段 伟, 唐 浩, 孙明雪, 等. AC3 介导草鱼 GCRV 感染的功能机制研究[J]. 渔业研究, 2024, 46(6): 563-571.

AC3 介导草鱼 GCRV 感染的功能机制研究

段 伟,唐 浩,孙明雪,廖伊健,肖调义,李耀国*

(湖南农业大学水产学院,湖南长沙410128)

摘要:【背景】草鱼呼肠狐病毒(GCRV)感染可通过增大血管内皮通透性而引发渗漏出血。 【目的】为探明腺苷酸环化酶3(AC3)介导GCRV感染的功能机制,在草鱼肾脏细胞系 (CIK)中开展了系列研究。【方法】在CIK细胞内成功实现了AC3过表达,使用荧光定 量PCR(qPCR)检测GCRV感染不同时间点(0h、12h、24h)ac3、claudin c、claudin 15、 claudin 18、irf3、irf7、ifn1和ifn2的相对表达量;通过蛋白免疫印迹(WB)检测GCRV VP7的蛋白量;采用细胞电阻仪检测CIK细胞层不同条件下的跨内皮电阻(TEER)值,以 及利用透射电镜检测CIK细胞间的连接状态。【结果】研究结果显示,AC3过表达显著增 强了CIK细胞紧密连接分子 claudin 15和 claudin 18的表达量,但对干扰信号素通路基因 irf3、irf7、ifn1和ifn2的表达水平未产生显著影响,而抑制了GCRV VP7的蛋白量。跨内皮 电阻检测发现,AC3过表达显著增加了CIK细胞局的电阻值。透射电镜检测结果显示, AC3过表达降低了GCRV感染对CIK细胞间连接的损伤程度。【结论】AC3可以影响 claudin 分子的相对表达量及细胞屏障功能,抑制GCRV 在细胞中的增殖。【意义】本研究 从细胞通透性角度开拓了GCRV 抗性关联分子发掘的新路径。

关键词: 草鱼; 腺苷酸环化酶 3 (AC3); 草鱼呼肠孤病毒 (GCRV); 细胞连接; 细胞层 通透性

中图分类号: S942.1 文献标识码: A 文章编号: 2096-9848(2024)06-0563-09

草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV) 感染引发的草鱼出血病限制了草鱼产业的健康发 展。I型GCRV包含11个dsRNA(Double-stranded RNA),编码7种结构蛋白(VP1~VP7)和6种 非结构蛋白(NS80、NS38、NS31、NS26、NS16 和NS12)^[1]。病毒内衣壳蛋白VP1、VP2、VP3 和VP4在病毒的RNA复制中发挥作用,而VP6 连接内外衣壳蛋白,外衣壳蛋白VP5和VP7负责 病毒识别及吸附至宿主细胞膜的过程^[2]。

GCRV 感染1 龄草鱼(Ctenopharyngodon idella) 后,病鱼各脏器小血管内皮细胞肿胀坏死、通透性 升高,肌肉、鳍条、鳃盖和肠道出现明显的点状出 血^[3]。从机制角度看,病毒感染可通过炎症、干扰 素等调控途径影响血管内皮细胞间连接的程度,进 而影响血管内皮通透性。登革热病毒 NS1 蛋白经 TLR4 介导的炎症因子释放等方式损伤血管,导致 细胞间交联破坏,细胞通透性增大而发生出血病^[4]。 干扰素(Interferon, IFN)是由单核细胞和淋巴细胞 等产生的具有抗病毒以及免疫调节功能的蛋白质^[5]。 GCRV 感染后, IFN 调节因子(Interferon regulatory factors, IRF)被激活并磷酸化,转移至细胞核与 IFN 反应元件(IFN-stimulated response elements, ISREs)相互作用,诱导 IFN 抗病毒反应的产生^[6]。 病毒性脑炎中 IFN-γ 通过 Rho 激酶(Rho kinase, ROCK)诱导细胞骨架收缩,导致细胞连接紊乱和 细胞分离,是血脑屏障渗漏的主要原因^[7]。细胞连 接分子中 Claudin 家族成员负责细胞屏障功能调 节,其与跨膜蛋白、胞质支架蛋白和肌动蛋白细胞

收稿日期: 2024-07-20
 修回日期: 2024-09-19
 基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2024JJ5199)
 第一作者: 段 伟,男,硕士,研究方向为水产养殖。E-mail: 18303423591@163.com
 通信作者: 李耀国,男,副教授,研究方向为鱼类抗性育种。E-mail: yaoguolijkl@163.com

骨架相互作用形成紧密连接,发挥维护细胞屏障特性的功能^[8]。如 *Claudin c* 在健康草鱼的中肠表达量较高,而中肠损伤后 *Claudin c* 表达量显著降低,提示其参与肠道屏障功能的维护^[9]。Claudin 15 能影响细胞旁离子通路,猪近端肾小管上皮细胞(Porcine kidney proximal tubular epithelial cell, LLC-PK1)中过表达 *Claudin 15* 可增加 Na⁺渗透率^[10]。在小鼠中敲除 *Claudin 15* 可增加 Na⁺渗透率^[10]。在小鼠中敲除 *Claudin 18* 后,细胞旁 H⁺泄漏显著增强,说明 Claudin 18 在选择性细胞旁通透性中发挥关键作用^[11]。

腺苷酸环化酶(Adenvlate cyclase, AC)属于 膜整合蛋白,通过催化三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP) 生成环磷酸腺苷(Cvclic adenosine monophosphate, cAMP)并释放焦磷酸, 实 现细胞外刺激信号的细胞内转化^[12]。哺乳动物中 已鉴定出 9 种 AC 亚型,其中 AC3 属于由 Ca²⁺激 动催化的功能成员^[13]。AC 通过促进 cAMP 合成调 节 Rho GTP 酶 (Rho guanosine triphosphatase, Rho GTPase)激活 Ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1) 来影响紧密连接蛋白的分布,具有稳定细胞屏障的 功能^[14]。本研究以 AC3 为目标分子,重点探究其 对 GCRV 感染状态下草鱼肾脏细胞系 (C. idella kidney, CIK)中干扰素和细胞连接分子表达以及 细胞层通透性的影响,旨在为高抗性草鱼分子选育 的 GCRV 抗性关联分子筛选提供支持。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、病毒和质粒

CIK 细胞由本团队传代获得^[15];人脑微血管内 皮细胞(Human brain microvascular endothelial cell, HBMEC)购自上海中乔新舟生物科技有限公司; GCRV-873 毒株由本团队扩繁获得(滴度为1.0× 10^{3.625} TCID₅₀/mL); pEGFP-AC3-Flag 载体由苏州 金唯智生物科技有限公司构建。

1.2 主要实验仪器和试剂

RNA isolater Total RNA Extraction Reagent (Vazyme,南京); RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific,美国); 2× ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, 南京); 超微量分光光度计 (凯奥,美国); CFX96 Touch Real-Time PCR 仪 (Bio-rad,美国); VP7 鼠 源单克隆抗体 (上海海洋大学邹钧教授惠赠); Anti-Actin Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody、 HRP Conjugated Goat anti-Rabbit Antibody 和 HRP Conjugated Goat anti-Mouse Antibody 购自于杭州华 安生物技术有限公司; PVDF 膜(0.2 µm)(Merck, 德国); PVDF 膜活化液(碧云天,上海); 转膜 液(金斯瑞,南京); TBS(Biosharp,广州); Tween 20(Biosharp,广州); 无蛋白快速封闭液 (雅酶,上海); 细胞电阻仪(Merck Millipore, 美国); Transwell(LABSELECT,北京)。

1.3 细胞 RNA 提取和 cDNA 合成

使用 RNA isolater Total RNA Extraction Reagent 提取 CIK 细胞的总 RNA。使用超微量分光光度 计测定其核酸浓度和纯度,经 1% 琼脂糖凝胶电 泳检测其完整性;选取质量较好的 RNA (A260/ A280 比值在 1.8~2.2 之间,电泳条带 28S rRNA : 18S rRNA 亮度比值约为 2 : 1),按照 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书操作步骤合 成 cDNA。

1.4 荧光定量 PCR

用 NCBI 在线网站设计荧光定量 PCR (Realtime fluorescent quantative polymerase chain reaction, qPCR)引物(表1),由生工生物工程(上海) 股份有限公司合成。以*β-actin* 作为参考基因^[16],在 CFX96 Touch Real-Time PCR 仪进行 qPCR。反应 体系为 5 μ L 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix,所检测基因的上、下游引物各 0.5 μ L, 2 μ L cDNA 模板和 2 μ L 无菌水。反应程序为 95 \mathbb{C} 30 s; 45 个循环的 95 \mathbb{C} 5 s、60 \mathbb{C} 40 s; 熔解曲线熔解 峰清晰单一,从 65 \mathbb{C} 上升至 95 \mathbb{C} ,每 5 s 上升 0.5 \mathbb{C} ,采集荧光信号。对 CIK 内转染空载和 AC3 表达载体、GCRV 感染 0、12 和 24 h 状态下的 *ac3、claudin c、claudin 15、claudin 18、irf3、irf7、ifn1*和 *ifn2* 的相对表达量进行检测。

1.5 蛋白免疫印迹

将 CIK 细胞传代至 6 孔细胞培养板中,待细胞密度达到 80%~90% 时,将正确构建的 AC3 重组表达质粒转染至细胞中。细胞转染 48 h 后,加入 GCRV 悬液感染,采集 GCRV 未感染(0 h)、感染 12 h 以及感染 24 h 的细胞样品,提取细胞蛋白后,按 1:4 的比例与十二烷基硫酸钠(SDS, 5×)混合,快速离心,在热循环仪上 99.9 ℃ 变性 10 min。在聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)胶孔中加入 10 µL 变性的蛋白样品,100 V 电泳 30 min,然后 140 V 电泳使溴酚蓝移至 PAGE 胶底。PAGE 胶经清水洗涤 2 次后,利用转膜仪将胶上蛋白转移至聚偏二氟

乙烯(PVDF) 膜上; 用含吐温 20 的 Tris-HCl 盐 酸缓冲盐溶液(TBST)清洗 3 次后,使用快速封 闭液孵育 30 min; 而后弃去封闭液,加入一抗 (1:500 稀释 VP7 抗体, 1:2500 稀释 β-actin 抗 体) 置于 4 ℃ 摇床孵育 12 h; TBST 清洗 3 次后, 室温孵育二抗 2 h (1:5000 稀释); 将 PVDF 膜 浸泡于 ECL 显色液, 10 s 后显色拍照,利用 Image J 软件进行 Western blot 条带的灰度分析。

表 1 qPCR 引物序列 Tab. 1 Primers used in the qPCR

引物 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	熔解温度/℃ Melting temperature
β-actin-F	GCTATGTGGCTCTTGACTTCG	59
β-actin-R	GGGCACCTGAACCTCTCATT	60
AC3-F	CGCTTCGACAAACTAGCAGC	58
AC3-R	CCTCCACCATAGACAAGCCC	58
IFN1-F	AAGCAACGAGTCTTTGAGCCT	58
IFN1-R	GCGTCCTGGAAATGACACCT	59
IFN2-F	TCCCGAAATCTGCACTGCAA	56
IFN2-R	CAGCTGGTTCCAGGACTCTG	58
IRF3-F	ATCTACTGGGGTCTATGCAA	53
IRF3-R	GCTGCATAAACTCCATCAAACC	56
IRF7-F	ACTAAACGCATCCTAGACAGT	56
IRF7-R	CTTTACACTTGTCCTGACGGAA	57
Claudin 15-F	ATTCTGGGTTTGCTGTCCGT	59
Claudin 15-R	GGCTGATTTTGCCCTTCGTC	60
Claudin 18-F	TTTGCAGCCACGGTTATGGA	57
Caudin 18-R	CCGGACACCTCGCAATTCTT	59
Claudin c-F	GTGGTTCAGAGTACCGGACA	58
Claudin c-R	GCAAGGACACCCACGATGAT	58

1.6 细胞透射电镜检测

待 CIK 在培养皿中的生长密度达到 80% 时, 转染 AC3 质粒,并在转染 48 h 后,用 GCRV 悬液 感染 24 h。在避光条件下,使用戊二醛固定细胞 5 min,而后利用细胞刮刀收集细胞,将细胞转移 至 2 mL 离心管中,2000×g 离心 4 min;弃去固定 液后,重新加入 1 mL 戊二醛,吹散细胞重悬,室 温避光固定 30 min。将细胞送至上海茁彩生物有限 公司进行电镜拍照,观察不同条件下细胞连接的状 态变化。

1.7 跨内皮电阻实验

在 Transwell 24 孔板的上室加入 100 µL M199 培养基,下室加入 600 µL 培养基,保存至 37 ℃、 CO₂ 浓度为 5% 的孵育箱中培养 24 h。弃去培养基, 将 CIK 和 HBMEC 分别接种至 Transwell 24 孔板的 上室,而下室加入 600 µL 不含血清的培养基。待 细胞汇合度达到 80% 时,转染 AC3;转染 48 h 后,使用 GCRV 悬液感染 CIK。检测不同时间点 的细胞层跨内皮电阻(Transendothelial electrical resistance, TEER): TEER($\Omega \cdot cm^2$) = (细胞层电 阻值-基础电阻值) × Transwell 上室滤膜的底面积 (0.33 cm²),其中基础电阻值为仅含有 M199 培 养基的 Transwell 孔的 TEER 值。

1.8 数据分析

使用 Bio-Rad CFX Manager 3.1 和 Excel 表格进行 qPCR 数据处理。使用 IBM SPSS Statistics 26 进行数据差异分析,并采用 GraphPad Prism 9.0.0 对数据进行统计作图; *表示 P<0.05, **表示 P<0.01。

2 结果与分析

2.1 AC3 对 claudins、IFN 信号通路基因及病毒 蛋白量的影响

荧光倒置显微镜检测结果显示,AC3 在 CIK 内成功实现了过表达,当转染48h时,可见绿色 荧光蛋白表达 [图 1 (a)]。通过 qPCR 检测了 ac3、claudin c、claudin 15、claudin 18、irf3、irf7、 *ifn1*和*ifn2*的基因表达量。在GCRV未感染(0h)、 感染12h以及感染24h的AC3过表达组中,*ac3* 基因表达量均极显著升高(*P*<0.01)[图1(b)]。 从AC3影响细胞连接分子表达的角度来看,当 GCRV感染12、24h时,*claudin 15*和*claudin 18* 的基因表达水平均出现极显著升高[图1(d)和 图1(e)](*P*<0.01)。此外,在GCRV感染状态下, *irf3、irf7、ifn1*和*ifn2*表达量均显著上调[图1(f)~ 图 1 (i)](*P*<0.05),但在未感染状态下,AC3 过表达对 *irf3*、*irf7*、*ifn1*和 *ifn2*基因的表达量未产 生显著影响。

为在蛋白层面研究 AC3 对 GCRV 复制的影响, 利用 WB 检测了 GCRV 感染 0、12 和 24 h 病毒外 衣壳蛋白 VP7 的表达量。结果显示,当 GCRV 感 染 24 h 时, AC3 过表达减少了 26% 的 VP7 蛋白量 (*P*<0.05)[(图 2(a)和图 2(b)]。



Fig. 1 Effect of AC3 on gene expression of claudins and IFN system

注:图(a)为过表达 pEGFP-AC3-Flag 的荧光图(100 μm),图(b)~图(i)表示 CIK 内过表达 AC3 48 h时, GCRV 感染不同时间点细胞中 ac3、claudin c、claudin 15、claudin 18、irf3、irf7、ifn1 以及 ifn2 的表达量;横坐标表示 GCRV 感染时间,其中 0 h 代表未感染。ns 表示组间无差异, P>0.05; *表示组间差异显著, P<0.05; **表示组间差异极显 著, P<0.01。图 2,图 5 同此。

Notes: Figure (a) shows the fluorescence pattern of overexpressed pEGFP-AC3-Flag (100 μ m), from figure (b) to figure (i) show the expression levels of *ac3*, *claudin c*, *claudin 15*, *claudin 18*, *irf3*, *irf7*, *ifn1*, and *ifn2* at different time points of GCRV infection after AC3-overexpressed in CIK cells for 48 h. The abscissa representes the time of GCRV infection, and 0 h indicates the uninfected status. ns means there's no difference between groups, P>0.05; * means there's significant difference between groups, P<0.05; * means there's are as figure 2 and figure 5.

2.2 AC3 缓解 GCRV 感染对 CIK 细胞连接的 损伤

为探究 AC3 对细胞屏障功能的影响,通过透射电镜检测了各组 CIK 中细胞连接的状态(图 3 和

图 4)。结果显示,转染空载和 AC3 后 CIK 细胞 连接都有不同程度的损伤[图 3(a)~图 3(d)]。 GCRV 感染使细胞间间隙变大且边界模糊,细胞 连接被严重破坏[图 4(a)~图 3(c)];而转染 AC3 组的细胞连接破坏程度明显较轻 [图4(d)~图4(f)]。

2.3 AC3 对细胞通透性的影响

为探究 AC3 过表达对细胞层通透性的影响, 分别检测了 CIK 和 HBMEC 细胞层电阻值。结果 显示, CIK 感染 GCRV 后细胞层电阻值极显著下 降(P<0.01)[图 5(a)],对应着细胞层通透性 升高;而 AC3 过表达使 CIK 细胞层电阻提高 (P<0.05),未受 GCRV 感染[图 5(b)]和受 到 GCRV 感染[图 5(c)]的细胞通透性均降 低。在 HBMEC 内过表达 AC3,细胞层电阻显著 升高(P<0.05)[图 5(d)],对应着细胞通透性 降低。结果表明, AC3 可缓解 GCRV 感染导致的 细胞通透性降低异常。





注:图(a)中1、3、5、7、9为对照组,2、4、6、 8、10为AC3过表达组。

Notes: In figure (a), 1, 3, 5, 7 and 9 are control groups, and 2, 4, 6, 8 and 10 are AC3 overexpression groups.

3 讨论

草鱼出血病发生的病理机制在于 GCRV 感染 并通过系列免疫反应破坏了血管内皮细胞屏障,最 终发生血管渗漏,表现为出血症状^[17-18]。细胞紧密 连接是形成细胞间屏障、维持细胞层正常通透性的 重要结构,其中 Claudin 家族成员是形成细胞紧密 连接的关键分子^[19]。该研究中首先发现 AC3 过表 达显著提高了 CIK 细胞紧密连接分子 claudin 15 和 claudin 18 的表达量。已有研究^[20]显示, Claudin 15 是构成细胞紧密连接的重要结构蛋白,在维护细胞 屏障功能方面发挥重要作用。Claudin 18参与维护 气道上皮屏障功能,其被敲除导致小鼠气道上皮通 透性增加,呼吸道对空气的敏感性增强^[21]。哮喘 患者的支气管上皮细胞(Human bronchial epithelial cell) claudin 18 表达量较低,对应着肺泡上皮屏障 受到损伤^[22]。而在血管细胞内的 AC 通过刺激 cAMP 直接激活交换蛋白 Epac (Exchange proteins directly activated by cAMP, Epac),可促进 claudins 介导的 紧密连接的形成^[23-24]。基于此,综合说明了 AC3 可 能通过 cAMP 或者其他信号通路影响 Claudin 15 和 Claudin 18 所参与的细胞紧密连接结构。





注:图(a)和图(b)表示 CIK 转染空载 24 h 时的细胞透射电镜图(200 nm),图(c)和图(d)表示 CIK 过表达 AC3 24 h 时的细胞透射电镜图(200 nm);图中"---"表示各电镜图片中相同长度区域;"→"表示损伤的紧密连接。

Notes: Figures (a) and (b) show the transmission electron microscopy images of cells 24 hours after CIK transfection with empty vector (200 nm), while figures (c) and (d) show the transmission electron microscopy images of cells 24 hours after CIK overexpression of AC3 (200 nm). "---" in the figure indicated the same length area in each electron microscope picture. " \rightarrow " indicated damaged tight junctions.

病毒感染触发机体的免疫防御反应, IFN 作为 重要的细胞因子参与激活抗病毒免疫应答^[25]。 例如,草鱼感染 GCRV 后,其 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1)可通过激活 IRF7 诱导 IFN1,并最终抑制病毒复制^[26]。IRF3、IRF7 以及 IFN1和 IFN2均是草鱼 IFN系统中重要的 GCRV 感染免疫分子,其中 IRF3/7 能够介导 IFN1/2 的抗病毒免疫反应^[27]。在未感染状态下,AC3 过 表达对 *irf3、irf7、ifn1*和 *ifn2*基因表达并未产生显 著影响,说明其 GCRV 感染组中 4 个基因表达量 上升主要是 GCRV 感染所引起的,提示 AC3 分子 并不通过 IFN 反应来影响 GCRV 感染免疫反应。 尤其是, AC3 过表达能够降低 GCRV 病毒 VP7 蛋 白水平,说明其确实介导了 GCRV 感染免疫。 Claudin 分子被报道可介导多种病毒入胞,如 Claudin-1 能抑制哈扎拉内罗病毒的细胞间传播, 对病毒感染发挥负调控作用^[28]。AC3 通过改变 *claudin 15* 和 *claudin 18* 表达水平影响 GCRV 感染 进程的功能机制有待深入研究。



图 4 AC3 过表达缓解 GCRV 对 CIK 紧密连接的破坏

Fig. 4 AC3 overexpression alleviates the disruption of CIK tight junctions by GCRV

注:图(a)~图(c)表示转染空载 CIK 细胞受到 GCRV 感染透射电镜图(200 nm),图(d)~图(f)表示过表达 AC3 的 CIK 细胞受到 GCRV 感染的透射电镜图(200 nm),图中"---"表示各电镜图片中相同长度区域;"→"表示损伤的紧密连接。

Notes: Figures (a)–(c) shows the transmission electron microscope images of empty vector overexpression cells that infected with GCRV (200 nm), and figures (d)–(f) show AC3 overexpressed CIK cells that infected with GCRV (200 nm), "---" in the figure indicates the same length area in each electron microscope picture, and " \rightarrow " indicates damaged tight junctions.





Fig. 5 Effect of AC3 overexpression on the permeability of the CIK cell layer

注:图(a)表示 CIK 感染 GCRV 24 h 时的 TEER 值;图(b)表示在 CIK 内过表达 AC3 48 h 的 TEER 值;图(c)为 CIK 内过表达 AC3 48 h 且 GCRV 感染 24 h 时的 TEER 值;图(d)表示在 HBMEC 内过表达 AC3 24 h 的 TEER 值。

Notes: Figure (a) shows the TEER value of CIK cells after GCRV infection of 24 h; figure (b) shows the TEER value of CIK cells overexpressed AC3 for 48 h; figure (c) represents the TEER value at 24 h of GCRV infection when AC3 was overexpressed in CIK for 48 h; figure (d) shows the TEER value of HBMEC overexpression of AC3 at 24 h.

本研究还发现 AC3 过表达可增加 CIK 细胞层的 TEER 值,意味着 AC3 过表达可使 CIK 细胞层通透性降低,对应着细胞屏障功能增强;电镜检测结果也显示,AC3 能够减缓 GCRV 感染下的细胞连接破坏,亦对应着细胞通透性及屏障功能的维护。AC 在维持细胞通透性中发挥关键调控作用。如 Oliver J A 等^[29] 通过检测 14C-蔗糖等物质在牛主动脉内皮细胞的渗透情况,发现 AC 可以减小细胞间紧密连接的宽度,实现维护细胞通透性的目的。在缺氧条件下,通过测定山梨糖醇和菊糖等组成的放射性跟踪剂在牛主动脉内皮细胞扩散程度,发现 AC 酶活性的降低可导致牛主动脉内皮细胞通透性增加^[30]。综合表明 AC3 具有增强细胞层屏障功能的作用。

综上,草鱼 AC3 的过表达能够提高 claudin 15 和 claudin 18 的基因表达,增强 CIK 细胞层电阻 值,减少 GCRV 感染状态后细胞连接结构的损 坏,最终实现对病毒 VP7 蛋白的抑制作用;证实 了 AC3 参与 GCRV 感染免疫,为从细胞通透性角 度开展高抗性草鱼分子选育研究提供了直接支持。

参考文献 (References):

- [1] Dai Y L, Li Y Q, Hu X, et al. Nonstructural protein NS17 of grass carp reovirus Honghu strain promotes virus infection by mediating cell-cell fusion and apoptosis[J]. Virus Research, 2023, 334: 199150.
- [2] Li P W, Zhang J, Chang M X. Structure, function and immune evasion strategies of aquareoviruses, with focus on grass carp reovirus[J]. Reviews in Aquaculture, 2024, 16(1): 410 – 432.
- [3] 郑德崇,黄琪琰,蔡完其,等.草鱼出血病的组织病 理研究 [J]. 水产学报,1986,10(2):151-159.
 Zheng D C, Huang Q Y, Cai W Q, *et al.* Histopathological studies on the Hemorrage disease of grass carp[J].
 Journal of fisheries of China, 1986, 10(2):151-159.
- [4] 潘攀. 登革病毒诱导血管渗漏相关分子机制研究 [D]. 武汉:武汉大学, 2019.
 Pan P. Molecular mechanism of vascular leakage induced by Dengue virus [D]. Whan: Wuhan University, 2019.
- [5] Liao Z W, Wan Q Y, Su H, et al. Pattern recognition receptors in grass carp *Ctenopharyngodon idella*: I. Organization and expression analysis of TLRs and RLRs[J]. Developmental & Comparative Immunology,

2017, 76: 93 - 104.

- [6] Lu L F, Li Z C, Zhang C, et al. Grass carp reovirus (GCRV) giving its all to suppress IFN production by countering MAVS signaling transduction[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 545302.
- [7] Bonney S, Seitz S, Ryan C A, et al. Gamma interferon alters junctional integrity via Rho kinase, resulting in blood-brain barrier leakage in experimental viral encephalitis[J]. mBio, 2019, 10(4): e01675 – 19.
- [8] Lynn K S, Peterson R J, Koval M. Ruffles and spikes: control of tight junction morphology and permeability by Claudins[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 2020, 1862(9): 183339.
- [9] 许凡. 草鱼(Ctenopharyngodon idellus) 肠道紧密连接蛋白基因克隆与表达活性分析 [D]. 苏州:苏州大学, 2013.

Xu F. Cloning and expression activity analysis of the tight junction protein genes of grass carp, *Ctenopharyn-godon idellus* [D]. Suzhou: Suzhou University, 2013.

- [10] Van Itallie C M, Anderson J M. Claudins and epithelial paracellular transport[J]. Annual Review of Physiology, 2006, 68: 403 – 429.
- [11] Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, *et al.* Deficiency of claudin-18 causes paracellular H⁺ leakage, up-regulation of interleukin-1β, and atrophic gastritis in mice[J]. Gastroenterology, 2012, 142(2): 292 – 304.
- [12] 杨琰茗,杨雅清,宋杲,等. 腺苷酸环化酶的研究进展[J].临床与病理杂志,2019,39(2):390-394.
 Yang Y M, Yang Y Q, Song G, *et al.* Research progress of adenylate cyclase[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(2): 390-394.
- [13] 黄丽妹,朱建梁,孙敏.哺乳动物腺苷酸环化酶亚型的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志,2011,31(2):161-166.
 Huang L M, Zhu J L, Sun M. Research progress of adenylyl cyclase isoforms in mammals[J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2011, 31(2):161-166.
- Schlegel N, Waschke J. cAMP with other signaling cues converges on Rac1 to stabilize the endothelial barrier— a signaling pathway compromised in inflammation[J].
 Cell and Tissue Research, 2014, 355(3): 587 – 596.
- [15] Tang H, Sun M X, Duan W, et al. Nucleophosmin 1a translocated from nucleus to cytoplasm and facilitate

GCRV replication[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 142: 109153.

[16] 于森.海带(Saccharina japonica)内参基因筛选及部 分管家基因的系统进化分析[D].青岛:中国海洋大 学, 2013.

Yu M. The selection of reference genes in *Saccharina japonica* and phylogenetic analysis of partial housekeeping genes[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2019.

- [17] Su H, Su J G. Cyprinid viral diseases and vaccine development[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 83: 84-95.
- [18] Sun M X, Li Y L, Tang H, et al. GMPR2-MDA5 interaction bridged the cell junction and anti-GCRV immune
 [J]. Aquaculture, 2024, 591: 741152.
- [19] Tsukita S, Tanaka H, Tamura A. The claudins: from tight junctions to biological systems[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2019, 44(2): 141 – 152.
- [20] Rajagopal N, Nangia S. Unique structural features of claudin-5 and claudin-15 lead to functionally distinct tight junction strand architecture[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2022, 1517(1): 225 – 233.
- [21] Sweerus K, Lachowicz-Scroggins M, Gordon E, et al. Claudin-18 deficiency is associated with airway epithelial barrier dysfunction and asthma[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2017, 139(1): 72 – 81.
- [22] LaFemina M J, Sutherland K M, Bentley T, et al. Claudin-18 deficiency results in alveolar barrier dysfunction and impaired alveologenesis in mice[J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2014, 51(4): 550 – 558.
- [23] Roberts O L, Dart C. cAMP signalling in the vasculature:

the role of Epac (exchange protein directly activated by cAMP)[J]. Biochemical Society Transactions, 2014, 42(1): 89 – 97.

- [24] Spindler V, Peter D, Harms G S, et al. Ultrastructural analysis reveals cAMP-dependent enhancement of microvascular endothelial barrier functions via Rac1-mediated reorganization of intercellular junctions[J]. The American Journal of Pathology, 2011, 178(5): 2424 – 2436.
- [25] Bonjardim C A. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses and viruses counteract IFN action[J]. Microbes and Infection, 2005, 7(3): 569 – 578.
- [26] Feng X L, Su J G, Yang C R, et al. Molecular characterizations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) TBK1 gene and its roles in regulating IFN- I pathway[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 45(2): 278 – 290.
- [27] Li Y G, Tang H, Sun M X, et al. The SIDT2/MDA5/IFN axis contributes to virus resistance in teleost fish[J]. Aquaculture, 2024, 583: 740568.
- [28] Ohta K, Saka N, Fukasawa M, et al. Hazara orthonairovirus nucleoprotein facilitates viral cell-to-cell spread by modulating tight junction protein, claudin-1[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1192956.
- [29] Oliver J A. Adenylate cyclase and protein kinase C mediate opposite actions on endothelial junctions [J]. Journal of Cellular Physiology, 1990, 145(3): 536 – 542.
- [30] Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, et al. Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels[J]. American Journal of Physiology, 1992, 262(3): C546 – C554.

Study on functional mechanisms of AC3-mediated GCRV infection in *Ctenopharyngodon idella*

DUAN Wei, TANG Hao, SUN Mingxue, LIAO Yijian, XIAO Tiaoyi, LI Yaoguo* (Fisheries College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: [Background] Grass carp reovirus (GCRV) infection can cause leakage bleeding by increasing vascular endothelial permeability. [Objective] To investigate the functional mechanism of adenylate cyclase 3 (AC3) mediated GCRV infection, a series of studies were conducted in Ctenopharyngodon idella kidney (CIK) cells. [Methods] AC3 overexpression was successfully achieved in CIK cells. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the relative expression of ac3, claudin c, claudin 15, *claudin 18, irf3, irf7, ifn1* and *ifn2* at different time points (0 h, 12 h, and 24 h) of GCRV infection. The protein level of GCRV VP7 was detected by Western blot (WB). The transendothelial electrical resistance (TEER) of the CIK cell layer under various conditions was measured using a cell resistance meter, while the connections between CIK cells were examined using a transmission electron microscope. [Results] The results showed that AC3 overexpression significantly enhanced the expression of tight junction molecules claudin 15 and claudin 18 in CIK cells, but had no significant effect on the expression levels of interfering semaphorin pathway genes *irf3*, irf7, ifn1 and ifn2. However, the protein amount of GCRV VP7 was inhibited. The transepithelial electrical resistance assay demonstrated that AC3 overexpression significantly increased the resistance of the CIK cell layer. Transmission electron microscopy results indicated that AC3 overexpression reduced the extent of damage to CIK cell-to-cell junctions caused by GCRV infection. [Conclusion] In summary, AC3 can influence the relative expression of claudin molecules and the barrier function of cells, inhibiting GCRV proliferation within these cells. [Significance] This study introduces a novel approach for discovering GCRV resistance-related molecules from the perspective of cell permeability.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; adenylate cyclase 3 (AC3); grass carp reovirus (GCRV); cell junction; cell permeability