剂盒,购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;12%蛋白预制胶,购于 Life technologies 公司;CCK-8(C6605-500T),购自广州峰硕生物科技有限公司;TransIntro[®] EL Transfection Reagent,购自全式金公司。试验所用引物由广东艾基生物有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 CPB 细胞中 ISKNV 复制高峰期测定 用 ISKNV(感染复数(MOI)=1.0)感染长满的 CPB 细胞,分别于病毒感染的 12, 24, 48, 72 和 96 h 收取细胞样品,每个样品设置 3 个重复。利用病毒基因组提取试剂盒提取病毒 DNA,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测胞内 ISKNV 基因组拷贝数。

1.2.2 ISKNV 增殖过程中 Rho A 和 Rock 1 表达变化 参照 1.2.1 节的方法用 ISKNV 感染 CPB 细胞,以未感染病毒的细胞为对照,分别于病毒感染的 12,24,48 和 72 h 收取细胞样品,每个样品设置 3 个重复。利用 TIANGEN TIANamp Genomic RNA Kit 试剂盒提取 RNA,使用 Abm OneScript cDNA synthesis Kit (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit) 试剂盒进行反转录,每个样品用 1 μg RNA 进行反转录。以 18S rRNA 为内参,采用 RT-qPCR 测定 Rho A 和 Rock 1 的 mRNA。同时,以 β -actin 作为内参,采用蛋白免疫印迹方法(Western Blotting)检测病毒感染 72 h Rho A 和 Rock 1 的蛋白表达情况。

1.2.3 Rho A 和 Rock 1 抑制剂安全浓度的确定 高浓度抑制剂对细胞存在一定的毒性,为了排除通路抑制剂对细胞存在毒性而影响 ISKNV 的增殖,采用 CCK-8 法检测抑制剂安全浓度。取对数生长期 CPB 细胞,制成 $2 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ 的细胞悬液,加入 96 孔培养板,28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后,加入 100 μL 不同浓度的 Rho A、Rock 1 抑制剂(Rhosin 终浓度分别为 5 000,2 500,1 250,625,312,156,78,39,20 和 10 $\mu\text{mol/L}$;CCG-1423 终浓度分别为 100,50,25,12.5,6.25,3.13,1.56 和 0.78 $\mu\text{mol/L}$;Y-27632 终浓度分别为 5 000,2 500,1 250,625,312,156,78,39,20 和 10 $\mu\text{mol/L}$;Thiazovivin 终浓度分别为 20 000,10 000,5 000,2 500,1 250,625,312 和 156 nmol/L),培养箱中培养 72 h 后弃上清,向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,将培养板在培养箱内孵育 1~4 h,用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(OD_{450}),以添加等量抑制剂溶剂二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)的处理作为对照,计算各处理组细胞活力:细胞活力 = 处理组 OD_{450} / 对照组 $\text{OD}_{450} \times 100\%$ 。以 Prism 软件(以抑制剂浓度为横轴,细胞活力为纵轴)绘制抑制剂作用于 CPB 细胞的安全浓度图。

1.2.4 抑制 Rho A-Rock 1 通路对 ISKNV 增殖的影响 为了进一步探究 Rho A-Rock 1 通路对 ISKNV 增殖的影响,分别测定 Rho A 抑制剂 Rhosin(20,10 和 5 $\mu\text{mol/L}$)、CCG-1423(10,5 和 2.5 $\mu\text{mol/L}$)和 Rock 1 抑制剂 Y-27632(20,10 和 5 $\mu\text{mol/L}$)、Thiazovivin(500,250 和 125 nmol/L)对 ISKNV 基因组复制及其引起细胞病变的影响。取铺好 CPB 细胞的 12 孔细胞培养板,加入上述浓度的 Rho A 和 Rock 1 抑制剂孵育 1 h,以等量抑制剂

溶剂 DMSO 处理的细胞作为阳性对照(DMSO),以未处理的细胞作为空白对照(Control),加入 $\text{MOI}=1.0$ 的 ISKNV 病毒液孵育上述细胞,病毒感染后抑制剂一直存在,感染 72 h 观察细胞病变情况,并对病变细胞进行计数。同时收取细胞样品,提取病毒基因组 DNA,采用 RT-qPCR 测定抑制剂对 ISKNV 复制的影响。

1.2.5 敲降 Rho A-Rock 1 对 ISKNV 增殖的影响

为了进一步验证 Rho A-Rock 1 通路对 ISKNV 增殖的影响,利用 siRNA 对细胞 Rho A 和 Rock 1 基因进行敲降。参照鳊的 Rho A 和 Rock 1 编码序列,设计合成靶向沉默 Rho A 和 Rock 1 的干扰 siRNA 序列(Rho A-siRNA、Rock 1-siRNA)及阴性对照序列(negative control,NC)。用 siRNA 及 NC 转染敲降:取 10 μL 25 pmol/ μL 的 siRNA 加入 200 μL Opti-MEM 中,轻柔混匀;取 10 μL TransIntro[®] EL 试剂加入到稀释好的 siRNA 中,室温静置 15 min 后,将混合物加入到铺满 CPB 细胞的 12 孔细胞培养板中;6 h 后更换为 5% FBS 的 L-15 培养基,继续培养细胞 24 h,收取细胞样品,提取 RNA,反转录获得 cDNA 后,以 18S rRNA 为内参,采用 RT-qPCR 法测定 siRNA 的敲降效果。

选取敲降效果较好的 siRNA 及 NC 处理 CPB 细胞 24 h,以未处理的 CPB 细胞作为空白对照(Control),加入 $\text{MOI}=1.0$ 的 ISKNV 病毒液孵育上述细胞,病毒感染后 72 h 收取细胞样品,提取病毒基因组 DNA,RT-qPCR 测定抑制剂对 ISKNV 复制的影响。

1.2.6 RT-qPCR ISKNV 拷贝数的测定采用实验室已建立的 RT-qPCR 法进行^[15]。Rho A-Rock 1 通路基因的相对定量测定以 18S rRNA 为内参进行^[16]。SYBR Green Pro Taq HS 的反应体系为:2 $\times$ SYBR Premix 10 μL ,cDNA 2 μL ,正、反引物各 1 μL ,ROX Reference Dye (4 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ,ddH₂O 5.6 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。每个样品设 3 次重复。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 相对表达量。试验引物见表 1。

1.2.7 蛋白质免疫印迹 利用 Western Blotting 检测 Rho A 和 Rock 1 蛋白表达量。PBS 清洗细胞,加入适量 RIPA 裂解液置于冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min,取上清液重悬于 5 $\times$ 聚丙烯酰胺凝胶电泳缓冲液中,煮沸 10 min 制备蛋白样品。蛋白样品在 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳凝

胶上进行分离,转移到孔径 0.45 μm 聚偏二氟乙烯 (PVDF)膜上,用 5%牛血清白蛋白(BSA)封闭并加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 清洗 3 次,每次 5 min,加入相应二抗室温孵育 1 h,TBST 充分洗涤后用 ECL 法显影,以 β -actin 作为内参。

表 1 本研究所用引物及序列

Table 1 Primers and siRNA sequences used in this study

项目 Item	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
18S rRNA	q-18S-F:CATTCTGATTGTGCCGCTAGA,q-18S-R:CAAATGCTTTTCGCTTTGGTC
Rho A	q-Rho A-F:CCCTGACAGTCTTGAGAACATCC,q-Rho A-R:AGGCACCGATCCTGTTAGCC
Rock 1	q-Rock 1-F:AGGACTTGTGCAGTGAAAGGGAC,q-Rock 1-R:CAAGCCGTGCAATAGTAGCC
Rho A-siRNA	Rho A-siRNA-1:GACAUGCUUGCUCUAUAGUCTTd Td T Rho A-siRNA-2:UGGCAGAUAUCGAGGUGGAd Td T Rho A-siRNA-3:UCCACCUCGAUAUCUGCCAd Td T
Rock 1-siRNA	Rock 1-siRNA-1:GACGCAAGAAAGCAAGAAAd Td T Rock 1-siRNA-2:UUUCUUGCUUUCUUGCGUCd Td. T Rock 1-siRNA-3:GGCACGACUAGCAGAUAAAAd Td T
NC	NC:UUCUCCGAACGUGUCACGUTTd Td T

1.3 统计学分析

利用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据分析,2 组间差异用双边非配对 t -test 检验,3 组及 3 组以上组间差异用单因素方差分析检验。

2 结果与分析

2.1 CPB 细胞中 ISKNV 复制高峰期

如图 1 所示,病毒感染 12~24 h,ISKNV 的基因组 DNA 拷贝数无显著变化;感染 48 h,病毒基因组 DNA 拷贝数下调;感染 72 h 时,病毒基因组 DNA 拷贝数快速上升;感染 96 h,病毒基因组 DNA 拷贝数上升变缓。上述结果说明,ISKNV 感染 72 h 时,病毒的 DNA 大量合成,96 h 时病毒的 DNA 合成进入平台期,感染后 72 h 是病毒复制的高峰期。因此,后续试验选择在病毒感染后 72 h 时进行研究。

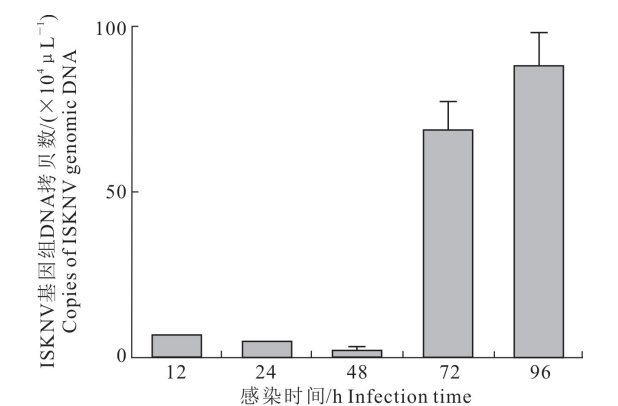


图 1 ISKNV 在 CPB 细胞中的增殖情况
Fig.1 ISKNV proliferation in CPB cells

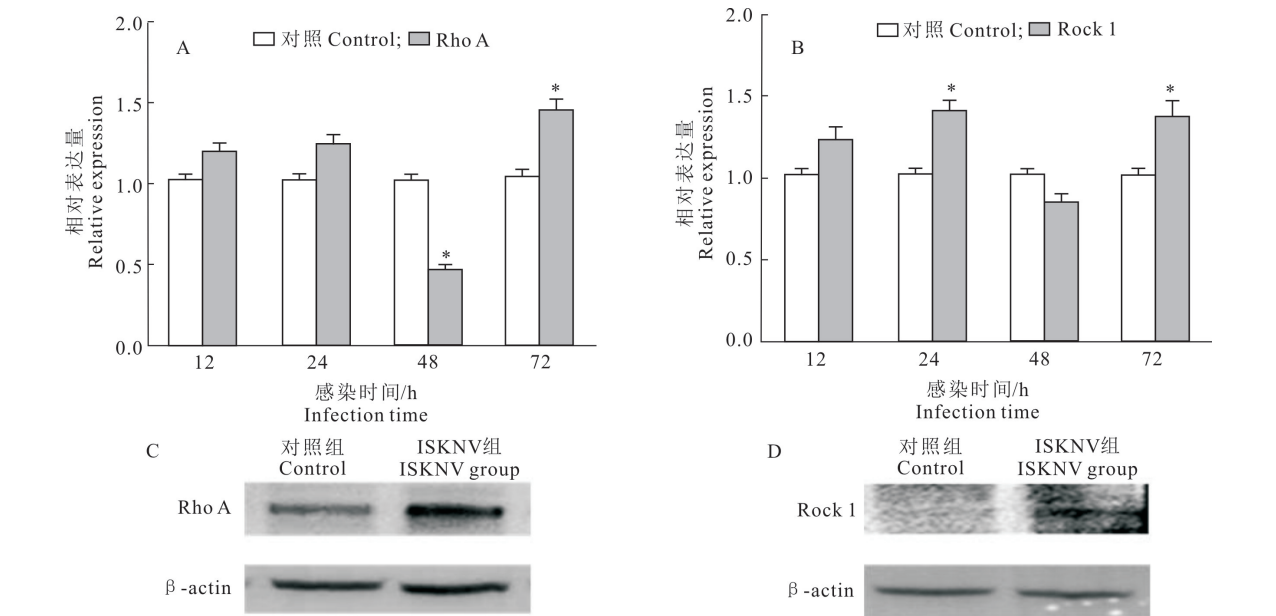
2.2 ISKNV 增殖过程中 Rho A 和 Rock 1 表达的变化

通过 RT-qPCR 和 Western Blotting 检测 Rho A 和 Rock 1 在 mRNA 和蛋白水平的表达变化,结果见图 2。RT-qPCR 结果(图 2-A 和 2-B)显示,与对照组相比,在 ISKNV 感染 CPB 细胞 12,24 和 72 h 时,Rho A 和 Rock 1 mRNA 表达水平均升高;而在感染 48 h 时,Rho A 和 Rock 1 mRNA 表达水平均下调,与 ISKNV DNA 拷贝数在 CPB 细胞中的变化结果一致。

Western Blotting 结果(图 2-C 和 2-D)显示,CPB 细胞感染 ISKNV 72 h 后 Rho A 和 Rock 1 蛋白表达量均明显上调。上述结果表明,Rho A-Rock 1 信号通路参与了 ISKNV 的感染。

2.3 Rho A 和 Rock 1 抑制剂的安全浓度

图 3 结果显示,Rho A 抑制剂 CCG-1423 浓度小于 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 时对 CPB 细胞无影响,细胞活力在 80% 以上;Rhosin 浓度小于 20 $\mu\text{mol/L}$ 时对 CPB 细胞无影响,细胞活力在 90% 以上。Rock 1 抑制剂 Thiazovivin 浓度小于 625 nmol/L 时对 CPB 细胞无影响,细胞活力在 90% 以上;Y-27632 浓度小于 20 $\mu\text{mol/L}$ 时对 CPB 细胞无影响,细胞活力在 90% 以上。上述研究结果说明,低于 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 是 CCG-1423 的安全浓度,低于 20 $\mu\text{mol/L}$ 是 Rhosin 的安全浓度,低于 625 nmol/L 是 Thiazovivin 的安全浓度,低于 20 $\mu\text{mol/L}$ 是 Y-27632 的安全浓度。



A,B. 分别为 ISKNV 感染后不同时间点 Rho A 和 Rock 1 mRNA 的变化;C,D. 分别为 ISKNV 感染 72 h Rho A 和 Rock 1 蛋白水平的变化。
图柱上标 * 表示差异显著($P<0.05$), ** 表示差异极显著($P<0.01$),下同。

A,B. Relative expression of Rho A and Rock 1 mRNA after ISKNV infection;C,D. Protein levels of Rho A and Rock 1 at 72 h after ISKNV infection.

* represents significant difference ($P<0.05$) and ** represents very significant difference ($P<0.01$), The same below.

图 2 CPB 细胞感染 ISKNV 后 Rho A 和 Rock 1 在 mRNA 和蛋白水平表达的变化

Fig. 2 Changes of mRNA and protein expression of Rho A and Rock 1 after CPB cells infection by ISKNV

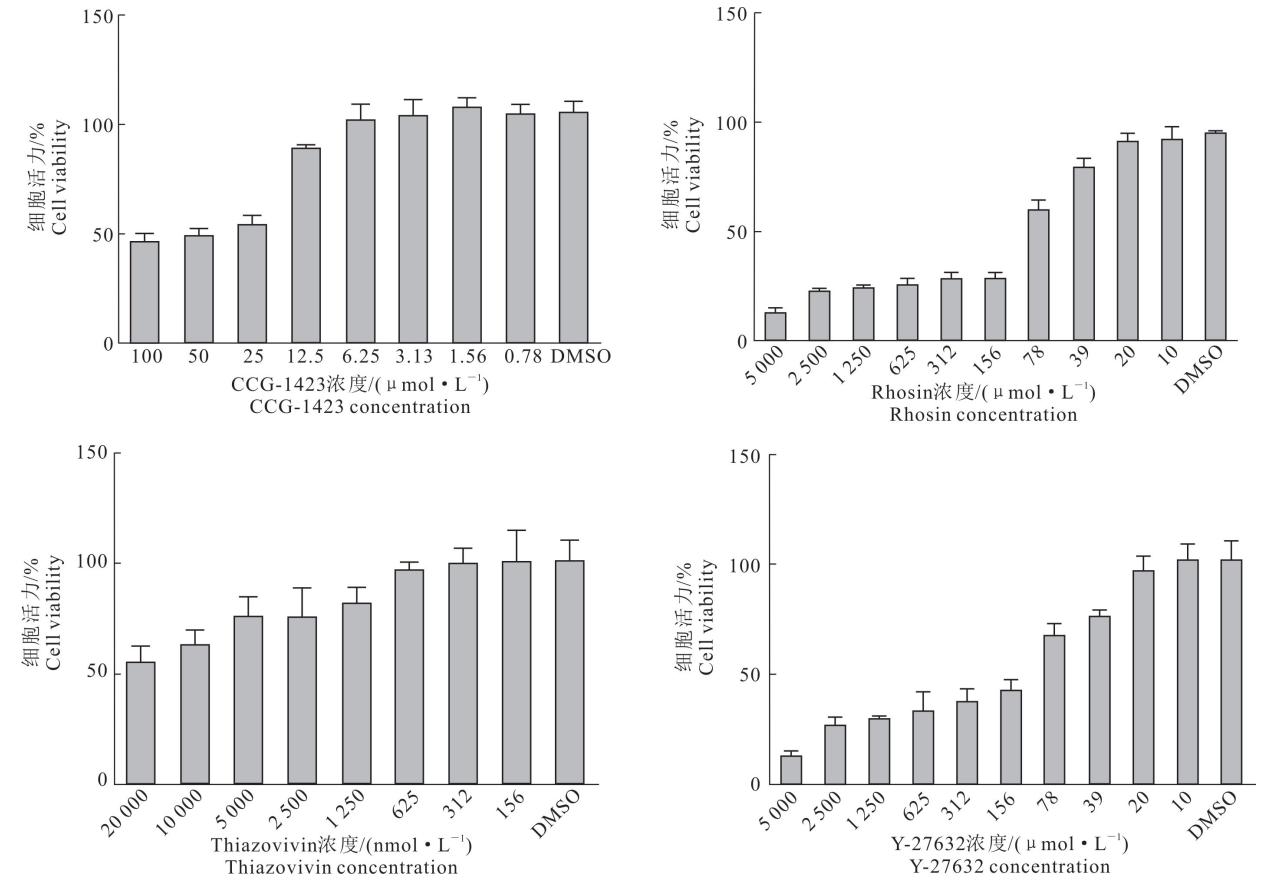


图 3 不同浓度 Rho A 和 Rock 1 抑制剂对 CPB 细胞活力的影响

Fig. 3 Effects of Rho A and Rock 1 inhibitors at different concentrations on cell viability

2.4 抑制 Rho A-Rock 1 通路对 ISKNV 增殖的调控

不同浓度 Rho A 和 Rock 1 抑制剂对 ISKNV

基因组拷贝数及其致 CPB 细胞病变数的影响见图 4 和图 5。

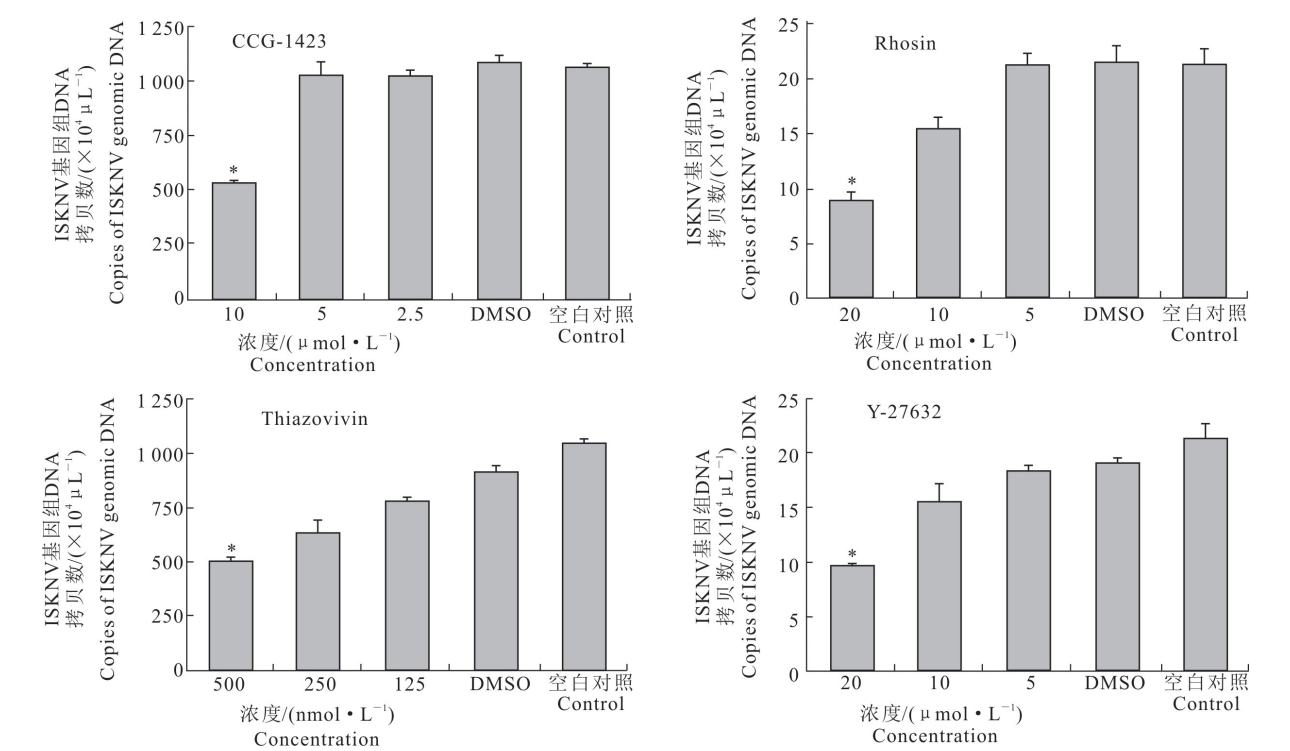


图 4 不同浓度 Rho A 和 Rock 1 抑制剂对 ISKNV 基因组拷贝数的影响

Fig. 4 Effects of Rho A and Rock 1 inhibitors at different concentrations on copy number of ISKNV genome

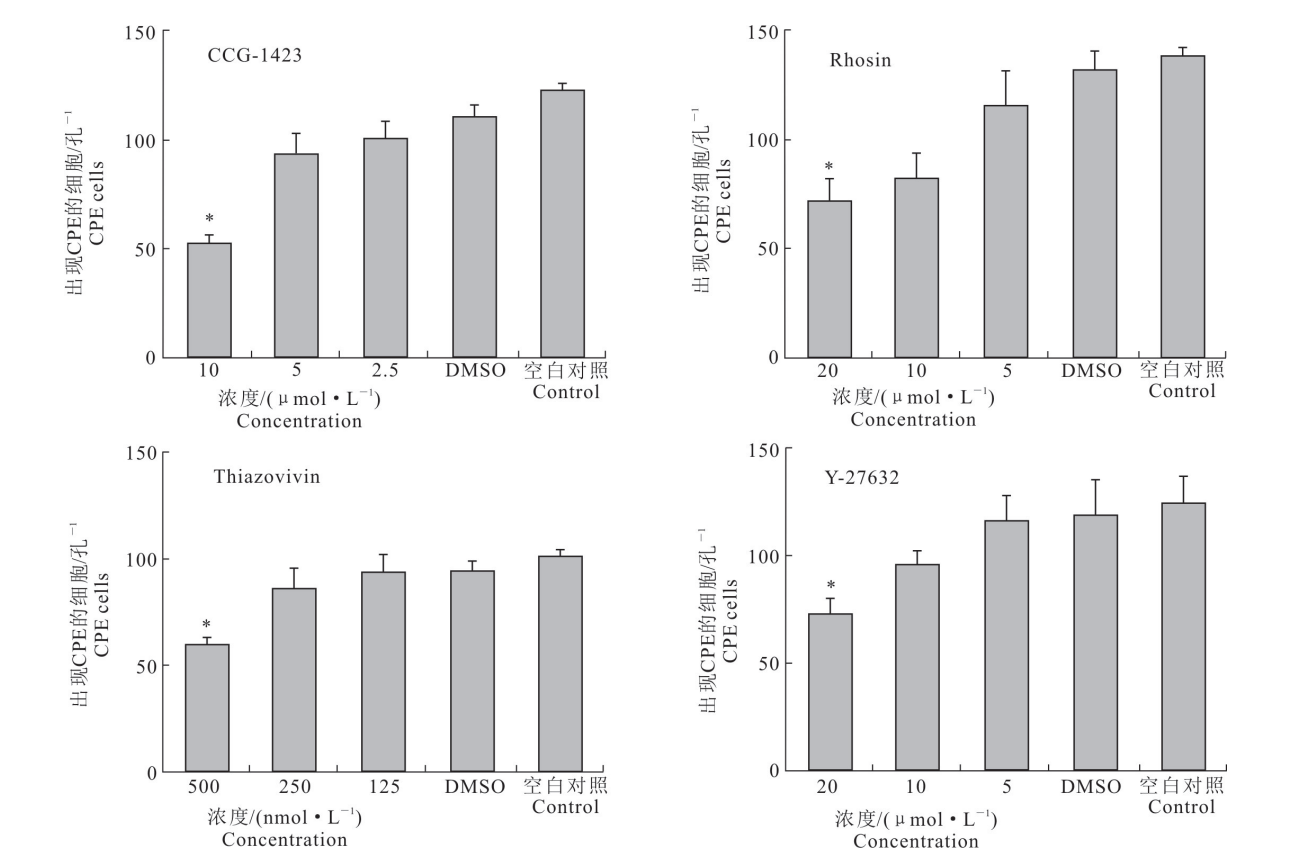


图 5 不同浓度 Rho A 和 Rock 1 抑制剂对 ISKNV 致 CPB 细胞病变数的影响

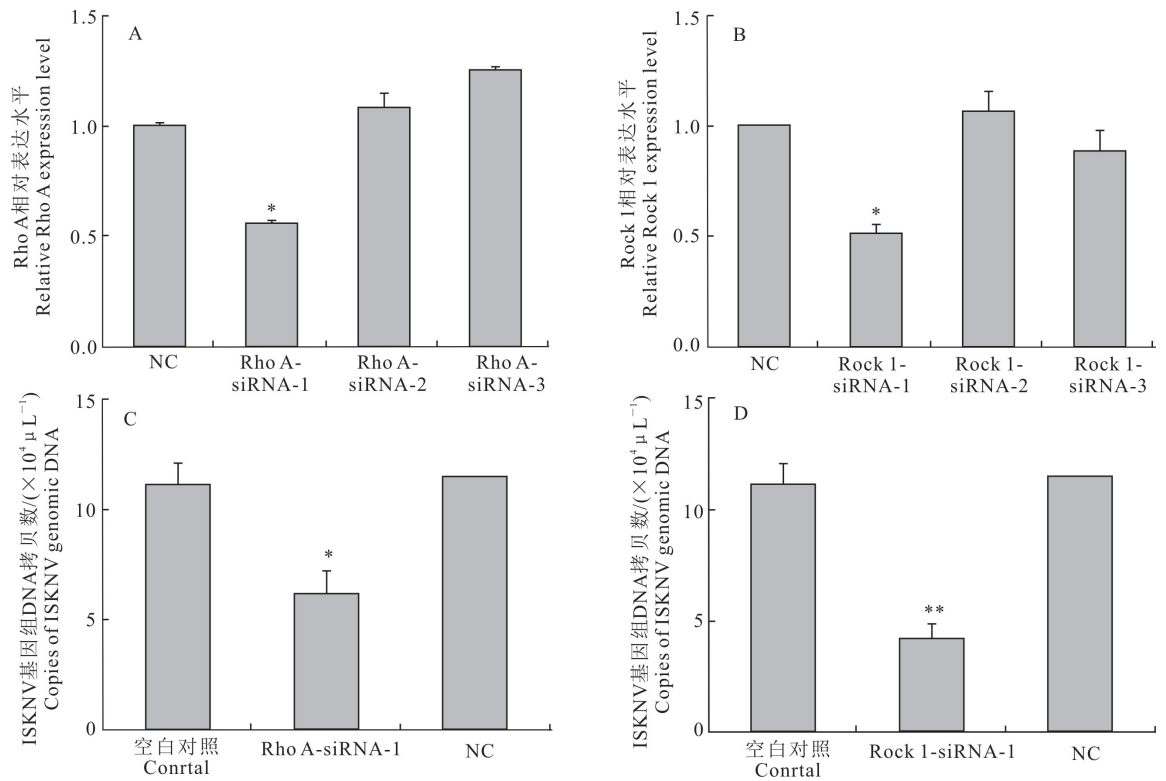
Fig. 5 Effect of Rho A and Rock 1 inhibitors at different concentrations on number of CPB cytopathy induced by ISKNV

由图 4 可知,Rho A 抑制剂 CCG-1423 10 $\mu\text{mol/L}$ 、Rhodin 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 Rock 1 抑制剂 Thiazovivin 500 nmol/L、Y-27632 20 $\mu\text{mol/L}$ 处理组 ISKNV 的 DNA 拷贝数显著下调,而其他抑制剂处理组及 DMSO 和 Control 组无显著差异。由图 5 可以看出,Rho A 抑制剂 Rhodin 20 $\mu\text{mol/L}$ 、CCG-1423 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 Rock 1 抑制剂 Y-27632 20 $\mu\text{mol/L}$ 、Thiazovivin 500 nmol/L 处理组病变细胞数均显著低于其余各组,其余各组间无显著差异,与 ISKNV DNA 拷贝数变化趋势一致。上述结果表明,一定浓度的 Rho A 抑制剂 Rhodin、CCG-1423 和 Rock 1 抑制剂 Y-27632、Thiazovivin 均可显著抑制

ISKNV 基因组 DNA 的复制,同时减少 ISKNV 引起的细胞病变。

2.5 敲降 Rho A-Rock 1 对 ISKNV 增殖的影响

图 6 结果表明,与 NC 组相比,Rho A-siRNA-1 和 Rock 1-siRNA-1 处理组显著下调,说明 Rho A-siRNA-1 和 Rock 1-siRNA-1 可显著敲降 CPB 细胞的 Rho A 和 Rock 1 基因(图 6-A 和 6-B)。利用 Rho A-siRNA-1 与 Rock 1-siRNA-1 敲降 CPB 细胞的 Rho A 和 Rock 1 后,ISKNV DNA 拷贝数也显著降低(图 6-C 和 6-D)。上述结果说明,敲降 Rho A 和 Rock 1 基因可显著抑制 ISKNV 的增殖。



A,B. 分别为 siRNA 敲降 Rho A 和 Rock 1 的效果;C,D. 分别为敲降 Rho A 和 Rock 1 基因后对 ISKNV 复制增殖的影响。
A,B. Effect of siRNA knockdown on Rho A and Rock 1;C,D. Effect of knockdown Rho A and Rock 1 on ISKNV replication.

图 6 siRNA 敲降 Rho A-Rock 1 对 ISKNV 增殖的影响

Fig. 6 Effect of Rho A-Rock 1 knockdown by siRNA on ISKNV replication

3 讨 论

大量的研究表明,病毒的复制及组装常利用微丝及其细胞信号传导途径^[17-19]。已知 ISKNV 感染需要利用细胞的骨架运输系统,而微丝(F-actin)是细胞骨架的主要组成部分,由 Rho GTPase 家族进行调控^[14,20]。Rho A 是 Rho GTPase 家族的主要成员,Rock 1 是研究最为详细的下游靶效应分子。本研究结果发现,Rho A-Rock 1 在 ISKNV 复制增殖

中具有重要作用,且 Rho A-Rock 1 信号通路可正调控 ISKNV 的感染,这为 ISKNV 的防控提供了新思路。

Rho A-Rock 1 信号通路与众多疾病的发生发展密切相关,以该通路作为疾病的治疗靶点越来越受到人们的广泛关注。为了探究 Rho A-Rock 1 通路是否影响 ISKNV 的复制增殖,对病毒感染 72 h 的 Rho A 和 Rock 1 mRNA 进行测定,发现病毒感染 72 h 的 Rho A 和 Rock 1 mRNA 显著上调。

Western Blotting 结果也显示,病毒感染 72 h 的 Rho A 和 Rock 1 蛋白水平均明显上调,说明 ISKNV 感染激活了 Rho A-Rock 1 通路。

Rho A 一旦被激活则从细胞质移位至细胞膜,并与其下游 Rock 1 效应分子结合,参与病毒的入侵、复制、组装及释放。番鸭感染呼肠孤病毒后,病毒可激活 Rho A-Rock 1 通路,从而促进自身的复制增殖^[21]。Rho A 调控日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)吞噬路径从而促进病毒入侵^[22]。Rock 1 激活后会参与 HIV 的组装、释放和细胞-细胞间传播^[23]。人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)结合到细胞膜表面会活化 Rho GTPase 调控微丝骨架,促进细胞因子受体 CD4 和 CXCR4 的聚集,从而促进病毒入侵^[24]; HSV 病毒粒子可激活 Rho A 调节微丝,在细胞表面形成突起,使病毒受体簇集从而促进病毒入侵^[25]。IAV 感染可以激活 Rho A-Rock 1 通路,加剧其本身的致病性^[10]。抑制 Rho A 和 Rock 1 会导致马立克氏病毒形成的噬斑变小^[26]。上述研究说明,Rho A-Rock 1 通路在多病毒复制中发挥正调控作用。本研究通过抑制剂及 siRNA 抑制 Rho A-Rock 1 通路后,ISKNV 基因组 DNA 拷贝数及病变细胞数均显著减少,表明抑制 Rho A-Rock 1 通路可显著抑制 ISKNV 复制增殖,降低病毒对宿主细胞的致病性。本研究结果表明,Rho A-Rock 1 信号通路正调控 ISKNV 的复制增殖,与上述研究结果一致。

4 结 论

ISKNV 感染可激活 Rho A-Rock 1 信号通路,而 Rho A-Rock 1 信号通路可正调控 ISKNV 的复制增殖,说明 Rho A-Rock 1 信号通路在 ISKNV 感染中发挥正调控作用。此研究结果为后续 ISKNV 致病机制的研究提供了思路,同时为 ISKNV 防控提供了新的靶点,也丰富了 Rho A-Rock 1 信号通路的功能研究。

[参考文献]

[1] 吴淑勤,李新辉,潘厚军,等. 鳊暴发性传染病病原研究 [J]. 水产学报,1997,21(S1):56-60.
Wu S Q, Li X H, Pan H J, et al. Research on the pathogen of the outbreak-infective disease of *Siniperca chuatsi* [J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(S1): 56-60.
[2] 邓敏,何建国,左涛,等. 鳊鱼传染性脾肾坏死病毒(ISKNV) PCR 检测方法的建立及虹彩病毒新证据 [J]. 病毒学报,2000,

16(4):365-369.
Deng M, He J G, Zuo T, et al. Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) from *Siniperca chuatsi*: development of a PCR detection method and the new evidence of *Iridovirus* [J]. Chinese Journal of Virology, 2000, 16(4): 365-369.
[3] Dong C F, Weng S P, Shi X J, et al. Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) [J]. Virus Research, 2008, 135(2): 273-281.
[4] Van Regenmortel M H V. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. San Diego: Academic Press, 2000.
[5] Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry [J]. The Journal of Cell Biology, 2011, 195(7): 1071-1082.
[6] Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion [J]. Cancer Metastasis Reviews, 2009, 28(1/2): 65-76.
[7] Kato K, Yoneda Y, Okada Y, et al. Gene transfer and the expression of a foreign gene *in vivo* in post-mitotic neurons of the adult rat brain using the hemagglutinating virus of the Japan-liposome method [J]. Brain Research Molecular Brain Research, 1994, 25(3/4): 359-363.
[8] Li Y S, Zhang C L, Lu N, et al. Involvement of actin-regulating factor cofilin in the inclusion body formation and RNA synthesis of human parainfluenza virus type 3 via interaction with the nucleoprotein [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 95.
[9] Tan L, Zhang Y Q, Zhan Y, et al. Newcastle disease virus employs macropinocytosis and Rab5a-dependent intracellular trafficking to infect DF-1 cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(52): 86117-86133.
[10] Zhang C Y, Wu Y, Xuan Z N, et al. p38MAPK, Rho/ROCK and PKC pathways are involved in influenza-induced cytoskeletal rearrangement and hyperpermeability in PMVEC via phosphorylating ERM [J]. Virus Research, 2014, 192: 6-15.
[11] Pan W, Hui N, Wang H M, et al. Entry of bovine parainfluenza virus type 3 into MDBK cells occurs via clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis in a acid-dependent manner [J]. Veterinary Microbiology, 2021, 259: 109148.
[12] Molho M, Lin W W, Nagy P D. A novel viral strategy for host factor recruitment: the co-opted proteasomal Rpn11 protein interaction hub in cooperation with subverted actin filaments are targeted to deliver cytosolic host factors for viral replication [J]. PLoS Pathogens, 2021, 17(6): e1009680.
[13] Ravi L I, Tan T J, Tan B H, et al. Virus-induced activation of the rac1 protein at the site of respiratory syncytial virus assembly is a requirement for virus particle assembly on infected cells [J]. Virology, 2021, 557: 86-99.
[14] Jia K T, Wu Y Y, Liu Z Y, et al. Mandarin fish caveolin 1 interaction with major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus and its role in early stages of infection [J]. Journal of Virology, 2013, 87(6): 3027-3038.

- [15] Lin Q, Fu X Z, Liu L H, et al. Application and development of a TaqMan real-time PCR for detecting infectious spleen and kidney necrosis virus in *Siniperca chuatsi* [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 107: 98-105.
- [16] Ye C M, Li N Q, Niu Y J, et al. Characterization and function of mandarin fish c-Myc during viral infection process [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 120: 686-694.
- [17] Wurth M A, Schowalter R M, Smith E C, et al. The actin cytoskeleton inhibits pore expansion during PIV5 fusion protein-promoted cell-cell fusion [J]. Virology, 2010, 404(1): 117-126.
- [18] Taylor M P, Koyuncu O O, Enquist L W. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection [J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6): 427-439.
- [19] MacLeod I J, Minson T. Binding of herpes simplex virus type-1 virions leads to the induction of intracellular signalling in the absence of virus entry [J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9560.
- [20] Sasaki T, Takai Y. The rho small G protein family-rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 245(3): 641-645.
- [21] 廖加磊. 番鸭呼肠孤病毒及其 S 组蛋白对 Vero 细胞 Rho A/Rock 1/MLC 信号通路影响的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
- [22] Liao J L. Effects of muscovy duck reovirus and its S histone on Rho A/Rock 1/MLC signaling pathway in Vero cells [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017.
- [23] Kalia M, Khasa R, Sharma M, et al. Japanese encephalitis virus infects neuronal cells through a clathrin-independent endocytic mechanism [J]. Journal of Virology, 2013, 87(1): 148-162.
- [24] Wen X Y, Ding L M, Wang J J, et al. Rock 1 and LIM kinase modulate retrovirus particle release and cell-cell transmission events [J]. Journal of Virology, 2014, 88(12): 6906-6921.
- [25] Lucera M B, Fleissner Z, Tabler C O, et al. HIV signaling through CD4 and CCR5 activates Rho family GTPases that are required for optimal infection of primary CD4+ T cells [J]. Retrovirology, 2017, 14(1): 1-13.
- [26] Petermann P, Haase I, Knebel-Mörsdorf D. Impact of Rac1 and Cdc42 signaling during early Herpes simplex virus type 1 infection of keratinocytes [J]. Journal of Virology, 2009, 83(19): 9759-9772.
- [27] Richerieux N, Blondeau C, Wiedemann A, et al. Rho-ROCK and Rac-PAK signaling pathways have opposing effects on the cell-to-cell spread of Marek's Disease Virus [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e44072.

(上接第 11 页)

- [27] Michalet Doreau B, Fernandez I, Peyron C, et al. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents [J]. Reproduction Nutrition Development, 2001, 41(2): 187-194.
- [28] Kawauchi D, Angthong W, Keaokliang O, et al. Effect of feeding *Bacillus subtilis* on rumen fermentation, blood metabolites, nutrient digestibility, and energy and nitrogen balances in non-lactating crossbred cows [J]. Animal Science Journal, 2021, 92(1): e13531.
- [29] 韩丽, 解培峰, 赵越, 等. 母猪饲料中添加枯草芽孢杆菌对哺乳仔猪血浆生化参数、粪便微生物及其代谢产物的影响 [J]. 动物营养学报, 2018, 30(4): 1465-1470.
- [30] Han L, Xie P F, Zhao Y, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on fecal microbes and their metabolites of peripartum sows [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(4): 1465-1470.
- [31] Chi Z, Wang Z P, Wang G Y, et al. Microbial biosynthesis and secretion of L-malic acid and its applications [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36: 99-107.
- [32] Yan E F, Wang Y B, He L J, et al. Effects of dietary L-malic acid supplementation on meat quality, antioxidant capacity and muscle fiber characteristics of finishing pigs [J]. Foods, 2022, 11(21): 3335-3346.
- [33] Mark B, Ilana S, Roger A J. Tissue levels, source, and regulation of 3'-AMP: an intracellular inhibitor of adenylyl cyclases [J]. Molecular Pharmacology, 1990, 38(6): 848-853.
- [34] 孙诗昂, 李冰, 邓亚飞, 等. 循环热应激对肉鸡胸肌、腿肌糖原、AMP、AMPK 含量的影响 [J]. 安徽科技学院学报, 2022, 36(1): 13-17.
- [35] Sun S A, Li B, Deng Y F, et al. Effects of cyclic heat stress on glycogen, AMP and AMPK content of pectoral and leg muscle of broilers [J]. Journal of Anhui Science and Technology University, 2022, 36(1): 13-17.
- [36] Jackson E K, Gillespie D G, Dubey R K. 2'-AMP and 3'-AMP inhibit proliferation of preglomerular vascular smooth muscle cells and glomerular mesangial cells via A2B receptors [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2011, 337(2): 444-450.
- [37] Jackson T C, Kotermanski S E, Kochanek P M, et al. Oxidative stress induces release of 2'-AMP from microglia [J]. Brain Research, 2019, 1706: 101-109.