

PHA 体外诱导草鱼白细胞产生 γ -干扰素的研究*

邵健忠 项黎新

(浙江大学生命科学院 杭州 310012)

提要 于 1997 年 10 月—1999 年 3 月, 采用半数细胞病变抑制等方法, 进行植物凝集素 (Phytoagglutinin, PHA) 体外诱导草鱼白细胞产生 γ -干扰素的研究。结果表明, 在 PHA 诱导的草鱼白细胞培养液中出现了一种抗病毒因子, 经理化和生物学性质鉴定证明, 该因子是一种干扰素活性物质。但它不同于病毒诱导的 α/β -干扰素, 主要表现为: 对 56℃、pH=2 和 0.1% SDS 敏感; 其活性不能被病毒诱导的干扰素抗体所中和; 其诱生剂为 PHA, 来源于白细胞; 在诱导条件上, 佛波酯 (PMA) 和白细胞介素-2 (IL-2) 能显著地促进其诱生, 这些特性与人类和高等脊椎动物中报道的 γ -干扰素相符, 表明是一种 γ 性质的干扰素。

关键词 植物凝集素, 草鱼白细胞, γ -干扰素, 体外诱生

中图分类号 Q592

干扰素 (Interferon, IFN) 是一种重要的细胞功能调节因子, 具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等功能, 其研究正日益受到重视。近年来, 鱼类 IFN 的研究已取得一定进展。国内外学者先后在鲮鱼 (*Pimephales promelas*)、虹鳟 (*Salmon gairdneri*)、牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 和鲫鱼 (*Cyprinus carpio*) 等鱼类或细胞中诱生出 IFN (Gravell *et al.*, 1965; Beasley *et al.*, 1966; Oie *et al.*, 1971; De-Kincklin *et al.*, 1973; Roge & Gaillard *et al.*, 1993; Tamai *et al.*, 1993; 江育林等, 1991; 王铁辉等, 1999; 邵健忠等, 1993, 1998), 但以上研究均采用病毒作为诱生剂, 诱导产生的 IFN 性质与人类和高等脊椎动物的 IFN- α/β 相一致。对于鱼类中是否存在其它性质的 IFN, 以及能否用非病毒诱生剂 PHA 诱导鱼类产生 γ -干扰素 (IFN- γ) 等问题尚无研究。近年来, 作者在该方面进行了探索, 以期深入揭示鱼类干扰素的性质与功能提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

二龄草鱼 200 余尾, 鱼体长 (25±4.5) cm, 体重 (250±20) g, 于 1997 年 10 月—1998 年 3 月购自杭州市水产研究所, 实验前置水族 25℃ 饲养 2 周, 确证健康后使用。

* 国家自然科学基金资助项目, 39400100 号, 39970589 号; 浙江省自然科学基金资助项目, 397300 号。邵健忠, 男, 出生于 1963 年 1 月, 博士, 副教授, E-mail: lscshaoj@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 1999-11-23, 收修改稿日期: 2000-02-28

1.2 细胞

草鱼吻端组织细胞株 ZC7901、胚胎细胞系 CP80 和肾细胞系 CIK 引自浙江省淡水水产研究所,人羊膜细胞株 WISH 引自美国印地安那大学 Taylor 实验室,猪肾细胞系 PK15 和鸡胚肾细胞系 CEK 由浙江省农业科学院病毒研究所提供,三角帆蚌肾原代细胞系 HcK94 由作者实验室建立。以上细胞按常规法(陈瑞铭,1991)用含 10% 胎牛血清(FCS)的 TG-199 或 RPMI-1640 培养液培养。

1.3 病毒

草鱼出血病病毒(GCHV)、草鱼小 RNA 病毒(GCPV)、三角帆蚌瘟病病毒(HcPV)、人滤泡性口炎病毒(VSV)、鸡传染性支气管炎病毒(IBV)和马尔克氏病疱疹病毒(MD-HV)由本实验室分离和保存;猪水泡病病毒(SVDV)和口蹄疫病毒(FMDV)由浙江省农业科学院病毒研究所提供。以上病毒分别在 ZC7901、CP80、HcK94、WISH、PK15 和 CEK 等细胞上增殖传代,按 Rees & Muench 法(殷震等,1997)测定滴度 T₅₀。

1.4 草鱼白细胞的分离与培养

参照 Hardie 等(1994)方法进行。在无菌条件下取外周血、头肾和脾脏组织,外周血加肝素抗凝,经 Hank's 液稀释一倍后在试管中静置 1—2h,取上层富含白细胞的血浆层,置 51% Percoll 介质上,于 4℃400g 离心 40min,收集分布于血浆与 Percoll 界面处的白细胞。头肾和脾脏置培养皿中,加入适量含 2% FCS、1% 青霉素/链霉素(P/S)和 0.2% 肝素的 L-15 培养液,轻轻梳刮成细胞悬液,经 120[#] 金属网过滤后置 51% Percoll 上,按上述条件分离白细胞。然后将 3 种组织的白细胞混合培养于含 10% FCS、1% P/S 和 0.2% 肝素的 L-15 培养液中,细胞浓度为 5×10^6 ind/ml。

1.5 草鱼 IFN- γ 的诱生方法

在白细胞中加入终浓度为 75 μ g/ml 纯化的植物凝集素(PHA-P, Sigma 公司)和 20ng/ml 佛波酯(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, PMA, Sigma 公司),27℃ 诱导 6h 后,用 10mmol/L 磷酸缓冲生理盐液(PBS, pH=7.2)轻轻洗涤白细胞 5 次,然后加入含 1% FCS、1% P/S 的 L-15 培养液,48h 后收集培养液,10 \times 10⁴g 离心 1h,冰冻干燥浓缩,再经 TG-199 培养液透析和过滤除菌后测定干扰素活性,同时设不加 PHA 诱导组为对照。

1.6 草鱼 IFN- γ 的活性测定方法

采用半数细胞病变抑制法(侯云德,1985)。将细胞接种于 96 孔板,待生长至单层饱和密度时除去培养液,加 2 倍稀释度的 IFN- γ 样品 0.1ml,每稀释度接种 3 孔,27℃ 作用 12h 后用 PBS 洗净样品,加 100T₅₀ 病毒攻击,待病毒对照孔细胞病变效应(CPE)完全后,观察干扰素孔的 CPE 抑制作用。以能抑制 50% 病变的最高稀释度作为干扰素活性单位,用 log₂CPEI₅₀/0.1ml 表示。

1.7 草鱼 IFN- γ 的理化和生物学性质测定

1.7.1 部分理化因子对草鱼 IFN- γ 活性的影响 参照邵健忠等(1998)的方法进行。测定 IFN- γ 经离心、透析、56℃、pH=2、0.1% SDS、氯仿、胰蛋白酶、DNase I、RNaseA、葡糖苷酶、NaIO₄、磷酸酯酶处理前后的活性变化。

1.7.2 DNA 抑制剂对草鱼 IFN- γ 活性的影响 在测定草鱼 IFN- γ 活性前,先用 10⁹ g/ml 放线菌素 D(ActD)预处理细胞 6—8h,然后加入 IFN- γ ,测定其活性,与未经 ActD 处

理的细胞作比较, 观察 IFN- γ 的活性变化。

1.7.3 草鱼 IFN- γ 作用的细胞与病毒特异性 参照邵健忠等(1998)的方法进行。分别测定草鱼 IFN- γ 在鱼类、人类、哺乳类、鸟类和贝类等不同的细胞-病毒系统中的活性, 观察其抗病毒的差异。

1.7.4 病毒诱生的草鱼 IFN 抗体对 IFN- γ 活性的中和作用 在 IFN- γ 样品中加入病毒诱生的 IFN- α/β 兔抗体(作者实验室制备, 效价为 1: 250), 37 °C 温育 1h 后, 分别测定抗体中和作用前后 IFN- γ 的活性, 同时设 IFN- α/β 组为对照。

1.8 草鱼 IFN- γ 部分诱生条件

1.8.1 PHA 浓度 在相同数量(5×10^7)的白细胞中, 分别加入终浓度为 0、12.5、25、50、75 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PHA 和 20 ng/ml PMA, 27 °C 各诱导 6h 后, 按前述方法制备 IFN 样品, 测定活性。

1.8.2 PHA 诱导时间 在上述数量的白细胞中分别加入终浓度为 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA, 27 °C 分别诱导 3、6、9、12 和 24h, 然后制备 IFN 样品, 测定活性。

1.8.3 PMA 浓度 在 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA 诱生剂中分别加入浓度为 0、5、10、15、20、25 和 30 ng/ml 的 PMA, 27 °C 分别诱导白细胞 6h 后, 制备 IFN 样品, 测定活性。

1.8.4 IL-2 浓度 在 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA 诱生剂中分别加入浓度为 0、50、100、200、500、1000 和 1500 U/ml 的重组人白细胞介素-2 (rhIL-2, Sigma 公司), 27 °C 分别诱导白细胞 6h 后, 制备 IFN 样品, 测定活性。

2 结果

2.1 PHA 诱导的草鱼 IFN- γ 的活性测定

取 PHA 诱导的白细胞培养物 10 份, 分别测定其在 ZC7901 和 CP80 细胞中对 GCHV 和 GCPV 的 CPE 抑制作用。结果显示, 所测样品在两种草鱼细胞和病毒系统中均呈现出明显的干扰素抗病毒活性, 平均滴度可达 7.33 ± 0.24 以上。而未经 PHA 诱导的对照组样品, 均未检测到 IFN 活性。表明 PHA 作用于白细胞后能有效地诱导 IFN 的合成(表 1)。

表 1 PHA 诱导的草鱼 IFN- γ 的抗病毒活性测定

Tab. 1 Assay of IFN- γ activity from leucocytes of grass carp induced by PHA

病毒	被感染细胞 ¹⁾	干扰素滴度 ²⁾	
		PHA 诱导组	对照组
GCHV	ZC7901	7.68 ± 0.12	0
GCHV	CP80	7.54 ± 0.21	0
GCPV	ZC7901	7.89 ± 0.16	0
GCPV	CP80	7.33 ± 0.24	0

1) 用 100 TCID₅₀ GCHV (TCID₅₀ = $10^{5.8}/0.1\text{ml}$) 和 GCPV (TCID₅₀ = $10^{5.6}/0.1\text{ml}$) 感染; 2) 单位为 $\log_2\text{CPEI}_{50/0.1\text{ml}}$, $n = 10$

2.2 草鱼 IFN- γ 的理化和生物学性质测定

2.2.1 部分理化因子对 IFN- γ 活性的影响 结果显示, 草鱼 IFN- γ 经 $10 \times 10^4\text{g}$ 离心 2h 不沉降, 对 PBS 4 °C 透析 12h 效价不受影响, 对热、酸和 0.1% SDS 敏感, 对脂溶剂不敏感, 抗 DNase 和 RNase, 但胰蛋白酶能使其迅速失活。用两种葡糖苷酶和 NaIO₄ 裂解糖基, 活性显著下降, 说明其具有糖蛋白的性质; 而两种磷酸酯酶的作用不影响其活性, 提示

其未经明显的磷酸化修饰。草鱼白细胞 IFN- γ 的以上特征与人类和高等脊椎动物中报道的 IFN- γ 相一致(Sidney, 1981; 侯云德, 1990), 见表 2。

表 2 部分理化因子对草鱼 IFN- γ 活性的影响

Tab. 2 Influence of some physi-chemical factors on the activity of IFN- γ of grass carp

处理方法	干扰素滴度 ¹⁾					$\bar{X} \pm SD$	t 检验 ²⁾
	1	2	3	4	5		
对照	7.54	7.46	7.61	7.50	7.72	7.57 \pm 0.10	
10 \times 10 ⁴ g4 $^{\circ}$ C2h	7.62	7.68	7.52	7.52	7.44	7.56 \pm 0.09	$P > 0.05$
Dialyze4 $^{\circ}$ C12h	7.68	7.72	7.74	7.56	7.52	7.64 \pm 0.10	$P > 0.05$
56 $^{\circ}$ C2h	2.88	3.14	3.12	2.96	2.79	2.98 \pm 0.15	$P < 0.01$
pH= 2.04 $^{\circ}$ C24h	2.12	2.33	2.19	2.25	2.22	2.22 \pm 0.08	$P < 0.01$
0.1% SDS 25 $^{\circ}$ C1h	3.16	3.28	2.97	2.99	3.21	3.12 \pm 0.14	$P < 0.01$
Chloroform 25 $^{\circ}$ C1h	7.48	7.53	7.60	7.49	7.55	7.53 \pm 0.05	$P > 0.05$
Trypsin 37 $^{\circ}$ C2h	0	0	0	0	0	0	
DNase 37 $^{\circ}$ C2h	7.66	7.60	7.51	7.50	7.64	7.58 \pm 0.07	$P > 0.05$
RNase 37 $^{\circ}$ C2h	7.59	7.66	7.82	7.52	7.60	7.64 \pm 0.11	$P > 0.05$
α -Glucosidase 37 $^{\circ}$ C2h	5.10	4.89	5.22	4.98	5.02	5.04 \pm 0.12	$P < 0.01$
β -Glucosidase 37 $^{\circ}$ C2h	4.82	5.23	5.06	5.31	4.92	5.07 \pm 0.21	$P < 0.01$
NaIO ₄ 4 $^{\circ}$ C24h	5.92	6.06	6.11	5.49	5.12	5.74 \pm 0.42	$P < 0.01$
AKP 37 $^{\circ}$ C2h	7.42	7.51	7.58	7.37	7.60	7.50 \pm 0.09	$P > 0.05$
ACP 37 $^{\circ}$ C2h	7.62	7.54	7.66	7.50	7.57	7.58 \pm 0.06	$P > 0.05$

1) 单位为 log₂CPEI₅₀/0.1ml; 2) 与对照组比较

2.2.2 DNA 抑制剂对草鱼 IFN- γ 活性的影响 ActD 是一种转录抑制剂, 它通过与 DNA 结合而抑制依赖于 DNA 的 RNA 合成。实验表明, 低浓度(10⁹g/ml) 的 ActD 对草鱼细胞无毒性作用, 对病毒在细胞中增殖所引起的 CPE 也无明显的干扰, 但若细胞经 ActD 预处理 6—8h, 再加入 IFN- γ , 这时其抗病毒作用消失, 活性完全被抑制。这可以反映草鱼 IFN- γ 的作用机制是依赖于细胞内 RNA 和蛋白质的生物合成, 即它对病毒的抑制作用是通过细胞内转录和转译水平的调控途径来完成的。这一特性与高等脊椎动物干扰素的作用机理是相符合的。

2.2.3 草鱼 IFN- γ 作用的细胞和病毒特异性 草鱼 IFN- γ 在几种不同的细胞和病毒系统中的活性测定结果显示, 它在 3 种不同的草鱼细胞和病毒系统中均具有明显的抗病毒活性, 但在人、哺乳类、鸟类和贝类细胞中无抑制病毒的活性, 表现出其抗病毒作用具有相对的细胞种属特异性及在同种细胞中具有抗病毒的广谱性, 这与高等脊椎动物干扰素的特征也是相符的(表 3)。

2.2.4 病毒诱导的 IFN 抗体对 IFN- γ 活性的中和作用 结果显示, IFN- γ 在病毒诱导的 IFN- α/β 特异性抗体中和反应前后, 其活性并无显著性变化($P > 0.05$), 而对照组的 IFN- α/β 经中和反应后活性丢失($P < 0.01$), 说明 PHA 诱导的 IFN- γ 与病毒诱导的 IFN- α/β 之间存在不同的抗原特异性, 是两类不同的抗原分子(表 4)。

表 3 草鱼 IFN- γ 在不同细胞中的抗病毒活性测定Tab. 3 Assay of antiviral activity of IFN- γ in different cell lines

病毒	被感染细胞 ¹⁾	干扰素滴度 ²⁾	病毒	被感染细胞 ¹⁾	干扰素滴度 ²⁾
GCHV	ZC7901	7.62 ± 0.24	VSV	WISH	0
GCHV	CP80	7.66 ± 0.20	SVDV	PK15	0
GCHV	CIK	7.58 ± 0.18	FMDV	PK15	0
GCPV	ZC7901	7.71 ± 0.26	IBV	CEK	0
GCPV	CP80	7.63 ± 0.12	MDHV	CEK	0
GCPV	CIK	7.49 ± 0.30	HcPV	HcK94	0

1) 用 100TCID₅₀ GCHV (TCID₅₀ = 10^{5.8}/0.1ml)、GCPV (TCID₅₀ = 10^{5.6}/0.1ml)、VSV (TCID₅₀ = 10^{8.5}/0.1ml)、SVDV (TCID₅₀ = 10^{7.4}/0.1ml)、FMDV (TCID₅₀ = 10^{7.6}/0.1ml)、IBV (TCID₅₀ = 10^{6.2}/0.1ml)、MDHV (TCID₅₀ = 10^{7.0}/0.1ml) 和 HcPV (TCID₅₀ = 10^{5.8}/0.1ml) 感染; 2) 单位为 log₂CPEI₅₀/0.1ml, n = 5

表 4 PHA 诱导的 IFN- γ 与病毒诱导的 IFN- α/β 的抗原特异性分析Tab. 4 Antigenic characteristic analysis between IFN- γ induced by PHA and IFN- α/β induced by virus

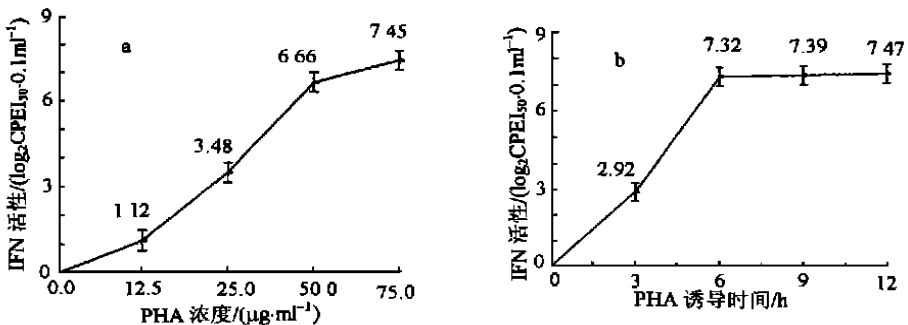
IFN 种类	诱生剂	IFN 滴度 ¹⁾		t 检验 ²⁾
		中和反应前	中和反应后	
IFN- γ	PHA	7.62 ± 0.31	7.57 ± 0.22	P > 0.05
IFN- α/β	GCHV	11.24 ± 0.46	0.61 ± 0.58	P < 0.01

1) 单位为 log₂CPEI₅₀/0.1ml, n = 5; 2) 中和反应前后相比较

2.3 草鱼 IFN- γ 部分诱生条件

2.3.1 PHA 浓度 结果显示, 浓度为 100 μ g/ml 的 PHA 对草鱼白细胞有较高的毒性, 能使细胞在短时间内死亡, 因此该实验组未检测到明显的 IFN- γ 活性, 而在该剂量以下, 随着 PHA 浓度的增高, IFN- γ 活性也随之升高, 说明在致死剂量(100 μ g/ml) 以下提高 PHA 浓度能促进 IFN- γ 的诱生(图 1a)。

2.3.2 PHA 诱导时间 结果显示, PHA 诱导的 IFN- γ 活性随诱导时间的不同而不同, 其中 6h、9h 和 12h 诱导组的 IFN- γ 活性较高, 三者间无显著差异(P > 0.05), 3h 诱导组的 IFN- γ 活性较低, 而 24h 诱导组对细胞产生一定的毒性, 部分细胞死亡, 其结果无法统计(图 1b)。

图 1 PHA 浓度(a) 和诱导时间(b) 对草鱼 IFN- γ 诱生的影响Fig. 1 Influence of PHA concentration (a) and inducing time (b) on the induction of grass carp IFN- γ

2.3.3 PMA 浓度 结果显示,在 5—20ng/ml 浓度范围内,PMA 对草鱼白细胞无毒性,而当 PMA 浓度增加至 25ng/ml 以上,则对细胞产生毒性,造成部分细胞死亡。在无毒性浓度范围内,PMA 与 PHA 共诱导组的 IFN- γ 活性均显著地高于不加 PMA 的对照组($0.01 < P < 0.05$, $P < 0.01$),说明 PMA 对 PHA 诱导草鱼白细胞产生 IFN- γ 具有明显的促进作用,其促进效应随着所加入的 PMA 浓度的增加而增强(图 2a)。

2.3.4 IL-2 浓度 结果显示,当 IL-2 浓度低于 1500U/ml 时,对草鱼白细胞无毒性,在 50—1000U/ml 浓度范围内,IL-2 对 PHA 诱生 IFN- γ 具有明显的促进作用,加 IL-2 诱导组的 IFN 活性显著地高于不加 IL-2 的对照组,促进作用随 IL-2 浓度的增加而增加(图 2b)。

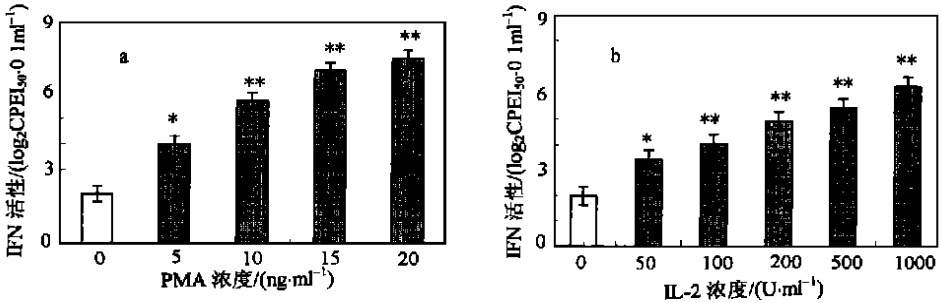


图 2 不同浓度的 PMA(a) 和 IL-2(b) 对草鱼 IFN- γ 诱生的影响

Fig. 2 Influence of different PMA(a) and IL-2(b) concentrations on the induction of grass carp IFN- γ

注:与对照组(0ng/ml)相比,* $0.01 < P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 讨论

在 PHA 诱导后的草鱼白细胞培养液中检测到了一种高效的抗病毒活性物质,经理化和生物学性质鉴定表明,该物质是一种非球蛋白性质的糖蛋白分子,具有在多种草鱼细胞中抵抗不同病毒的能力,表现出在同种细胞上具有广谱的抗病毒活性,但在人类、哺乳类、鸟类及贝类等非鱼类细胞上,无抗病毒活性,表现出在不同种属的细胞间具有抗病毒的特异性,其抗病毒过程不是直接杀灭病毒,而是通过细胞内 RNA 和蛋白质的合成途径来完成,涉及抗病毒相关基因的表达,这些性质与干扰素的判断标准相一致,表明是一种干扰素活性物质(Sidney, 1981; 侯云德, 1990)。

目前已在人类和高等脊椎动物中鉴别出 α 、 β 、 γ 、 ω 等不同型别的干扰素,它们在诱生剂种类和诱生规律、细胞来源、理化性质、抗原特异性和生物学功能等方面存在差异,其中 γ 干扰素主要由 PHA 等有丝分裂原诱导产生,来源于白细胞,佛波酯和白细胞介素-2 能显著地促进其诱生,具有对 56℃、pH=2 和 0.1% SDS 敏感等特征,因此在早期亦称为酸不稳定性干扰素(Sidney, 1981)。本文通过 PHA 诱导草鱼白细胞产生的干扰素与上述 γ 干扰素的特征相一致,说明是一种 γ 干扰素物质。

作者等曾用病毒作为诱生剂,先后在草鱼及其体外培养细胞中诱生出 α/β 性质的干扰素,其理化性质与本文报道的 γ 干扰素有很大差异(邵健忠等, 1993, 1998)。本实验进一步对两者的血清学性质进行了鉴定,结果也表明它们具有不同的抗原特异性,是两类不

同性质的干扰素。研究结果揭示了鱼类中存在不同类型的干扰素,这对深入探讨鱼类干扰素的性质与功能以及干扰素的分子进化等具有理论意义。

致谢 闫春兰同志参加部分工作,并承蒙毛树坚教授大力指导,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王铁辉, 张义兵, 李戈强等, 1999. 鱼类培养细胞干扰素的诱导. 病毒学报, 15(1): 43—49
- 江育林, 李正秋, 1991. 病毒诱导的草鱼细胞产生类干扰素物质的研究. 病毒学报, 7(1): 30—35
- 陈瑞铭主编, 1991. 动物组织培养技术及其应用. 北京: 科学出版社, 87—97
- 邵健忠, 项黎新, 李亚南等, 1993. 从草鱼细胞分离到一种抗出血病病毒蛋白因子的研究. 病毒学报, 9(4): 350—360
- 邵健忠, 钱凯先, 项黎新等, 1998. 病毒诱导草鱼产生干扰素活性因子的研究. 病毒学报, 18(4): 135—145
- 侯云德主编, 1985. 病毒基因工程原理与方法. 北京: 人民卫生出版社, 245—247
- 侯云德主编, 1990. 分子病毒学. 北京: 学苑出版社, 598—647
- 殷 震, 刘景华, 1997. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 329—330
- Beasley A R, Sigel M M, Clem L W, 1966. Latent infection in marine fish cell tissue cultures. Proc Soc Exp Biol Med, 121: 1169—1174
- De-Kinkelin P, Dorson M, 1973. Interferon production in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus. J Gen Viral, 19: 125—127
- Gravell M, Malsberger R G, 1965. A permanent cell line from the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). Ann N Y Acad Sci, 126: 555—565
- Hardie L J, Fletcher T C, Secombes C, 1994. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. J Dev Comp Immunol, 18(1): 57—66
- Oie H K, Loh P C, 1971. Reovirus type 2: Induction of viral resistance and interferon production in Fathead Minnow cells. Proc Soc Exp Biol Med, 136: 369—373
- Rogel-Gaillard C, Chilmonczyk S, De Kinkelin P, 1993. In vitro induction of interferon-like activity from rainbow trout leucocytes stimulated by Egtved virus. Fish Shellfish Immunol, 3(5): 383—394
- Sidney P, 1981. Definition and Classification of the Interferon. In: Sidney P ed. Methods in Enzymol, Vol. 78. New York: Academic Press, 3—8
- Tamai T, Shirahata S, Sato N *et al*, 1993. Purification and characterization of interferon-like antiviral protein derived from flatfish (*Paralichthys olivaceus*) lymphocytes immortalized by oncogenes. Cytotechnology, 11(2): 121—131

IN VITRO INDUCTION OF INTERFERON-GAMMA FROM *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* LEUCOCYTES BY PHYTOAGGLUTININ

SHAO Jian-Zhong, XIANG Li-Xin

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou, 310012)

Abstract An antiviral factor was detected in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) leucocyte culture supernatant following induction with phytoagglutinin during October, 1997 to March, 1999 in Hangzhou City, Zhejiang Province, China. Biochemical study showed that the factor could not be dialyzed and sedimented at $10 \times 10^4 g$, exhibited stability to treatment of DNase, RNase and lipid solvent, but was sensitive to trypsin, glucosidase and $NaIO_4$. According to the above characteristics it should be a glycoprotein. Its inhibitory effect on virus replication was dependent on the process of cellular RNA and protein syntheses. It could inhibit different kinds of virus in the cells of grass carp, but failed to do so in human, mammalian, avian and shellfish cells. The result indicated the antiviral factor was specific to fish cells and viruses. Its biological characteristics were consistent with those of high vertebrate interferon. Furthermore, it was induced from the leucocytes by phytoagglutinin, sensitive to heat ($56^\circ C$), $pH=2$ and 0.1% SDS. Its antigenic characteristic was different from that of interferon- α/β induced by the virus, and its production could be promoted significantly by the phorbol ester and interleukin-2. These characteristics of the antiviral factor accorded with those of interferon-gamma. The results revealed that the antiviral factor was an interferon-gamma and there were different types of interferon in fish.

Key words Phytoagglutinin, Leucocytes of grass carp, Interferon-gamma, Induction in vitro