



晋晨阳, 马露露, 郭梓轩, 赵青青, 代曼曼. 稳定表达 *IRF2* 基因 DF-1 细胞株的建立及其对 H9N2 AIV 复制的影响[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(05): 169-178.  
JIN Chenyang, MA Lulu, GUO Zixuan, ZHAO Qingqing, DAI Manman. Establishment of a DF-1 cell line stably expressing the *IRF2* gene and its effect on H9N2 AIV replication[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(05): 169-178.  
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.05.14

## 稳定表达 *IRF2* 基因 DF-1 细胞株的建立及其对 H9N2 AIV 复制的影响

晋晨阳<sup>1</sup> 马露露<sup>1</sup> 郭梓轩<sup>1</sup> 赵青青<sup>1</sup> 代曼曼<sup>1,2\*</sup>

(1. 华南农业大学 兽医学院/人兽共患病防控制剂国家地方联合工程实验室/广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广州 510642;  
2. 中英禽病国际研究中心, 广州 510642)

**摘要** 为构建一种稳定表达干扰素调节因子 2 (Interferon regulatory factor 2, *IRF2*) 的 DF-1 细胞株, 本研究首先针对 *IRF2* 成功构建重组慢病毒, 再用重组慢病毒感染 DF-1 细胞, 通过嘌呤霉素及有限稀释法筛选获得 *IRF2* 过表达多克隆细胞株。对构建的细胞株进行活力检测、Real-time qPCR 以及 Western blot 等方法验证 *IRF2* 的体外表达效率, 病毒增殖试验验证该细胞株对 H9N2 AIV 复制的影响, 最后, 通过双荧光素报告系统验证 *IRF2* 对干扰素刺激基因的调控作用。结果表明: 1) 细胞活性检测显示, 稳定表达 *IRF2* 对细胞活性无显著影响 ( $P > 0.05$ )。2) Real-time qPCR 以及 Western blot 证明 *IRF2* 的 mRNA 水平和蛋白水平在筛选的细胞株中表达相较于对照组细胞极显著增高 ( $P < 0.001$ )。3) Real-time qPCR ( $P < 0.001$ )、Western blot ( $P < 0.01$ )、TCID<sub>50</sub> ( $P < 0.01$ ) 的体外试验证明, 过表达 DF-1-*IRF2* 细胞株具有促进 H9N2 AIV 增殖的作用。4) 双荧光素报告系统结果表明, *IRF2* 能够极显著抑制 ISRE ( $P < 0.01$ ) 和 NF- $\kappa$ B ( $P < 0.01$ ) 活性, 显著抑制 IRF7 ( $P < 0.05$ ) 的活性。综上, 本研究成功构建能够稳定表达 *IRF2* 基因的 DF-1-*IRF2* 细胞株, 其能够增强 H9N2 AIV 的复制水平, 为进一步研究 *IRF2* 在 H9N2 AIV 复制机制中的作用提供基础。

**关键词** H9N2 AIV; 慢病毒载体; DF-1 细胞; *IRF2*

中图分类号 S852.659.5

文章编号 1007-4333(2025)05-0169-10

文献标志码 A

## Establishment of a DF-1 cell line stably expressing the *IRF2* gene and its effect on H9N2 AIV replication

JIN Chenyang<sup>1</sup>, MA Lulu<sup>1</sup>, GUO Zixuan<sup>1</sup>, ZHAO Qingqing<sup>1</sup>, DAI Manman<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine/National and Regional Joint Engineering Laboratory for Medicament of Zoonosis Prevention and Control/ Guangdong Provincial Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control, Southern China Agriculture University, Guangzhou 510642, China;

2. UK-China Centre of Excellence for Research on Avian Diseases, Guangzhou 510642, China)

**Abstract** To establish a stable DF-1 cell line expressing Interferon regulatory factor 2 (*IRF2*), this study first successfully constructed a recombinant lentivirus targeting *IRF2*. Subsequently, the recombinant lentivirus was used to infect DF-1 cells, and *IRF2* overexpressing polyclonal cell lines were obtained through puromycin selection and limited dilution method. The constructed cell line was subjected to viability assays,

收稿日期: 2024-09-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32473060); 广东省自然科学基金项目(2022A1515012480, 2024A1515013151); 高等学校学科创新引智计划项目(D20008); 特定高校学科建设专项(2023B10564003)

第一作者: 晋晨阳(ORCID:0009-0006-1044-5793), 硕士研究生, E-mail: jinchenyang187363@163.com

通讯作者: 代曼曼(ORCID:0000-0002-6533-5456), 教授, 主要从事家禽抗病毒免疫应答研究, E-mail: daimanman1229@scau.edu.cn

Real-time quantitative PCR (qPCR), and Western blot to verify the *in vitro* expression efficiency of *IRF2*. Viral proliferation assays were conducted to assess the impact of this cell line on H9N2 AIV replication, and finally, a dual luciferase reporter system was used to verify the regulatory effects of *IRF2* on interferon-stimulated genes. The results indicated the following: 1) Cell viability assays showed that stable expression of *IRF2* had no significant effect on cell activity ( $P > 0.05$ ). 2) Real-time qPCR and Western blot demonstrated that the mRNA and protein levels of *IRF2* were significantly higher in the selected cell line compared to control cells ( $P < 0.001$ ). 3) Real-time qPCR ( $P < 0.001$ ), Western blot ( $P < 0.01$ ), and  $TCID_{50}$  ( $P < 0.01$ ) *in vitro* assays confirmed that the overexpression of *IRF2* in the DF-1-*IRF2* cell line promoted the proliferation of H9N2 AIV. 4) The dual luciferase reporter system results indicated that *IRF2* could significantly inhibit the activities of ISRE ( $P < 0.01$ ), NF- $\kappa$ B ( $P < 0.01$ ), and IRF7 ( $P < 0.05$ ). In summary, this study successfully constructed a DF-1-*IRF2* cell line capable of stably expressing the *IRF2* gene, which is able to enhance the replication level of H9N2 AIV, and provide a basis for the subsequent study of the role of *IRF2* in the replication mechanism of H9N2 AIV.

**Keywords** H9N2 AIV; lentivirus vector; DF-1 cell; *IRF2*

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)属于单股负链分节段的RNA病毒。根据AIV表面血凝素(Haemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)抗原特征,可以分为16个HA亚型和9个NA亚型<sup>[1-2]</sup>。根据AIV的致病性,可以将禽流感分为高致病性禽流感(Highly pathogenic avian influenza, HPAI)和低致病性禽流感(Low pathogenicity avian influenza, LPAI), H9N2亚型AIV虽为LPAIV,但在世界范围内传播甚广<sup>[3]</sup>。自1994年首次报道以来, H9N2 AIV一直在我国流行。近几年来, H9N2 AIV在我国已成为主要禽流感病毒亚型之一<sup>[4]</sup>。家禽感染H9N2 LPAIV后,增加了它们继发感染其他病原体的易感性,可造成较高的死亡率以及巨大的经济损失<sup>[5]</sup>。此外, H9N2 AIV可跨物种传播感染哺乳动物,甚至可以感染人类,而且不需要中间宿主<sup>[6-8]</sup>。H9N2亚型AIV还可为感染人的H5N1、H5N6和H7N9等毒株提供内部基因<sup>[9-11]</sup>,所以, H9N2 AIV的防控不但对养禽业至关重要,而且具有重要的公共卫生意义。

干扰素调节因子(Interferon regulatory factors, *IRFs*)是一类调控干扰素表达的转录因子家族<sup>[12]</sup>。*IRF*家族是多个模式识别受体的下游转录因子,参与多种生物学过程,在免疫细胞发育、分化和凋亡中发挥着不同的作用<sup>[13-15]</sup>, *IRFs*能够正向和负向调节病毒和细胞的基因表达,以应对多种细胞外信号<sup>[16]</sup>。迄今,已经在哺乳动物中发现了9个*IRF*成员,它们分别起着不同的作用<sup>[17-18]</sup>。研究发现,人源*IRF2*驱动干扰素介导的CD8 T细胞衰竭以限制抗肿瘤免疫<sup>[19]</sup>;另有研究表明,鱼源*IRF2*在瞬时过表

达时能够显著促进鲤春病毒血症病毒(Spring viremia of carp virus, SVCV)的复制,并抑制抗病毒相关基因的表达<sup>[20-21]</sup>。目前在家禽中尚未有关于*IRF2*的功能研究,对于鸡*IRF2*在H9N2 AIV复制中的调控作用也不清楚。

慢病毒表达系统能够将目的基因整合到宿主基因组中,从而实现在宿主细胞中的稳定表达,是一种准确高效的基因转移载体<sup>[22-23]</sup>。本研究通过慢病毒构建稳定表达*IRF2*基因的DF-1细胞株,并初步揭示了*IRF2*促进H9N2 AIV复制的作用,为后续研究*IRF2*调控H9N2 AIV复制的机制提供了理论支撑和基础工具,同时也对基于DF-1细胞培养H9N2 AIV提供试验数据支持和借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 细胞、病毒与载体

H9N2 AIV、HEK-293T细胞、DF-1细胞、LMH细胞、荧光素酶报告质粒pGL3-ISRE、pGL3-NF- $\kappa$ B、pGL3-IRF7、内参质粒pRL-TK、真核表达质粒pCAGGS-HA-IRF2均由华南农业大学人兽共患病防控制剂国家地方联合工程实验室保存。慢病毒载体pLV-CMV-MCS-EF1-Puro、包装质粒psPAX2和pMD2.G为上海交通大学程玉强教授惠赠。DH5 $\alpha$ 感受态细胞为南京诺维赞公司产品。

#### 1.1.2 主要试剂

质粒提取试剂盒、同源重组酶、荧光定量检测试剂盒、ECL发光试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自南京诺唯赞公司;DMEM细胞培养基购自美

国 Gibco 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;嘌呤霉素购自 Biosharp 公司;Nulen Plus Trans<sup>TM</sup> 转染试剂购自上海诺莱生物公司;慢病毒浓缩试剂盒、RIPA 裂解液反转录试剂盒、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自上海碧云天生物公司;AIV NP 单抗购自 Invitrogen

公司;鼠源 IRF2 蛋白单抗购自 Proteintech 公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 引物的设计与合成

根据 NCBI 公布的基因数据设计引物。引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息  
Table1 Primer sequences information

| 引物名称<br>Primer name | 序列<br>Sequence                  | 片段长度/bp<br>Fragment length | 用途<br>Application |
|---------------------|---------------------------------|----------------------------|-------------------|
| pLV-IRF2            | F : ccgggatttggatcATGCCTGTCGAAA | 1 047                      | PCR               |
|                     | R : catgtggcggatcTTAGCAGCTCTTG  |                            | PCR               |
| H9N2 AIV NP         | F : AATGGTTAGCGGCATTGGGA        | 86                         | qPCR              |
|                     | R : TTTCTTCGGGTCCTTTCCCG        |                            | qPCR              |
| IRF2                | F : CTTGATGGCAGCAGTGAGGA        | 148                        | qPCR              |
|                     | R : TGCCAATGAAGTCGTCCCTC        |                            | qPCR              |
| GADPH               | F : AATGCATCGTGCACCACCAACT      | 83                         | qPCR              |
|                     | R : TCCCATTTCAGCTCAGGGATGACTT   |                            | qPCR              |
| IFN- $\alpha$       | F : GACAGCCAACGCCAAAGC          | 128                        | qPCR              |
|                     | R : GTCGCTGCTGTCCAAGCATT        |                            | qPCR              |
| IFN- $\beta$        | F : GCCCACACACTCCAAAACACTG      | 115                        | qPCR              |
|                     | R : TTGATGCTGAGGTGAGCGTTG       |                            | qPCR              |
| OASL                | F : AGATGTTGAAGCCGAAGTACCC      | 144                        | qPCR              |
|                     | R : CTGAAGTCCTCCCTGCCTGT        |                            | qPCR              |
| MDA5                | F : GGACGACCACGATCTCTGTGT       | 176                        | qPCR              |
|                     | R : CACCTGTCTGGTLCTGCATGTTATC   |                            | qPCR              |
| MX1                 | F : AAGCCTGAGCATGAGCAGAA        | 155                        | qPCR              |
|                     | R : TCTCAGGCTGTCAACAAGATCAA     |                            | qPCR              |
| IRF7                | F : GCAGACAGACTGACACTCCC        | 140                        | qPCR              |
|                     | R : CCCAGGGAGTGGATGCAAAT        |                            | qPCR              |

注:小写序列为同源臂。  
Note: The lowercase sequence represents the homologous arm.

#### 1.2.2 *IRF2* 重组载体构建

使用 *Bam*H I 限制性内切酶,在 37℃ 条件下对载体 pLV-CMV-MCS-EF1a-PuroR 进行单酶切,通过电泳回收获得线性化载体。按照生产商说明书,将载体与目的基因按照相应比例混合后,于 37℃ 共同孵育 30 min,于-20℃ 保存。将重组产物转化至感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,随后涂布于氨苄抗性的固体 LB 平板并培养过夜,挑取单克隆菌落振荡培养,进行菌液测序,测序正确后扩繁并提取质粒

pLV-CMV-IRF2-EF1a-PuroR,保存于-20℃ 冰箱用于后续试验。

#### 1.2.3 重组慢病毒载体的构建与包装

将生长对数期的 HEK293T 细胞均匀接种在 5 cm 细胞培养皿,待细胞长至单层后,将重组质粒 pLV-CMV-IRF2-EF1a-PuroR、psPAX2 和 pMD2. G 共转染至 HEK293T 细胞,同时设立转入空载体 pLV-CMV-MCS-EF1a-PuroR 为对照组细胞,孵育 4~6 h 后,更换新鲜培养基,转染后 72 h 收集慢病毒上

清液,使用慢病毒浓缩试剂盒将其浓缩后放于 $-80^{\circ}\text{C}$ 以备后用。

#### 1.2.4 慢病毒转导和细胞筛选

将生长良好的DF-1细胞接种至24孔细胞板,待生长密度达到90%时,将慢病毒与聚凝胺混合接种至DF-1细胞。培养24 h后换新鲜培养基继续培养至96 h。细胞稳定生长后更换含有 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素生长液进行筛选,至对照组细胞全部死亡终止筛选。初步筛选得到阳性细胞后,用有限稀释法将筛选后的细胞悬液传代至96孔细胞培养板中,保证每孔只有0~1个细胞,用抗性筛选生长液再培养10~14 d,观察挑取生长状态良好的单细胞克隆接种至24孔板,待细胞孔长满后进行鉴定。

#### 1.2.5 *IRF2*基因稳定表达对DF-1细胞活性的影响

将对照组DF-1细胞与筛选细胞以每孔 $10^4$ 个细胞铺于96孔板中央,在细胞长至合适密度后,于0、6、12和24 h每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$  CCK-8溶液,轻微振荡混匀,然后于培养箱中 $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1~4 h,用酶标仪于450 nm处检测细胞孔OD值,记录数据。

#### 1.2.6 *IRF2*过表达细胞株的鉴定

1.2.6.1 qPCR检测*IRF2*的mRNA水平 收集对照组细胞和筛选得到的细胞,使用RNA提取试剂盒提取细胞RNA并反转录,将得到的cDNA作为模板进行qPCR检测,qPCR检测引物*GADPH*和*IRF2*的序列如表1所示。反应程序为: $95^{\circ}\text{C}$  30 s; $95^{\circ}\text{C}$  15 s、 $60^{\circ}\text{C}$  30 s、 $95^{\circ}\text{C}$  15 s重复40个循环;最后 $60^{\circ}\text{C}$  1 min、 $95^{\circ}\text{C}$  15 s完成检测。

1.2.6.2 Western blot检测*IRF2*蛋白水平 将筛选细胞均匀传代至6孔板中,设置DF-1细胞作为对照组细胞,待细胞长满80%后,用添加了PMSF的RIPA裂解液冰上裂解细胞,加入 $5\times$ 上样缓冲液 $100^{\circ}\text{C}$ 处理后进行SDS-PAGE。将凝胶上的蛋白转印至PVDF膜上, $5\%$ 脱脂奶粉封闭1 h,然后以*IRF2*鼠源单抗作一抗( $1:1\ 000$ 稀释使用),HRP标记的羊抗鼠IgG为二抗( $1:5\ 000$ 稀释使用)于 $37^{\circ}\text{C}$ 各孵育1 h,最后使用ECL化学发光试剂显影成像。

1.2.6.3 IFA检测*IRF2*在细胞的表达情况 将筛选的细胞DF-1-*IRF2*均匀传代至24孔板,细胞长满后用预冷的多聚甲醛固定细胞30 min,用 $0.25\%$  Triton破膜30 min,用 $5\%$  BSA封闭细胞1 h,每次操作前用PBS洗涤细胞3次,用*IRF2*单抗作为一

抗,FITC标记的羊抗鼠IgG作为二抗于 $37^{\circ}\text{C}$ 孵育细胞1 h,均匀覆盖DAPI显色液,避光染色5 min后,在Nikon荧光倒置显微镜下观察结果。

#### 1.2.7 *IRF2*稳定表达对H9N2 AIV增殖的影响

1.2.7.1 *IRF2*稳定表达对H9N2亚型AIV NP mRNA表达的影响 将筛选得到的细胞株和转入空载体的对照组细胞分别接种至12孔板中,细胞密度达到80%后,接种 $\text{MOI}=0.1$ 的H9N2亚型AIV,收集24和48 h的细胞,提取RNA并反转录为cDNA,通过qPCR检测H9N2 AIV的NP基因表达情况。H9N2 AIV的qPCR检测方法反应条件同1.2.6.1,使用引物信息见表1。

1.2.7.2 *IRF2*稳定表达对H9N2亚型AIV NP蛋白表达的影响 Western blot试验方法同1.2.6.2,以AIV NP蛋白为一抗,HRP标记的羊抗鼠IgG为二抗,用ECL化学发光显色并观察结果。

1.2.7.3 *IRF2*稳定表达对H9N2亚型AIV滴度的影响 将DF-1-*IRF2*细胞株和对照组细胞株接种至T25培养瓶中,将DMEM稀释的H9N2 AIV分别接入细胞,在 $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育1 h,更换 $2\%$  FBS的DMEM培养液,逐日观察细胞病变(CPE)。待CPE达到90%时,于 $-80^{\circ}\text{C}$ 反复冻融3次,收集细胞液上清,将LMH细胞铺96孔细胞培养板,待细胞长至单层后,取病毒液稀释 $10^{-1}\sim 10^{-10}$  10个浓度梯度,分别接种到LMH细胞中, $37^{\circ}\text{C}$ 培养3~5 d后观察并纪录CPE,通过Reed-Muench法计算病毒 $\text{TCID}_{50}$ ,并比较两者的病毒滴度。

#### 1.2.8 *IRF2*过表达对宿主IFN反应的影响

1.2.8.1 *IRF2*过表达对干扰素相关基因的影响 将DF-1细胞均匀铺于12孔板中,置于 $37^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养至细胞汇合度达到80%后,将pCAGGS-HA-*IRF2*重组质粒和pCAGGS-HA空载体分别转染到DF-1细胞中,pCAGGS-HA空载体作为对照,然后置于 $37^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养24 h后,以 $\text{MOI}=0.1$ 的剂量接种H9N2 AIV病毒液,在接毒后24 h提取细胞RNA样品,反转录成cDNA后利用qPCR方法检测*IFN- $\alpha$* 、*IFN- $\beta$* 、*OASL*、*MDA5*、*MX1*和*IRF7*基因相对表达量。

1.2.8.2 过表达*IRF2*对ISRE/NF- $\kappa\text{B}$ /*IRF7*启动子活性的影响 将DF-1细胞接种于12孔细胞培养板内, $37^{\circ}\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$ 培养箱中培养,待细胞汇合度长至 $70\%\sim 80\%$ 时,按照Nulen Plus Trans<sup>TM</sup>转染试剂

说明方法,将 1  $\mu\text{g}$  pCAGGS-*IRF2* 重组质粒,0.1  $\mu\text{g}$  相应的荧光素酶报告质粒以及 0.02  $\mu\text{g}$  内参质粒 pRL-TK 共转染细胞,并设置空载体对照。转染 24 h 后,加入 MOI=0.1 的 H9N2 AIV 病毒液孵育 24 h。参照诺唯赞公司双荧光素酶检测试剂盒说明书进行双荧光检测,结果取报告启动子-萤火虫荧光素酶信号值与内参启动子-海肾荧光素酶活性的比值。

### 1.2.9 数据分析

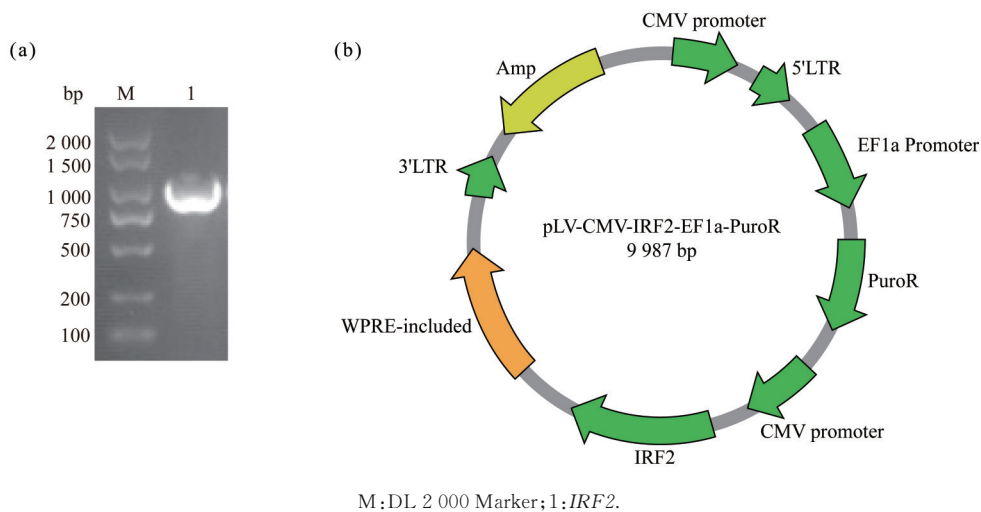
各试验平行重复 3 次,使用 GraphPad Prism 8.0.2

软件对各试验数据进行 *t*-test 统计学分析,双荧光素酶检测试验运用 One-way ANOVA 统计学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组慢病毒载体的构建

从 DF-1 细胞中扩增得到 *IRF2* 目的基因片段,其大小为 1 047 bp,如图 1(a);测序结果表明克隆序列与已发表的鸡 *IRF2* 序列完全一致。将没有信号肽编码序列的扩增片段插入 pLV-CMV-MCS-EF1a-PuroR 载体中,质粒结构如图 1(b)。



(a) *IRF2* 基因电泳图; (b) pLV-CMV-*IRF2*-EF1a-PuroR 质粒图谱。  
(a) Electrophoresis of *IRF2* gene; (b) pLV-CMV-*IRF2*-EF1a-PuroR plasmid map.

图 1 鸡 *IRF2* 基因 PCR 扩增和过表达质粒图谱

Fig. 1 Chicken *IRF2* gene amplification and the map of expression vector

### 2.2 DF-1-*IRF2* 细胞株的鉴定

#### 2.2.1 qPCR 鉴定 *IRF2* 基因在 mRNA 水平上的稳定表达

收集对照组细胞和过表达 *IRF2* 细胞株,提取细胞总 RNA 反转录成 cDNA,利用 qPCR 方法检测 *IRF2* 基因在 DF-1 对照、DF-1-*IRF2* 细胞株中表达量的变化。如图 2(a)所示,在 DF-1-*IRF2* 细胞中, *IRF2* 基因的 mRNA 相对表达量极显著高于对照组细胞 ( $P < 0.001$ ),表明慢病毒基因组整合至宿主细胞基因组上,可显著提高 *IRF2* 表达。

#### 2.2.2 *IRF2* 基因稳定表达鉴定

收集对照组细胞和 DF-1-*IRF2* 细胞的蛋白样品,进行 Western blot 检测。如图 2(b)的结果显示,与对照组细胞相比,DF-1-*IRF2* 细胞中 *IRF2* 蛋白表达显著增加。

以 *IRF2* 单抗作为一抗,在倒置荧光显微镜下可以观察到 DF-1-*IRF2* 细胞的荧光信号与对照组细胞相比显著增多。图 2(c)结果表明,在筛选得到的 DF-1-*IRF2* 细胞中, *IRF2* 的表达量显著增多。

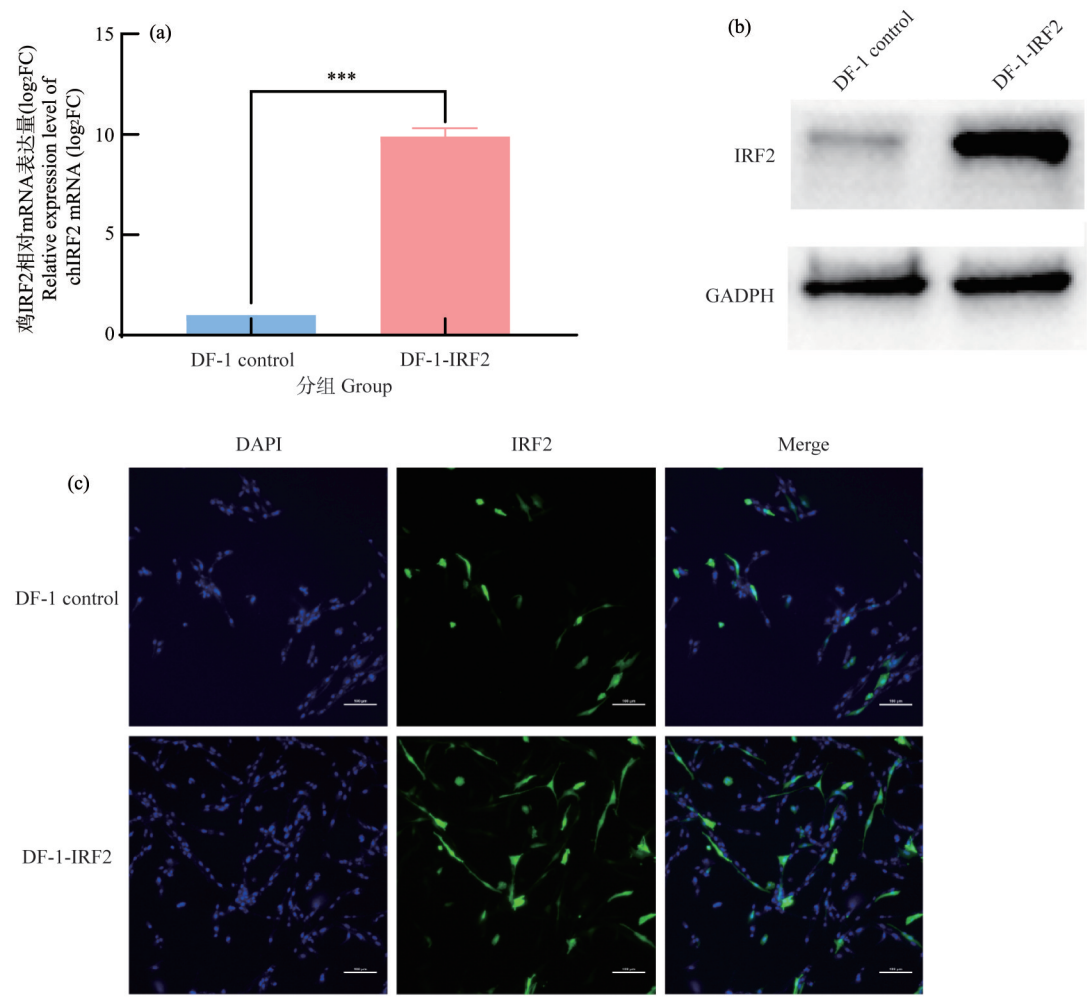
### 2.3 *IRF2* 稳定表达细胞株活性检测

使用 CCK8 试剂盒检测 450 nm 波长下的吸光度值。结果显示,DF-1-*IRF2* 细胞与对照组细胞 DF-1 相比,450 nm 波长下的吸光度值无显著差异,表明 *IRF2* 基因的稳定表达对 DF-1 细胞的增殖无显著影响(图 3)。

### 2.4 *IRF2* 稳定表达对 H9N2 AIV 增殖的影响

#### 2.4.1 *IRF2* 稳定表达对 H9N2 NP 基因 mRNA 表达的影响

用 H9N2 AIV 分别感染 DF-1 细胞和 DF-1-*IRF2* 多克隆细胞株。设置 24 和 48 h 2 组,由 qPCR



\*\*\* $P < 0.001$ .

(a)qPCR 检测 *IRF2* 的 mRNA 表达量;(b)WB 检测 *IRF2* 的蛋白表达量;(c)IFA 鉴定 *IRF2* 在细胞中的表达 *IRF2*。

(a) Identification of the mRNA expression of *IRF2* qPCR;(b) Identification of the expression of *IRF2* protein by western blot;(c) Identification of *IRF2* protein expression in cells by IFA.

图2 DF-1-IRF2细胞株的鉴定

Fig. 2 Identification of DF-1-IRF2 polyclone cell line

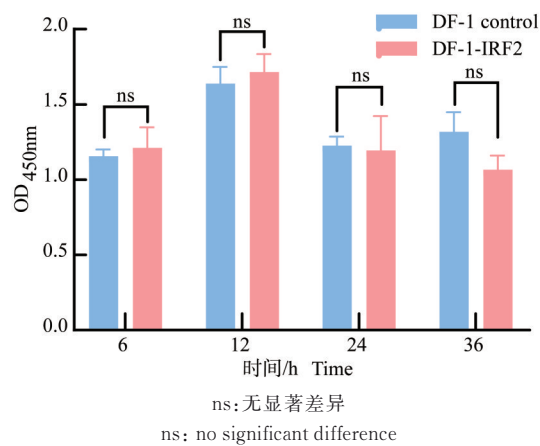


图3 CCK-8法检测DF-1-IRF2细胞株的细胞活性

Fig. 3 CCK-8 assay for detecting cell viability of the DF-1-IRF2 cell line

结果可知(图4(a)),与对照组相比,H9N2 AIV 感染 DF-1-IRF2 细胞株病毒 NP mRNA 表达量显著升高( $P < 0.001$ ),表明体外过表达 *IRF2* 可显著促进 H9N2 AIV 复制。

2.4.2 *IRF2* 稳定表达对 H9N2 AIV NP 蛋白表达的影响

通过 western blot 检测 H9N2 AIV NP 蛋白的表达量显著高于对照组(图4(b)),表明体外过表达 *IRF2* 能够显著促进 H9N2 AIV NP 蛋白的表达。

2.4.3 IFA 检测 H9N2 AIV NP 蛋白的表达

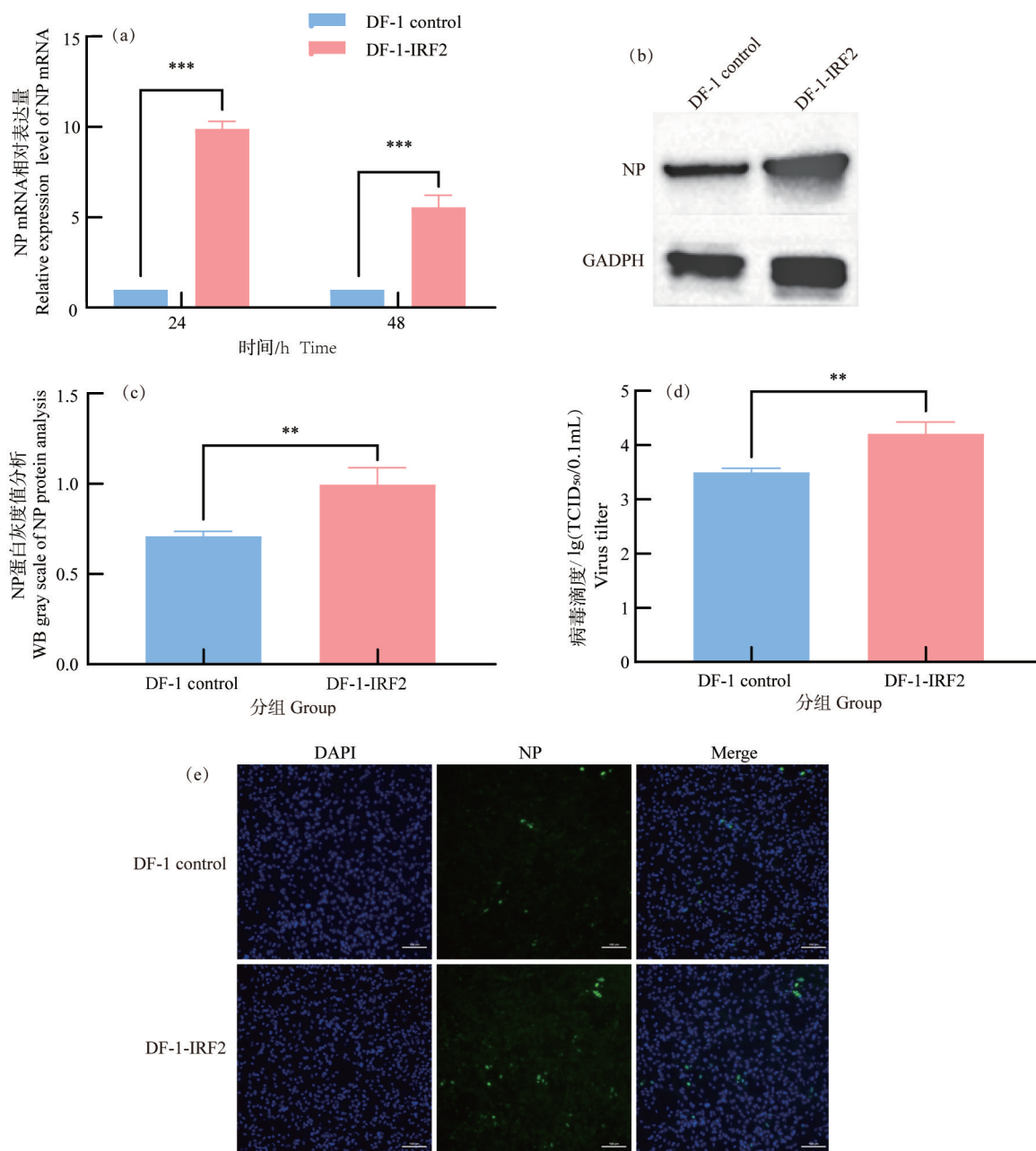
通过 IFA 检测 H9N2 AIV 感染 DF-1 细胞和 DF-1-IRF2 细胞 24 h 后 NP 蛋白,在荧光显微镜下观察发现 DF-1-IRF2 细胞株与对照组相比荧光增

加(图 4(e)),表明体外过表达 *IRF2* 可促进 H9N2 AIV 复制。

#### 2.4.4 *IRF2* 稳定表达对 H9N2 AIV 滴度的影响

用 H9N2 AIV 分别感染 DF-1 细胞和 DF-1-

*IRF2* 细胞株,从 TCID<sub>50</sub> 结果可知(图 4(d)),DF-1-*IRF2* 细胞株 H9N2 病毒滴度显著高于对照组 ( $P<0.01$ ),这表明体外过表达 *IRF2* 可显著提高 H9N2 AIV 的滴度。



\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ 。下同。

\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ 。The same below.

(a)Real-Time PCR 检测 H9N2 AIV NP mRNA 的表达量;(b)Western blot 检测 H9N2 AIV NP 蛋白的表达;(c)NP 蛋白灰度值分析;(d) TCID<sub>50</sub> 检测 H9N2 AIV 滴度;(e) IFA 鉴定 H9N2 AIV NP 蛋白的表达。

(a)Identification of the mRNA expression of H9N2 NP protein by real-time PCR;(b)Identification of the expression of H9N2 NP protein by western blot;(c)WB gray scale of NP protein analyze;(d)Identification of H9N2 titer by TCID<sub>50</sub>;(e)Identification of the expression of H9N2 NP protein by IFA.

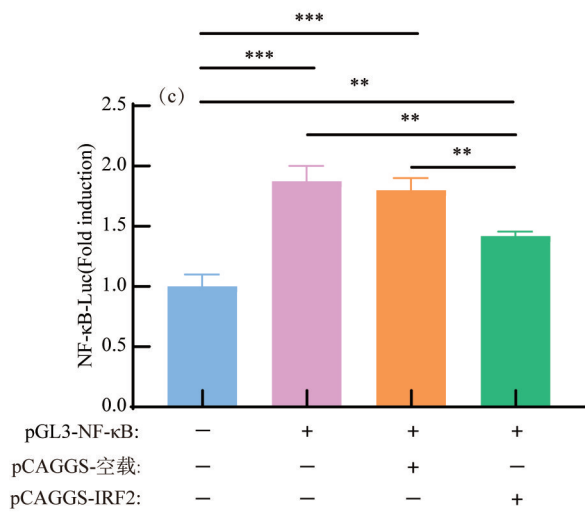
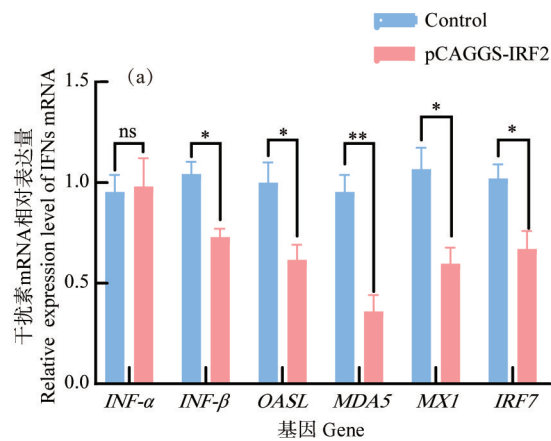
图 4 *IRF2* 稳定表达对 H9N2 AIV 增殖的影响

Fig. 4 Effect of *IRF2* overexpression on H9N2 AIV replication

2.5 IRF2过表达对宿主IFN反应的影响

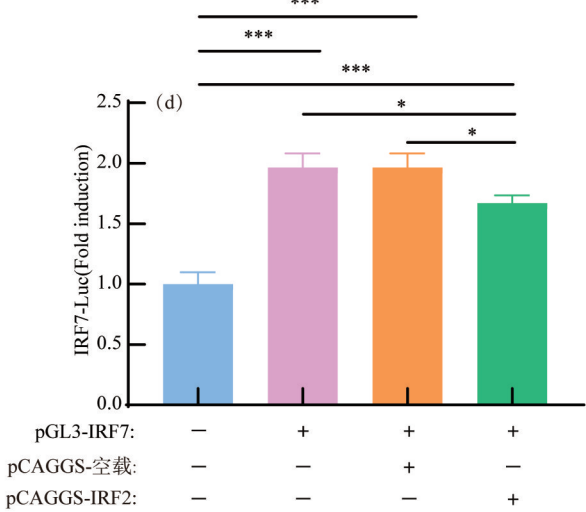
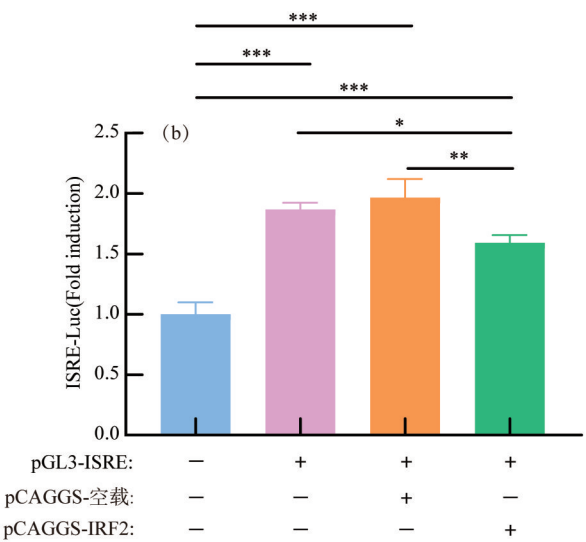
2.5.1 IRF2过表达对干扰素相关基因的影响

将IRF2转染DF-1细胞24 h后,感染H9N2 AIV 24 h后提取细胞总RNA反转录成cDNA,利用qPCR方法检测IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、OASL、MDA5、MX1和IRF7基因相对表达量。结果表明,过表达IRF2显著抑制IFN- $\beta$ 、OASL、MDA5、MX1和IRF7基因表达(图5(a))。



2.5.2 过表达IRF2对ISRE/NF- $\kappa$ B/IRF7启动子活性的影响

将荧光素酶报告质粒pGL3-ISRE、pGL3-NF- $\kappa$ B、pGL3-IRF7、内参质粒pRL-TK分别与真核表达质粒pCAGGS-HA-IRF2和对照空载质粒共转染DF-1细胞。转染24 h后感染H9N2 AIV, 24 h后收取细胞样品。结果表明,过表达IRF2可显著抑制ISRE(图5(b))、NF- $\kappa$ B(图5(c))和IRF7(图5(d))的启动子活性。



(a)qPCR检测干扰素相关基因相对表达量;(b)IRF2抑制ISRE启动子活化;(c)IRF2抑制NF- $\kappa$ B启动子活化;(d)IRF2抑制IRF7启动子活化。  
(a) qPCR to detect the relative expression of interferon-related genes; (b) IRF2 inhibits ISRE promoter activation; (c) IRF2 inhibits NF- $\kappa$ B promoter activation; (d) IRF2 inhibits IRF7 promoter activation.

图5 IRF2过表达对宿主IFN反应的影响

Fig. 5 Effect of IRF2 overexpression on host IFN responses

3 讨论

H9N2 AIV感染鸡群会引起轻度呼吸道疾病,还会使鸡蛋产量急剧下降或继发混合感染而出现

高死亡率,给我国养禽业带来了巨大的经济损失<sup>[24]</sup>,由于H9N2 AIV在家禽中的流行和不断演变,有必要在生产实践中使用疫苗。然而,某些毒株的生长特性不足,因此需要额外的方法提高

H9N2 AIV 疫苗种毒的生产效率。各种细胞株已经被评估用于增殖流感病毒的能力,像 MDCK 和 Vero 这样的细胞株为多种 AIV 株的复制提供了便捷支持<sup>[25]</sup>。然而,大多数细胞通常并不代表天然宿主细胞类型,并且需要添加外源性蛋白酶。在没有外源性蛋白酶的情况下,它们对 H9N2 AIV 易感性较低。为解决生产 H9N2 AIV 疫苗的过程中病毒滴度较低的情况,筛选一株适合 H9N2 AIV 增殖的细胞株将有利于节约疫苗的生产成本<sup>[26]</sup>。

干扰素调节因子(IRFs)蛋白家族,能调节干扰素的转录和干扰素诱导的基因表达,它们是 Toll 样受体和 IFN 信号通路中的重要调节蛋白<sup>[17,27]</sup>。迄今为止,脊椎动物鉴定出 11 个 IRF 家族成员,包括 IRF1-11,其中 IRF10 为鱼类和鸟类中特有,而 IRF11 为硬骨鱼特有<sup>[28]</sup>。研究表明,*IRF2* 位于细胞核中,起到 ISGF3 介导的转录激活的转录衰减器的作用,*IRF2* 的缺失会导致过量的 I 型 IFN 信号传导<sup>[18,29]</sup>。有文献报道鱼类 *IRF2* 具有抑制 IFN 反应的作用。Huang 等<sup>[20]</sup>研究发现,*IRF2* 负调控宿主 IFN 反应并促进 SVCV 复制;姜正正等<sup>[21]</sup>研究发现,瞬时过表达 *OLIRF2* 能够显著促进 SVCV 的复制,并抑制抗病毒相关基因 *MX1*、*IFN* 和 *IRF3* 的表达。另外,*IRF2* 的过表达能够增加西尼罗河病毒的产量<sup>[30]</sup>。*IRF2* 促进病毒的复制可能与其抑制干扰素反应相关。本研究着重探究稳定表达鸡源 *IRF2* 对 H9N2 AIV 病毒蛋白水平及滴度的影响。qPCR 试验验证在 DF-1-*IRF2* 细胞株中,H9N2 AIV NP 蛋白 mRNA 表达显著高于对照组,通过 IFA 和 Western blot 证实 *IRF2* 稳定表达可促进 H9N2 AIV 的 NP 蛋白表达,TCID<sub>50</sub> 试验表明 DF-1-*IRF2* 细胞株中子代病毒的滴度显著高于对照组,双荧光素报告系统表明 *IRF2* 能够显著抑制 ISRE、NF- $\kappa$ B 和 IRF7 的活性。以上结果说明,过表达 *IRF2* 抑制了干扰素反应,从而促进 H9N2 AIV 的复制。本研究构建的 DF-1-*IRF2* 细胞株相比于 DF-1 细胞有助于 H9N2 AIV 的复制,表明该细胞株可作为 H9N2 AIV 疫苗高效生产的潜在选择。

## 参考文献 References

- [1] Shi W F, Gao G F. Emerging H5N8 avian influenza viruses[J]. *Science*, 2021, 372(6544): 784-786
- [2] Yang W H, Liu X F, Wang X Q. The immune system of chicken and its response to H9N2 avian influenza virus[J]. *The Veterinary Quarterly*, 2023, 43(1): 1-14
- [3] Dong J Z, Zhou Y, Pu J, Liu L. Status and challenges for vaccination against avian H9N2 influenza virus in China[J]. *Life*, 2022, 12(9): 1326
- [4] Bi Y H, Li J, Li S Q, Fu G H, Jin T, Zhang C, Yang Y C, Ma Z H, Tian W X, Li J D, Xiao S Q, Li L Q, Yin R F, Zhang Y, Wang L X, Qin Y T, Yao Z Z, Meng F Y, Hu D F, Li D L, Wong G, Liu F, Lv N, Wang L, Fu L F, Yang Y, Peng Y, Ma J M, Sharshov K, Shestopalov A, Gulyaeva M, Gao G F, Chen J J, Shi Y, Liu W J, Chu D, Huang Y, Liu Y X, Liu L, Liu W J, Chen Q J, Shi W F. Dominant subtype switch in avian influenza viruses during 2016-2019 in China[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5909
- [5] Nagy A, Mettenleiter T C, Abdelwhab E M. A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa [J]. *Epidemiology and Infection*, 2017, 145 (16): 3320-3333
- [6] Butt K M, Smith G J D, Chen H L, Zhang L J, Leung Y H, Xu K M, Lim W, Webster R G, Yuen K Y, Peiris J S, Guan Y. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003 [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43 (11): 5760-5767
- [7] Peiris J S, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster R G, Shortridge K F. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: Potential for genetic reassortment [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(20): 9679-9686
- [8] Zhang G T, Xu L Q, Zhang J, Fang Q Y, Zeng J J, Liu Y, Ke C W. A H9N2 human case and surveillance of avian influenza viruses in live poultry markets - Huizhou city, Guangdong Province, China, 2021 [J]. *China CDC Weekly*, 2022, 4 (1): 8-10
- [9] Bi Y H, Chen Q J, Wang Q L, Chen J J, Jin T, Wong G, Quan C S, Liu J, Wu J, Yin R F, Zhao L H, Li M X, Ding Z, Zou R R, Xu W, Li H, Wang H J, Tian K G, Fu G H, Huang Y, Shestopalov A, Li S J, Xu B, Yu H J, Luo T R, Lu L, Xu X, Luo Y, Liu Y X, Shi W F, Liu D, Gao G F. Genesis, evolution and prevalence of H5N6 avian influenza viruses in China [J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 20 (6): 810-821
- [10] Vijaykrishna D, Bahl J, Riley S, Duan L, Zhang J X, Chen H L, Peiris J S, Smith G J D, Guan Y. Evolutionary dynamics and emergence of panzootic H5N1 influenza viruses [J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4 (9): e1000161
- [11] Wang X Y, Liu K T, Guo Y Q, Pei Y R, Chen X, Lu X L, Gao R Y, Chen Y, Gu M, Hu J, Liu X W, Hu S L, Jiao X N, Liu X F, Wang X Q. Emergence of a new designated clade 16 with significant antigenic drift in hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza virus in Eastern China [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2023, 12 (2): 2249558
- [12] Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense [J]. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19: 623-655
- [13] Chen Y J, Li J, Lu N, Shen X Z. Interferon regulatory factors: A key to tumour immunity [J]. *International Immunopharmacology*, 2017, 49: 1-5
- [14] Persyn E, Wahlen S, Kiekens L, Van Looke W, Siwe H, Van Ammel E, De Vos Z, Van Nieuwerburgh F, Matthys P, Taghon T, Vandekerckhove B, Van Vlierberghe P, Leclercq G. IRF2 is required for development and functional maturation of human NK cells [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1038821
- [15] Romeo G, Fiorucci G, Chiantore M V, Percario Z A, Vannucchi S, Affabris E. IRF-1 as a negative regulator of cell proliferation [J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2002, 22(1): 39-47
- [16] Lace M J, Anson J R, Haugen T H, Turek L P. Interferon regulatory factor (IRF)-2 activates the HPV-16 E6-E7 promoter in keratinocytes [J]. *Virology*, 2010, 399(2): 270-279
- [17] Antonczyk A, Krist B, Sajek M, Michalska A, Piaszyk-Borychowska A, Plens-Galaska M, Wesoly J, Bluyssen H A R. Direct inhibition of IRF-dependent transcriptional regulatory mechanisms associated with disease [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1176
- [18] Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. The interferon (IFN) class of

- cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2018, 10(11): a028423
- [19] Lukhele S, Rabbo D A, Guo M, Shen J, Elsaesser H J, Quevedo R, Carew M, Gadalla R, Snell L M, Mahesh L, Ciudad M T, Snow B E, You-Ten A, Haight J, Wakeham A, Ohashi P S, Mak T W, Cui W G, McGaha T L, Brooks D G. The transcription factor IRF2 drives interferon-mediated CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion to restrict anti-tumor immunity [J]. *Immunity*, 2022, 55(12): 2369-2385
- [20] Huang W J, Zhao X, Ji N, Guo J H, Feng J H, Chen K Y, Wu Y X, Wang J Y, Feng H, Zou J. IRF2 cooperates with phosphoprotein of spring viremia of carp virus to suppress antiviral response in zebrafish [J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(22): e0131422
- [21] 姜正正, 罗君志, 申萍, 王志, 庞连慧, 潘启华, 刘红, 陈天圣. 病毒感染过程中青鳉 irf2 基因过表达的双面性 [J]. 水产学报, 2021, 45(9): 1465-1477
- Jiang Z Z, Luo J Z, Shen P, Wang Z, Pang L H, Pan Q H, Liu H, Chen T S. Dual characters of overexpressed Medaka (*Oryzias latipes*) interferon regulatory factor 2 gene during virus infection [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(9): 1465-1477 (in Chinese)
- [22] 房恩岳, 张丽萍, 马雪征, 胡孔新. 慢病毒载体系统及其安全性研究进展 [J]. 病毒学报, 2023, 39(4): 1181-1192
- Fang E Y, Zhang L P, Ma X Z, Hu K X. Research progress on lentiviral vector systems and their safety issue [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2023, 39(4): 1181-1192 (in Chinese)
- [23] 吕静, 刘文波, 刘畅, 任同伟, 陈樱, 欧阳康, 黄伟坚, 韦祖樟. 稳定表达猪 CD163 受体的 MARC-145 细胞系的构建 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42(3): 529-534
- Lv J, Liu W B, Liu C, Ren T W, Chen Y, Ouyang K, Huang W J, Wei Z Z. Construction of MARC-145 cell line stably expressing porcine CD163 receptor [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(3): 529-534 (in Chinese)
- [24] Parvin R, Shehata A A, Heenemann K, Gac M, Rueckner A, Halami M Y, Vahlenkamp T W. Differential replication properties among H9N2 avian influenza viruses of Eurasian origin [J]. *Veterinary Research*, 2015, 46(1): 75
- [25] Genzel Y, Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2009, 8(12): 1681-1692
- [26] Torabi S, Soleimani S, Mahravani H, Ebrahimi M M, Shahsavandi S. Mouse fibroblast L929 cell line as a useful tool for replication and adaptation of infectious bursal disease virus [J]. *Archives of Razi Institute* 2023, 78(3): 863-871
- [27] Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, Miyata T, Taniguchi T. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements [J]. *Cell*, 1988, 54(6): 903-913
- [28] 姜晓娜, 贾智英. 鱼类干扰素调控因子 (IRF) 的抗病毒作用研究现状及进展 [J]. 水产学杂志, 2023, 36(2): 114-121
- Jiang X N, Jia Z Y. Research status and progress of antiviral effect of fish interferon regulatory factor (IRF) [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2023, 36(2): 114-121 (in Chinese)
- [29] Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, Ohteki T. Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion [J]. *Nature Medicine* 2009, 15(6): 696-700
- [30] Li M M H, Bozzacco L, Hoffmann H H, Breton G, Loschko J, Xiao J W, Monette S, Rice C M, MacDonald M R. Interferon regulatory factor 2 protects mice from lethal viral neuroinvasion [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2016, 213(13): 2931-2947

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 晋晨阳, 在读硕士研究生, 主要进行家禽天然免疫研究。



通讯作者简介: 代曼曼, 女, 中共党员, 预防兽医学教授、硕士和博士生导师、执业兽医师、广东省畜牧兽医学会“杰出科技工作者”、第一届青年兽拔尖人才、第六届中国科协青年人才托举工程入选者、“广东”特支计划青年珠江学者、教育部国家重大人才计划青年学者。主要从事家禽抗病毒免疫应答研究, 曾以第一作者及通讯作者身份在 *Lancet Microbe*、*PLOS Pathogens*、*Cellular and molecular life sciences*、*Journal of Immunology*、*Journal of Biological Chemistry*、*Veterinary Research* 等国际知名期刊发表论文 20 余篇, 申请美国专利 3 件, 授权国际或国内发明专利 9 件, 并成功转化授权专利 3 件。主持国家自然科学基金面上项目 (2 项)、国家自然科学基金青年基金项目、国家重点研发项目、国家自然科学基金国际合作项目、博士后基金特别资助和面上项目 15 项。在国际性或全国性学术研讨会上做学术报告 10 次。曾荣获广东省科技进步一等奖 1 项, 广东省农业技术推广奖一等奖 1 项。