

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

魚類神經壞死症病毒持續性感之研究(四)

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： NSC93-2311-B-002-018-

執行期間： 93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

執行單位： 國立臺灣大學生命科學系

計畫主持人： 齊肖琪

報告類型： 精簡報告

處理方式： 本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 9 月 21 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

魚類神經壞死症病毒持續性感染之研究(四)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC-93-2311-B-002-018

執行期間：93 年 8 月 1 日 至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：齊肖琪

執行單位：國立台灣大學生命科學系

中 華 民 國 94 年 9 月 1 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC-93-2311-B-002-018

執行期間：93 年 8 月 1 日 至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：齊肖琪 教授

執行機構及單位名稱：國立台灣大學生命科學系

一、中文摘要

本實驗室所建立的金目鱸腦細胞株 (Baramundi Brain cell line, BB cell line) 是源自於爆發病毒性神經壞死症之殘活金目鱸 (Baramundi) 腦組織的細胞株, 已證實有神經壞死症病毒 (Nervous Necrosis Virus, NNV) 的持續性感染。本研究在探討造成 NNV 持續性感染的機制是否與干擾素有關。以抗 NNV 之多源抗體治療持續性感染的 BB 細胞療後, 其上清液的病毒力價明顯自 $10^{3.7}$ TCID₅₀ ml⁻¹ 下降至低於 $10^{1.5}$ TCID₅₀ ml⁻¹, 且完全檢測不到 NNV 病毒核酸及外鞘蛋白質的表現, 而成為不再有 NNV 持續性感染之負對照組細胞 cured BB (cBB)。干擾素會誘發細胞產生 Mx protein, 因此本實驗以 Mx gene 專一核酸引子檢測 BB 及 cBB 細胞, 發現 BB 細胞有 Mx gene 的表現, 而 cBB 細胞則沒有 Mx gene 的表現, 因此干擾素存在於有 NNV 持續性感染的 BB 細胞中。此外, 以 NNV 再度感染的 cBB 細胞, 以及以 poly I:C 轉染 (transfection) 的 cBB 細胞則有 Mx gene 的表現, 證明 NNV 的感染可以誘導 cBB 細胞產生干擾素。在抗病毒活性測試中, 確定 BB 細胞上清液中有干擾素活性的物質, 因此, 干擾素的保護效應是造成 BB 細胞持續

性感染 NNV 的原因。

關鍵字:

魚類神經壞死症病毒, 持續性感染, 干擾素, Mx 基因

Abstract

Nervous necrosis virus (NNV), belonging to betanodavirus of *Nodaviridae*, has caused mass mortality of many species of cultured fish around the world. A new cell line BB was established from the brain tissue of a surviving barramundi (*Lates calcifer*) after viral nervous necrosis disease, and was demonstrated to have NNV-persistent infection. The aim of this study was to examine if NNV-persistent infection in the BB cell line was related to interferon (IFN) response. A negative control cell line was obtained by treating with NNV-specific rabbit antiserum for 5 subcultures. Virus titers of the treated BB cells drastically decreased from $10^{3.7}$ TCID₅₀ ml⁻¹ to levels below $10^{1.5}$ TCID₅₀ ml⁻¹, and neither NNV RNA nor capsid protein could be detected in the cured BB (cBB) cells. The expression of Mx

protein, type I IFN-inducible antiviral protein, was detected in the BB cells but not in the cBB cells; therefore, IFN response existed in the BB cells. In addition, the cBB cells could also express Mx gene through polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) transfection and NNV infection. The result of antiviral activity assay indicated that IFN-like substances existed in the supernatant of BB cells. In conclusion, IFN protection was responsible for the persistence of NNV infection in BB cells.

Key words:

fish nervous necrosis virus, persistent infection, interferon, Mx gene

二、緣由與目的

病毒性神經壞死症(Viral Nervous Necrosis, VNN)在世界各地區造成超過24種的海水養殖魚類以及兩種淡水養殖魚類的急性大量死亡 (Mundy et al., 2002)。台灣自1994年首度證實高屏地區養殖石斑魚感染此症，至今已有八種養殖魚受到此病毒的感染並造成嚴重的經濟損失(Chi et al., 1997; Chi et al., 2001)。民間石斑魚養殖業者，往往在孵化魚苗階段會遇到病毒性神經壞死症的疫情，造成魚苗八成以上的死亡率，殘活的魚苗則銷售下游養殖業者，下游寸苗養殖業者有的養得還好，有的會再次發病，死亡率約五成，發病後殘活的幼魚再轉售成魚養殖業者。因此持續性帶原現象十分普遍，但是有關帶原的機制與影響

的研究十分有限。

本實驗室自NNV疫情爆發後存活的金目鱸腦組織建立了一株有NNV持續性感染的細胞株，命名為BB細胞，免疫染色結果指出細胞族群中只有少數細胞可偵測到NNV抗原；溫度轉移實驗結果指出溫度突變株並非造成持續性感染的原因；來自BB細胞株的結病毒(BBNNV)與急性發病石斑魚結病毒(GNNV)鞘蛋白基因核酸序列比對，BBNNV與其他魚類結病毒分離株有兩個核苷酸的差異，但對影響相對位置胺基酸抗原性影響不大。BB細胞株上清液的力價在 10^2 ~ 10^6 TCID₅₀m⁻¹之間波動，但沒有測到缺陷性病毒干擾粒子(DI particles)的存在。

細胞被病毒持續性感染而不瓦解，有兩種可能性，一種是病毒感染non-permissive cells或在non-permissive environment，所以病毒的表現量受到限制，另一種情況是每代細胞中只有少數的細胞被感染且會因複製病毒而最終瓦解，釋出的病毒因受到干擾(例如細胞分泌干擾素)或是釋出缺陷性干擾粒子多，而影響了野生型病毒的複製以及對細胞的病變現象(Ahmed et al., 1996)。

有些細胞株會因病毒感染而釋放干擾素(interferon, IFN)，干擾素刺激細胞產生多種抑制病毒複製的蛋白質，其中抑制病毒複製能力最強的是Mx protein，Mx protein是一種GTPase，分佈在細胞質或細胞核中，用來抑制病毒的transcription (Samuel, 2001)，所以可利用偵測Mx protein其mRNA的表現有無來推斷細胞有無分泌干擾素(Leong et al., 1998; Trobridge et al., 1997;

Nygaard *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2002)。本實驗目的在求證 NNV 在 BB 細胞中維持持續性感染與干擾素保護機制之間的關連。

三、材料與方法

1. 確認 BB 細胞持續性感染 NNV 的狀態

- (1) 將 BB 細胞上清液感染 GF-1 細胞, 確定會出 CPE.
- (2) 用 GF-1 細胞作為測病毒力價的工具, 連續測 10-15 次繼代 BB 上清液中病毒力價的變化
- (3) 用單元抗體做免疫染色確定只有少數細胞有 NNV 的大量複製

2. 以抗 NNV 的兔子多源抗體治療 BB 細胞的帶原現象

- (1) 在細胞培養液中添加抗 NNV 的兔子抗血清, 連續培養數代的 BB 細胞, 用來中和由細胞釋放到上清液中的 NNV, 減少每一代被感染的細胞數目。
- (2) 收集處理過的 BB 細胞上清液, 做病毒力價測試, 直到測不到力價為止。
- (3) 用免疫化學染色處理過的 BB 細胞來確定不再有染上色的細胞存在。
- (4) 如果可以得到完全治癒的 BB 細胞, 將命名為 cured BB Cells (簡稱 cBB Cells), 作為以下實驗的負對照組。

3. 偵測 BB 細胞是否有 Mx gene 的表現

- (1) 上網查詢其他已發表的魚類 Mx

gene 序列, 比對找出保留區, 根據保留區的序列來設計核酸引子。

- (2) 分別萃取 BB, 及 cBB 細胞的 RNA, 用所設計的核酸引子做 RT-PCR, 檢測 Mx mRNA 的存在與否。
- (3) 以 poly I:C 處理 RTG-2 細胞株, 作為會表現 Mx gene 的正對照組。
- (4) 如果有測到預定的 RT-PCR 產物, 則進行定序, 並與其他已發表的魚類 Mx gene 序列進行比對。

4. 抗病毒活性測試

- (1) 用本實驗室所建立的具有中和 NNV 能力的單源抗體, 中和 BB 細胞上清液的 NNV, 處理完畢的 BB 細胞上清液, 感染 GF-1, 確定不會有 CPE 之後才進行以下實驗。
- (2) 先將 cBB 細胞上清液倒掉, 加入 (1) 中去 NNV 之後的 BB 上清液, 培養一段時間, 然後用 PBS 洗數次, 再感染 NNV。
- (3) 同 (2), 但是以 poly I:C 取代去 NNV 之後的 BB 上清液, 刺激 cBB 細胞, 然後用 PBS 洗淨, 感染 NNV。

四、結果與討論

1. 多源抗體治療 BB 細胞持續性感染之效果評估

BB 細胞於 95~99 代期間的培養加入抗 NNV 的多源抗體來進行治療, 第 100 代以後就不再加入多源抗體, 期間將每代的細胞上清液做病毒力價分析, 結果發現 cBB 細胞在治療期間

及治療後，其細胞上清液之病毒力價皆低於 $10^{1.5}$ TCID₅₀ml⁻¹，而 BB 細胞仍持續釋放病毒於細胞上清液中，力價仍在 10^3 ~ 10^7 TCID₅₀ml⁻¹ 之間 (Fig.1)。在 BB 細胞可測到病毒核酸 T4，而 cBB 細胞則完全測不到，表示在治療過的 cBB 細胞中已無 NNV 的存在 (Fig.2)。免疫組織化學染色結果發現 BB 細胞質中可染到病毒外鞘蛋白質，而 cBB 細胞則測不到，再次確認了多源抗體對 NNV 持續性感染之療效 (Fig.3)。

2. Mx gene 的表現

以 RT-PCR 測試 BB 及 cBB 細胞，結果 BB 細胞表現 Mx gene (Fig.4)，其中高保守區域為長度 150 bp 片段，經定序後與 perch Mx gene 做比對，相似度達 94.4%，轉譯成胺基酸序列後的片段，包含了 Mx gene 中的 tripartite ATP/GTP binding site。帶原的 BB 細胞會表現 Mx gene，表示有 IFN 的產生；而治療好的 cBB 細胞，因為不帶原，所以不會有病毒刺激細胞產生 IFN，也就沒有 Mx gene 的表現。將治療好的 cBB 細胞以 GNNV 感染，會再度啟動 Mx gene 的表現。因為 poly I:C 可刺激 RTG-2 細胞株表現 Mx gene (Trobridge, 1995)，因此以 poly I:C 培養 RTG-2 表現 Mx gene，當做正對照組；無 poly I:C 刺激的 RTG-2 則沒有 Mx gene 表現當做負對照組。結果發現 poly I:C 無法經由添加在細胞培養液中達到刺激 cBB 細胞表現 Mx gene，然而若將 poly I:C 以轉染 (transfection) 的方式送入 cBB 細胞，則可以誘導該細胞表現 Mx gene，因

此推測 cBB 細胞表面不具有 dsRNA (poly I:C) 的受器。

3. 抗病毒活性測試 (antiviral activity assay)

Mx gene 的表現證明了帶原的 BB 細胞會分泌 IFN，因此進一步以 BB 細胞上清液來做抗病毒活性測試，但 BB 細胞上清液同時含有 IFN 及 BBNNV，為了不使 BBNNV 影響抗病毒活性測試，因此必須事先將 BB 細胞上清液中的 BBNNV 經單源抗體中和後，剩下 IFN 用來做抗病毒活性測試。結果發現以 BB 細胞上清液處理過的 cBB 細胞，再感染 NNV 病毒株 B00GD，結果細胞的相對存活率就很高，經由 poly I:C 轉染 (transfection) 處理過的 cBB 細胞 (正對照組) 也是如此，但是，用 L15 培養液處理的 cBB 細胞 (負對照組) 或是只有用 MAb 共同培養的 cBB 細胞 (負對照組)，細胞會因病毒複製而瓦解，細胞相對存活率就很低 (Fig.5)，因此證明 BB 細胞上清液中有誘導細胞產生抗病毒效應的活性物質 (IFN)，使得被 BB 上清液處理過的細胞產生明顯的抗病毒效應，不致因為 B00GD 的感染而病變或死亡。

活化 IFN gene 訊息傳遞的路徑有三種：(1) 受質-受體 (ligand-receptor) 傳遞路徑，就是 IFN 與細胞膜上的受體結合，引發訊息傳遞，然後活化細胞質中的 IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF-3)，接著 ISGF-3 會到細胞核中活化與 IFN 有關的一連串基因而產生抗病毒蛋白質 (例如 Mx protein)，也會產生 IFN 釋出細胞外產生正回饋作用；(2) 病毒的入侵，當

毒感染細胞後，間接活化 IFN 訊息傳遞的上游物質，或直接活化 cellular transcription factor，例如 IFN regulated factor 3 (IRF-3)，再活化 IFN gene，產生 Mx protein，並產生 IFN 釋出細胞外；(3) 雙股 RNA (例如 poly I:C) 之刺激 (Samuel, 2001)，活化 IRF-3，然後活化 IFN gene 產生 Mx protein 及 IFN。本實驗發現，cBB 細胞可經由單源抗體中和 NNV 病毒之後的 BB 細胞上清液誘發細胞產生抗病毒活性，或經由 GNNV 的感染引發細胞表現 Mx gene，或經由 poly I:C 的轉染而產生抗病毒效應活化 IFN gene 訊息傳遞的路徑有三種：(1) 受質-受體 (ligand-receptor) 傳遞路徑，就是 IFN 與細胞膜上的受體結合，引發訊息傳遞，然後活化細胞質中的 IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF-3)，接著 ISGF-3 會到細胞核中活化與 IFN 有關的一連串基因而產生抗病毒蛋白質 (例如 Mx protein)，也會產生 IFN 釋出細胞外產生正回饋作用；(2) 病毒的入侵，當毒感染細胞後，間接活化 IFN 訊息傳遞的上游物質，或直接活化 cellular transcription factor，例如 IFN regulated factor 3 (IRF-3)，再活化 IFN gene，產生 Mx protein，並產生 IFN 釋出細胞外；(3) 雙股 RNA (例如 poly I:C) 之刺激 (Samuel, 2001)，活化 IRF-3，然後活化 IFN gene 產生 Mx protein 及 IFN。本實驗發現，cBB 細胞可以經由單源抗體中和 NNV 病毒之後的 BB 細胞上清液誘發細胞產生抗病毒活性 (Fig 6)，或經由 GNNV 的感染引發細胞表現 Mx gene (Fig. 4)，因此 BB 細胞中的 IFN gene 訊息傳遞路徑應是屬

於前兩種，但 cBB 細胞不會因為 poly I:C 刺的刺激而表現 Mx gene，或引發抗病毒能力，所以推測第三種 IFN gene 訊息傳遞路徑在 cBB 細胞中是不具功能的。

實驗結果顯示，帶原的 BB 細胞有 Mx gene 的表現，且在抗病毒活性測試中證實了 BB 細胞上清液中含有似干擾素的抗病毒物質，又從免疫組織化學染色中發現 BB 細胞族群中大部分的細胞是健康的，只有少數細胞的細胞質中充滿了 NNV 病毒蛋白質，因此推測是干擾素持續的分泌，保護了大部分的細胞，只有少數細胞因狀態不佳或抵抗較弱而受到病毒感染，藉此造成整個 BB 細胞族群持續性感染的狀態。

五、計畫成果自評

本研究結果非常重要，是第一篇用體外培養系統證實了魚類神經壞死症病毒的致病機制乃寄主細胞的干擾素保護效應所致，對於了解活體魚的持續性感染研究有很高的參考價值。

六、參考文獻

- Ahmed R., Morrison L.A. and Knipe D.M.(1996). In: Fields B.N., D.M.Knipe, P.M.Howley (Eds), Fundamental Virology. Lippincott Williams and Wilkins p 210-217.
- Chi, S. C., Lo, B. J. & Lin, S. C. (2001). *J Fish Dis* 24, 3-13.
- Chi, S. C., Lo, C. F., Kou, G. H., Chang, P. S., Peng, S. E. & Chen, S. N. (1997). *J Fish Dis* 20, 185-193.
- Chi, S. C., Wu, Y. C. & Cheng, T. M.

- (2005). *Dis Aqua Organ* **65**, 91-98.
- Jensen, I., Larsen, R. & Robertsen, B. (2002). *Fish Shellfish Immunol* **13**, 367-78.
- Leong, J. C., Trobridge, G. D., Kim, C. H., Johnson, M. & Simon, B. (1998). *Immunol Rev* **166**, 349-63.
- Munday, B. L., Kwang, J. & Moody, N. (2002). *J Fish Dis* **25**, 127-142.
- Nygaard, R., Husgard, S., Sommer, A. I., Leong, J. A. & Robertsen, B. (2000). *Fish Shellfish Immunol* **10**, 435-50.
- Samuel, C. E. (2001). *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809.
- Shieh, J. R. & Chi, S. C. (2005). *Dis Aquat Organ* **63**, 53-60.
- Trobridge, G. D., Chiou, P. P., Kim, C. H. & Leong, J. C. (1997). *Dis Aqua Organ* **30**, 91-98.

七、圖表

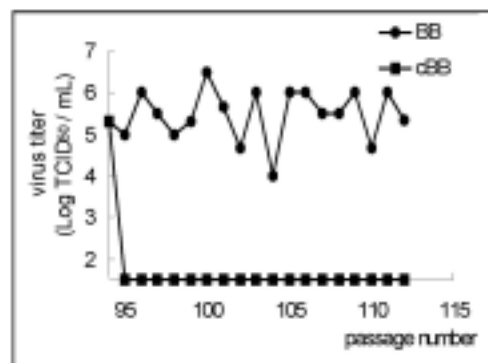


Fig. 1 Viral titers of culture supernatants from BB and cBB cells.

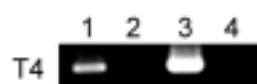


Fig. 2 Detection of NNV RNA in BB and cBB cells by RT-PCR and semi-nested PCR. The target fragment of semi-nested PCR is T4. Lane1, BB cells; 2, cBB cells; 3, NNV-infected grouper larvae as positive control; 4, template-free negative control.

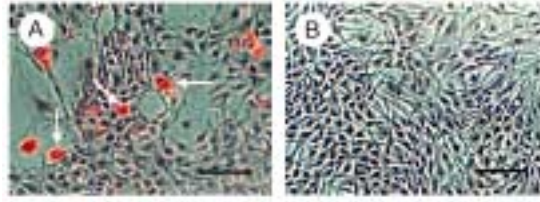


Fig. 3 Detection of NNV capsid protein in BB and cBB cells by immunochemical staining using NNV-specific MAb. The arrowheads indicated the positive signals revealed by fast-red. (A) BB cells, (B) cBB cells. Bar = 100 μ m.

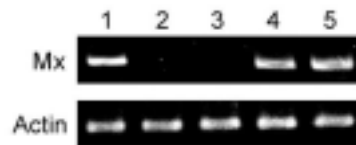


Figure 4. Detection of Mx mRNA by RT-PCR. Lane 1, BB cells; 2, cBB cells; 3, poly I:C-incubated cBB cells; 4, poly I:C-transfected cBB cells; 5, B00GD-infected cBB cells. Actin bands confirmed the presence of equal amounts of cDNA in all samples.

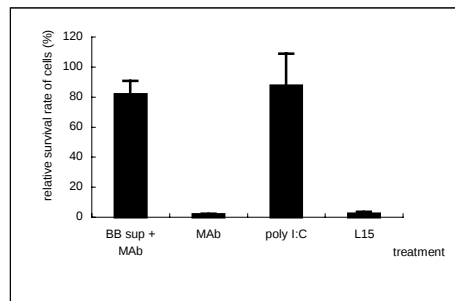


Fig. 5 Anti-NNV activity of cBB cells after different treatments. The cBB cells were pre-seeded in 96-well plate, and then separately incubated with NNV-specific MAb-neutralized BB cell supernatant, NNV-specific MAb and L15 medium, or were transfected with poly I:C. After 24-hour treatment, all the supernatants were removed, and NNV B00GD was used to infect the treated cells. The cells without any treatment nor NNV infection was regarded as non-infected control. Fourteen days post viral infection, OD₅₉₅ values of all wells were measured after crystal violet staining. The relative survival rate of cBB cells in each treatment was calculated using the formula: (the average OD₅₉₅ value of 4 wells of each treatment / the average OD₅₉₅ value of 4 wells of the non-infected control)×100%. Bars represent standard deviations.