

杆状病毒诱导昆虫细胞凋亡的初步研究*

姚伦广 杜昌升 彭建新** 洪华珠

(华中师范大学昆虫学研究所 武汉 430079)

关键词: 杆状病毒, 斜纹夜蛾细胞系, 细胞凋亡, 梯形带

中图分类号: Q939.47 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)03-0380-04

细胞凋亡(apoptosis)最早被定义为一种有秩序、受控制并按某种预定程序发展的生理性的自然死亡过程(kerr et al 1972),其特征是细胞收缩,染色质凝聚成块状,形成凋亡小体^[1]。但其最主要的特征是细胞 DNA 受到一种被激活的内源性核酸酶的降解,凝胶电泳时呈现出特征性的梯形带(Wyllie,1980)。病毒感染是常见导致细胞凋亡的重要因素,杆状病毒同样诱导昆虫细胞凋亡,同时,作为打破宿主防御体系的一种策略,杆状病毒可通过自身编码抗凋亡基因的表达,抑制细胞凋亡以利于自己的增殖^[2]。细胞凋亡和病毒抗凋亡是一复杂的相互作用过程,阐述这种相互作用机制赖于建立杆状病毒及凋亡细胞的病毒/细胞体系。我们的研究发现苜蓿银纹夜蛾核型角体病毒(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV)和芹菜夜蛾核型多角体病毒(*Syngrapha falifera* nuclear polyhedrosis virus, SfaNPV)感染斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*) SL-1 细胞后,均诱导 SL-1 细胞凋亡。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒:AcMNPV 和 SfaNPV 均由美国农业部生防室 McIntoch 惠赠。

1.1.2 细胞:斜纹夜蛾 SL-1 细胞由中山大学国家生物防治重点实验室赠与;斜纹夜蛾 Tn-5B1 细胞由美国康乃尔大学 BTI Granados 博士赠与。

1.1.3 培养基:Grace 培养基辅加 0.3% 水解乳蛋白,0.3% 酵母抽提物及 5% 胎牛血清。

1.1.4 药品:DAPI(4',6'-diamidino-2 phenylindole)购自 Sigma 公司;Lipofectin 购自 Promega 公司。

1.2 细胞培养

SL-1 细胞和 Tn-5B1 细胞均置 CO₂ 培养箱 28℃ 恒温培养,细胞按常规方法传代。

1.3 病毒感染与滴度测定

病毒感染及病毒滴度测定方法参照文献[3],求得 TCID₅₀ 值,根据经验公式 $TCID_{50}/mL \times 0.69 = PFU$ 得出病毒的感染复数(MOI)。本研究接种病毒 MOI 均为 5。

1.4 细胞荧光染色

参考文献[4]略有改动,病毒感染细胞经 3.7% 甲醛固定,乙醇脱水,DAPI(4mg/mL)染色(20℃,30min),荧光显微镜(EV 340nm~380nm, BF435nm~485nm)下观察拍片。

1.5 病毒 DNA 及细胞 DNA 的提取与电泳分析

病毒 DNA 及细胞 DNA 的提取与电泳分析按常规方法进行^[3]。

* 国家留学基金资助项目

** 通讯联系人

作者简介:姚伦广(1974-),男,湖南洞口县人,现武汉大学大学生科院博士,主要从事杆状病毒分子生物学研究。

收稿日期:2001-04-13,修回日期:2001-08-20

1.6 脂质体介导病毒 DNA 转染 SL-1 细胞

脂质体 Lipofectin 购自 Promega 公司,转染方法参照 Promega 说明书进行。

1.7 病毒灭活

将病毒粒子置 8W 紫外灯下照射 4h 或将病毒粒子置 56℃ 水中加热 1h。

2 实验结果

2.1 AcMNPV 和 SfaMNPV 诱导 SL-1 细胞凋亡

AcMNPV 和 SfaMNPV 感染斜纹夜蛾 SL-1 细胞后 8h~12h,光镜观察到细胞表面“出泡”(图 1~3、1~5)随着感染时间的延长,出泡现象加剧,许多细胞破碎成球形亚细胞小体,即凋亡小体。病毒接种后 24h,所有细胞几乎全都破碎成凋亡小体(图 1~4、1~6)。对照细胞生长正常(图 1~1、1~2),而 AcMNPV 和 SfaMNPV 感染受纳型 Tn-5B1 细胞呈典型杆状病毒感染细胞病理效应:细胞核肿胀,核中出现折光率极强的多角体颗粒(图 1~7、1~8)。

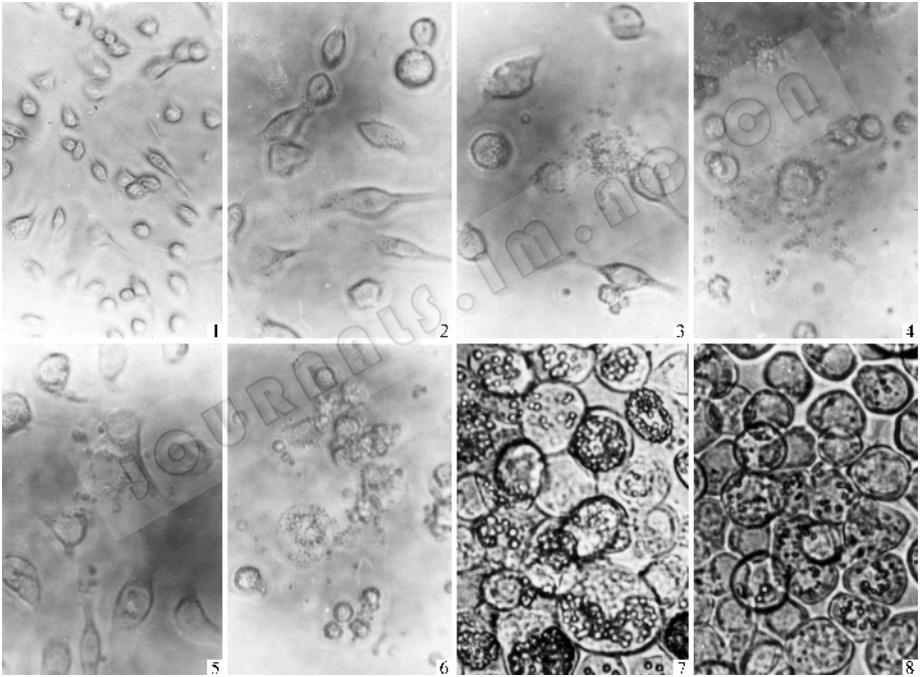


图 1 AcMNPV 和 SfaMNPV 感染 SL-1 细胞光学显微照片(200×)

1~2. 对照 SL-1 3~4 感染 AcMNPV12 及 24h 后的 SL-1 5~6 感染 SfaMNPV8 及 24h 后的 SL-1;

7. 感染 AcMNPV72h 后的 Tn-5B1 8 感染 SfaMNPV48h 后的 Tn-5B1。

DAPI 荧光染色显示受 AcMNPV 和 SfaMNPV 感染的 SL-1 细胞核出现核固缩,染色质凝集,最后核裂解(图版)。受病毒感染细胞核的这些变化是凋亡细胞核的变化特征。

SL-1 细胞受 AcMNPV 和 SfaMNPV 感染后 16 至 48h 提取细胞 DNA,1.5% 琼脂糖凝胶电泳呈梯形谱带,而对照组 DNA 电泳示单一带型(图 2、3)。凋亡细胞由于受内源性核酸酶降解,细胞 DNA 断裂成 180bp~200bp 片段或这些寡核苷酸的多聚体,所以电泳呈梯形分布,这是凋亡细胞典型生化特性。

2.2 灭活 AcMNPV 和 SfaMNPV 不能诱导 SL-1 细胞凋亡

无论是紫外灭活,还是加热灭活方式灭活后的病毒感染 SL-1 细胞,结果显示细胞生长分裂正常,无病变和凋亡现象出现,这说明灭活的病毒不能诱导 SL-1 细胞凋亡,只有病毒进入细胞内进行复制和基

因表达才诱导 SL-1 细胞凋亡。

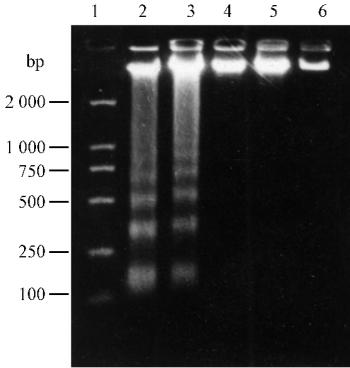


图2 AcMNPV 感染 SL-1 细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳
1. Marker 2~5. 分别为感染后 52、28、22、16h 6. 对照。

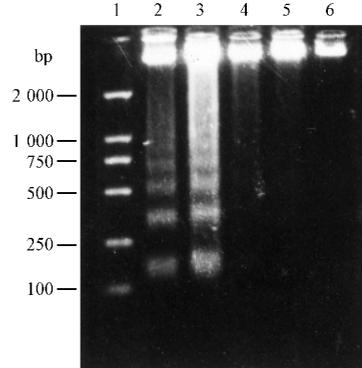


图3 SfaMNPV 感染 SL-1 细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳
1. Marker 2~5. 分别为感染后 48、24、18、12h 6. 对照。

2.3 病毒 DNA 转染细胞

两种病毒 DNA 转染 SL-1 细胞 转染后都诱导细胞凋亡 细胞凋亡特征与病毒粒子诱导细胞凋亡一致。单纯用脂质体处理后的 SL-1 细胞没有发生凋亡。而将两种病毒 DNA 分别转染 Tn-5Bl 细胞 细胞不产生凋亡 并分别于转染后 72h 48h 出现多角体 这说明实验所用病毒 DNA 是有活性的。

2.4 两种病毒在 SL-1 细胞中的增殖情况

AcMNPV 和 SfaMNPV 感染 SL-1 细胞不同时间取样测定胞外病毒粒子 TCID₅₀ 值 结果显示病毒滴度呈下降趋势 这说明两种病毒在 SL-1 细胞中不能复制增殖 子代病毒不能产生 而两种 NPV 在 Tn-5Bl 细胞中的胞外病毒呈上升趋势。AcMNPV 和 SfaMNPV 感染 SL-1 细胞诱导细胞凋亡 细胞凋亡有效率抑制了病毒的复制增殖。

3 讨论

杆状病毒诱导昆虫细胞凋亡最早是 Clem 和 Miller 于 1991 年用一株 AcMNPV 突变株 (VAcAhn) 感染 Sf-21 细胞并引起凋亡发现的 他们描述了杆状病毒诱导 Sf-21 细胞凋亡的基本特征^[5]。本实验结果显示野生型 AcMNPV 和 SfaMNPV 感染的 SL-1 细胞无论是在光镜下的整体形态结构变化 还是荧光染色细胞核细微结构特征 以及细胞 DNA 琼脂凝胶电泳所表现的生物化学特征 都是典型的细胞凋亡特征。AcMNPV 和 SfaMNPV 灭活实验与转染实验表明两种杆状病毒诱导 SL-1 细胞的凋亡不发生在病毒侵入或吸附阶段 可能主要是病毒基因表达阶段 特别是早期基因表达时相。病毒早期基因表达启动了细胞凋亡程序。杆状病毒基因编码的抗细胞凋亡基因的表达能抑制细胞凋亡发生 AcMNPV 和 SfaMNPV 两种 NPV 诱导 SL-1 细胞凋亡 说明病毒抗凋亡基因的表达遇到阻碍或表达产物活性受到宿主细胞因子作用而丧失功能。杆状病毒诱导细胞凋亡和抗细胞凋亡是病毒与宿主细胞间相互作用的复杂生物学现象 本研究建立的诱导细胞凋亡的病毒细胞系统 为探索昆虫细胞凋亡的分子机制 深入研究杆状病毒与宿主间相互关系和作用奠定了基础。相关的进一步工作正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Sulston J E, Horvitz H R. *Dev Biol*, 1997, **82**: 110 ~ 156.
[2] 王业富, 齐义鹏. 中国病毒学, 1998, **13**: 251 ~ 256.
[3] 黎路林. 杆状病毒表达载体系统. 武汉: 华中师范大学出版社, 1996, 150 页. ISBN: 7-307-01820-1. http://journals. im. ac. cn

- [4] Chejanovsky N , Gershburg E. *Virology* ,1995 **203** :519 ~ 525.
 [5] Clem R J ,Fechheimer M ,Miller L K. *Science* ,1991 **254** :1388 ~ 1390.

Preliminary Studies on the Apoptosis of *Spodoptera litura* Cells Induced by TWO Baculoviruses

Yao Lunguang Du Changsheng Peng Jianxin Hong Huazhu
 (*Institute of Entomology ,Central China Normal University ,Wuhan 430079 ,China*)

Abstract : Microscopic examination of *Spodoptera litura*(SL-1) cell infected with AcMNPV or SfaMNPV revealed progressive cell blebbing starting at 8h ~ 12h postinfection and culminating in total cell destruction at 24h postinfection. The fragmentation of the infected cell nuclei was observed by stained with the specific fluorescent dye DAPI. Agarose gel electrophoresis analysis of the DNA extracted from infected cells show typical DNA ladder. All these supported that both viruses infected SL-1 cells undergo apoptosis. Through lipofectin transinfection ,we observed that only the DNA of AcMNPV or SfaMNPV can also induce apoptosis of SL-1 cell. Virus titer analysis revealed that neither viruses can duplicate in SL-1 cells.

Key words : Baculovirus , *Spodoptera litura* cell , Apoptosis , DNA ladder

图版说明

Explanation of plate

AcMNPV 和 SfaMNPV 感染 SL-1 细胞核 DAPI 荧光染色显微照片(400 ×)

1 ~ 4. 感染 SfaMNPV 的 SL-1 细胞 ; 5 ~ 10. 感染 AcMNPV 的 SL-1 细胞 ; 11 ~ 14 对照 SL-1 细胞

Nuclear staining of AcMNPV and SfaMNPV infected SL-1 cells with DAPI(400 ×)

1 ~ 4. SfaMNPV infected SL-1 cells ; 5 ~ 10. AcMNPV infected SL-1 cells ; 11 ~ 14 Mock-infected SL-1 cells.

(见 321 页前图版)

寻求微生物发酵新技术、新产品合作项目

- ★ 合作方式 : 技术转让、技术入股、共同开发均可。
- ★ 单 位 : 山西省农科院科锋中心
- ★ 联系 人 : 张先生 郭先生
- ★ 联系电话 : 0351 - 7123328
- ★ E-mail : kefeng@public.ty.sx.cn