

## 專題報導

### 第一型干擾素對抗神經壞死病毒的功效

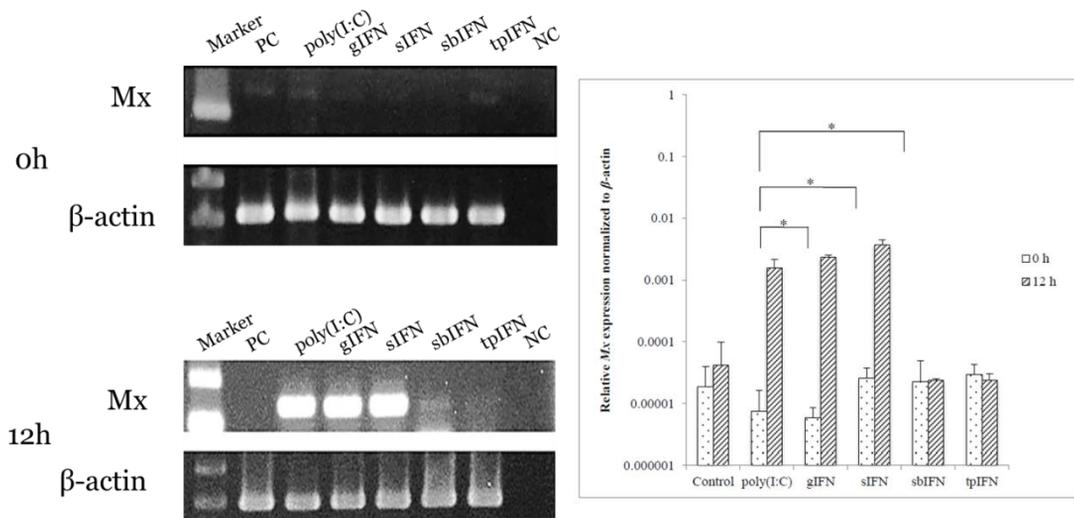


養殖系呂明偉老師

海大水產養殖系呂明偉副教授研究團隊，利用七帶石斑魚 (*Epinephelus septemfasciatus*)、大西洋鮭魚 (*Salmo salar*)、歐洲海鱸 (*Dicentrarchus labrax*) 及尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) 四種不同魚種的第一型干擾素，發展出抗神經壞死病毒 (Nervous necrosis virus, NNV) 疫苗，實驗結果顯示七帶石斑魚第一型干擾素在石斑魚抗神經壞死病毒效果較其他三種魚種為佳。此論文已發表於 Kuo, H.P., Chung, C.L., Hung, Y.F., Lai, Y.S., Chiou, P.P., Lu, M.W., and Kong, Z.L. (2016). Comparison of the responses of different recombinant fish type I interferons against betanodavirus infection in grouper. *Fish Shellfish Immunol* 49, 143-153.

神經壞死病毒 (Nervous necrosis virus, NNV) 可感染超過 30 種海水魚，病毒主要攻擊魚隻的中樞神經系統，受到感染的魚會出現不正常的迴旋泳姿，體色變黑且產生厭食等病徵。

此種病毒在石斑魚苗養殖階段常造成高達 90-100% 的死亡率，重創台灣的石斑魚產業。干擾素 (Interferon, IFN) 是一種抗病毒激素，當細胞受到病毒攻擊，會刺激數種蛋白質表現以保護宿主。根據干擾素的結構、生物活性以及受器的差異，可將哺乳類的干擾素分成三種：。第二型干擾素主要是由自然殺手細胞與 T 淋巴細胞因為細胞免疫反應所分泌，而第一型與第三型干擾素則涉及先天免疫反應。當干擾素與其受器結合後，會調控抗病毒蛋白的合成，例如：Mx 蛋白、PKR 以及 OAS。干擾素在魚體有高度的專一性，僅對特殊病毒產生反應。



圖一、四種魚類干擾素與石斑魚腎臟細胞共同培養 0 及 12 小時後，以 RT-PCR 與 Real-Time PCR 分析細胞中 Mx 與 β-actin 的 mRNA 表現量。

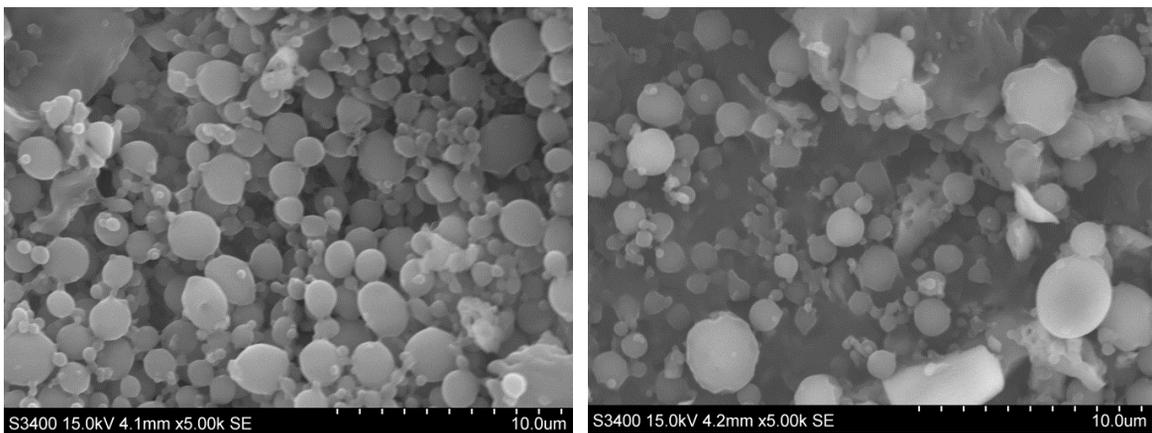
# 海洋中心電子報

CENTER OF EXCELLENCE FOR THE OCEANS

本研究為了評估及比較不同魚種的干擾素其抗病毒效力，成功地利用大腸桿菌純化七帶石斑魚(*Epinephelus septemfasciatus*)、大西洋鮭魚(*Salmo salar*)、歐洲海鱸(*Dicentrarchus labrax*)及尼羅吳郭魚(*Oreochromis niloticus*) 四種不同魚種的第一型干擾素蛋白(依序標示為gIFN、sIFN、sbIFN 及 tIFN)，蛋白質分子量分別為18.37 kDa、17.93 kDa、19.58 kDa及18.48 kDa。比對四種干擾素的基因序列發現，sIFN，sbIFN 與tpIFN 的親緣關係較接近，gIFN與前三者親緣關係較遠。使用石斑魚腎臟細胞株(grouper kidney cells, GK cells)測試重組蛋白的毒性，在10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下，干擾素均具有細胞毒性；在濃度1 $\mu\text{g}/\text{m}$ 的處理組，gIFN及sIFN之細胞毒性明顯比tpIFN及sbIFN強。以干擾素處理後，顯示gIFN與sIFN確實正向調控使細胞的Myxovirus resistance (Mx)基因表現量上升。進一步用四種干擾素預處理(pre-treatment)細胞，24小時後進行病毒攻擊，另一模式為干擾素與病毒同時處理(co-treatment)進行試驗。兩種模式中，sIFN 能最有效地抑制NNV複製並使細胞具有抗病毒效力，次為gIFN，而tpIFN及sbIFN效果則不佳。

以三公分的石斑魚苗進行動物實驗結果顯示，於注射組別中，抗 NNV效果以gIFN效果最佳，魚苗的相對活存率(relative percentage survival, RPS)較佳，次為sIFN，再者為濃度較低的gIFN，而注射sbIFN 之相對活存率極低；餵食組方面，餵食石斑魚苗0.10 $\mu\text{g}$ 未經奈米包埋之gIFN具有最高的相對活存率(RPS=60.59)，而使用超音波震盪法(ultrasonication)所製得PLGA-gIFN NPs (nanoparticles)，其RPS卻更低(RPS46.78)，此與奈米粒活性物質之包覆率和釋放率有關；不論奈米包埋與否，RPS會隨著干擾素濃度增加而上升。

整體而言，本研究比較了不同魚種的第一型干擾素對抗NNV的保護作用，並發現親緣性最遠的sIFN和石斑魚細胞間的交互作用，此對魚類干擾素後續運用提供了相當的研究價值。在活體實驗中，將gIFN、sIFN兩種干擾素，分別以腹腔注射和口服餵食的方式處理馬拉巴石斑幼魚，進一步確認gIFN、sIFN的抗病毒能力。這個研究為首次比較不同魚種的IFN對於神經壞死病毒的保護效力，未來可提供魚類干擾素應用於神經壞死病毒治療的可行性資訊。



圖二、掃描式電子顯微鏡視野下，放大5000倍的超音波震盪法所得奈米粒(左)包埋胎牛血清蛋白(右)包埋。

## 中心業務報告

海洋中心訂於2016年8月底舉行儀器教育訓練，將針對核心儀器室之顯微鏡及流式細胞儀進行教育訓練，歡迎有興趣者可報名參加，屆時詳情可至中心網站查詢：

<http://www.ceo.ntou.edu.tw/bin/home.php>。