

斜纹夜蛾核型多角体病毒 DNA 诱导同源昆虫细胞的凋亡*

杜昌升 彭建新** 洪华珠

(华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430079)

摘要 发现野生型斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus, SpltNPV) DNA 转染 SL-1 细胞能诱导细胞凋亡. SpltNPV-DNA 转染其同源细胞系斜纹夜蛾核 SL-1 细胞 6 h 后, 光镜下即可见细胞膜表面突出或形成小泡, 细胞碎裂成凋亡小体, 18 h 后, 细胞 100% 碎裂成凋亡小体. DAPI 荧光染色显示感染细胞核渐呈半月形, 直至碎裂被凋亡小体包裹. 被转染的 SL-1 细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳呈典型梯形谱带. 野生型 SpltNPV 病毒粒子感染的 SL-1 细胞既无多角体的出现, 也无凋亡现象的发生.

关键词 斜纹夜蛾核型多角体病毒, 斜纹夜蛾细胞系, 细胞凋亡

学科分类号 Q78

细胞凋亡 (apoptosis) 是多细胞有机体的一种有秩序、受控制并按某种预定程序发展的生理性自然死亡过程. 细胞凋亡不仅精确地调控组织的形成与分化, 对维持机体的内稳态尤为重要, 同时细胞凋亡也是生物体的防御性机制, 当机体受到诸如病毒感染等刺激时, 通过细胞凋亡抑制病毒繁殖. 离体细胞受到生物、物理、化学刺激而诱导的细胞凋亡模式系统比较常见^[1]. 杆状病毒能够诱导昆虫细胞的凋亡, 并已经建立了多种病毒/细胞凋亡系统^[2~5]. 这些系统对于探讨昆虫细胞凋亡规律具有重要价值, 并已取得一些重要成果^[6~9]. 迄今, 杆状病毒/细胞凋亡系统都是异源病毒/细胞凋亡系统. 最近, 我们在研究杆状病毒诱导斜纹夜蛾 SL-1 细胞凋亡过程中发现斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus, SpltNPV) DNA 转染其同源细胞 SL-1 时, 也诱导细胞凋亡, 其细胞形态、生化指标均呈典型的细胞凋亡特征.

1 材料和方法

1.1 材料

SpltNPV 由本所分离毒株并保藏. 斜纹夜蛾 SL-1 细胞由中山大学国家生物防治重点实验室馈赠, 此细胞系贴壁依赖性生长细胞; 细胞培养所用培养基均为 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; 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 细胞置 CO₂ 培养箱 28℃ 恒温培养, 细胞按常规方法传代.

1.3 多角体扩增及病毒感染液的制备

用多角体喂饲感染三龄斜纹夜蛾幼虫, 取感染 5 d 后幼虫血淋巴 (经镜检有多角体出现) 置于含苯基硫脲的 Grace 培养基中, 500 g 离心 15 min, 上清液过滤除菌后待用. 收集病毒感染死亡的虫尸研磨, 四层纱布过滤, 滤液用 PBS 缓冲液稀释后差速离心提纯多角体. 首先用 30 g 离心 10 min, 取上清, 1 000 g 离心 20 min, 弃上清, 将沉淀用 PBS 缓冲液吹起, 再重复二轮, 得到较为纯净的多角体. 30%~60% 蔗糖梯度 50 000 g 离心 30 min, 收集多角体, 50 000 g 离心 30 min, 洗去蔗糖 2 次, 用双蒸水悬浮, 4℃ 冷藏备用.

1.4 病毒感染

取处于对数生长期细胞, 吸弃培养液, 每瓶细胞 (25 cm²) 接种 1 ml 病毒液, 室温吸附 1 h, 弃病毒接种液, 用无血清培养基洗涤 2 次后添加 3 ml 新鲜培养基, 置 28℃ 恒温培养, 倒置显微镜观察.

1.5 细胞荧光染色

参考文献 [5] 略有改动, 首先将盖玻片置于 Φ36 mm 小培养皿中高压灭菌, 接种细胞于小培养皿中, 细胞生长至对数期即可进行转染处理, 转染

* 留学归国人员基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 027-87658590, E-mail: ttdcs@yahoo.com.cn

收稿日期: 2001-12-21, 接受日期: 2002-01-28

方法如前所述. 细胞染色时首先移去培养液, PBS 洗涤 1 次, 3.7% 甲醛固定, 乙醇脱水, DAPI (4 g/L) 染色 (20℃ 30 min), 取出盖玻片, 倒扣于载玻片上, 荧光显微镜 (激发波长 340~380 nm, 阻滤波长 435~485 nm) 下观察拍片.

1.6 细胞 DNA 的提取与电泳分析

细胞经 500 g 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀细胞和凋亡小体, 加 PBS 洗涤 1 次, 离心后 TES (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 1% SDS) 重悬, 加蛋白酶 K 至终浓度为 50 mg/L, 37℃ 水浴 2~2.5 h, 直至混合物变清亮. 然后依次用酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提, 取水相加 2.5 倍体积冷无水乙醇, -20℃ 过夜沉淀 DNA, 15 000 g 离心 10 min, 70% 乙醇洗涤沉淀, 自然干燥后, 悬在 TER (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 50 mg/L RNAase A, pH 8.0) 37℃ 保温 2 h. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下检测电泳结果、拍照.

1.7 病毒 DNA 提取

取纯净多角体悬浮液 400 μ l, 15 000 g 离心 1 min, 吸弃上清, 将多角体用 200 μ l TE 悬浮, 再加入 200 μ l 碱解液 (0.1 mol/L Na_2CO_3 , 0.17 mol/L NaCl, 0.01 mol/L EDTA pH 10.8),

37℃ 水浴碱解至溶液清亮, 用 10% HAc 调 pH 至 7~8. 取 567 μ l 碱解产物, 加入 30 μ l 10% SDS, 3 μ l (20 g/L) 蛋白酶 K, 37℃ 作用 3 h, 用酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 抽提 3 次, 用氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提 1 次. 将上清液转到新的 Eppendorf 管中, 加 2.5 倍体积的冰乙醇沉淀 DNA 置 -20℃ 2 h 以上, 15 000 g 离心 10 min, 弃上层乙醇, 将沉淀用 70% 乙醇漂洗 1 次, 烘干后加无菌水置 37℃ 水浴 30 min, 4℃ 冰箱贮存备用.

1.8 脂质体介导病毒 DNA 转染 SL-1 细胞

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

1.9 彗星实验

参照文献 [10] 所述方法进行.

2 实验结果

SL-1 细胞经 SpltNPV DNA 转染后 6 h, 光镜观察到细胞表面“出泡” (图 1a), 随着时间的延长, 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 (图 1b). 18 h 后, 所有细胞几乎全都破碎成凋亡小体 (图 1c). 转染 SpltNPV DNA 诱导 SL-1 细胞凋亡进程如图 1 所示. 对照细胞生长正常 (图 1e 和图 1f).

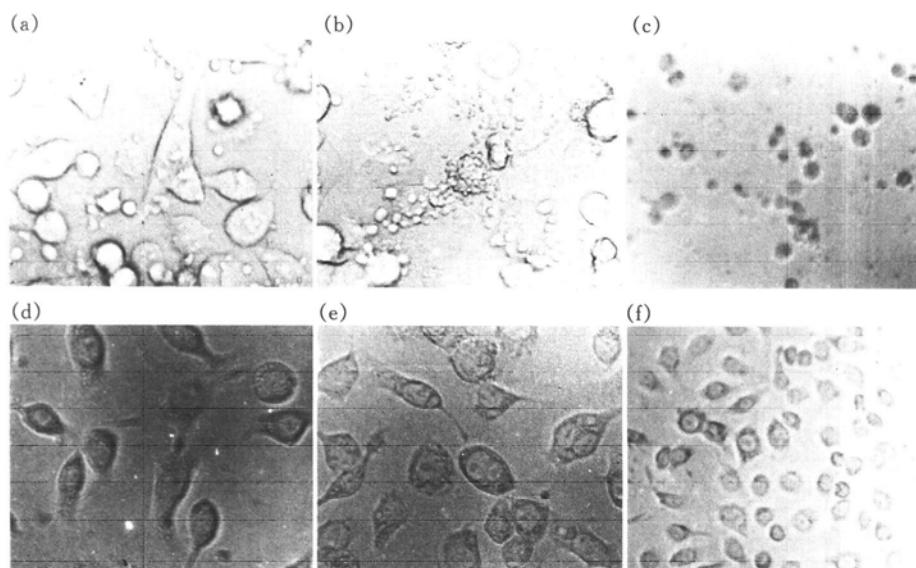


Fig. 1 Microscopic observation of the cells

(a) ~ (c) SL-1 transfected with SpltNPV DNA for 6 h, 12 h, 18 h; (d) SL-1 treated with lipofectin; (e) and (f) control of SL-1.

转染 SpltNPV DNA 后的 SL-1 细胞经提取细胞 DNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳呈梯形谱带, 而对照组 DNA 电泳显示单一带型 (图 2). 凋亡细胞由

于受内源性核酸酶降解, 细胞 DNA 断裂成 180~200 bp 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.

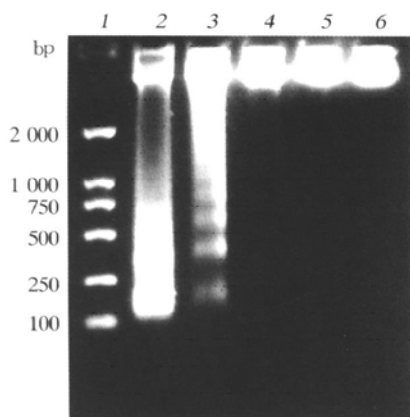


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of the cell DNA

1: DNA marker DL2000 (from Takara BIOTECH); 2: SL-1 18 h after transfected with SpltNPV DNA; 3: SL-1 10 h posttransfected with SpltNPV DNA; 4: SL-1 treated with lipofectin; 5: Tr5B1 transfected with SpltNPV DNA; 6: control of SL-1.

DAPI 荧光染色显示转染 SpltNPV DNA 后的 SL-1 细胞核的形态变化, 荧光显微镜下首先观察到核固缩, 形成弯月形, 染色质凝集, 最后核裂解 (图 3a~ 图 3d), 受病毒感染后, SL-1 细胞核的这些变化是凋亡细胞核的变化特征, 对照 SL-1 核呈均一的圆形 (图 3e 和图 3f)。

3 讨 论

杆状病毒诱导昆虫细胞的凋亡最早见于 Clem 等^[2] 的报道, 他们研究发现缺失 p35 基因的 AcNPV 可以诱导 Sf-9 细胞的凋亡。此后, 多种杆状病毒诱导昆虫细胞凋亡系统被相继发现^[3,4], 但这些系统均为异源杆状病毒诱导的昆虫细胞凋亡, 在实验我们发现转染 SpltNPV-DNA 的 SL-1 细胞竟然发生了凋亡, 而用 SpltNPV 病毒粒子直接攻毒的 SL-1 细胞并没有观察到凋亡的发生或多角

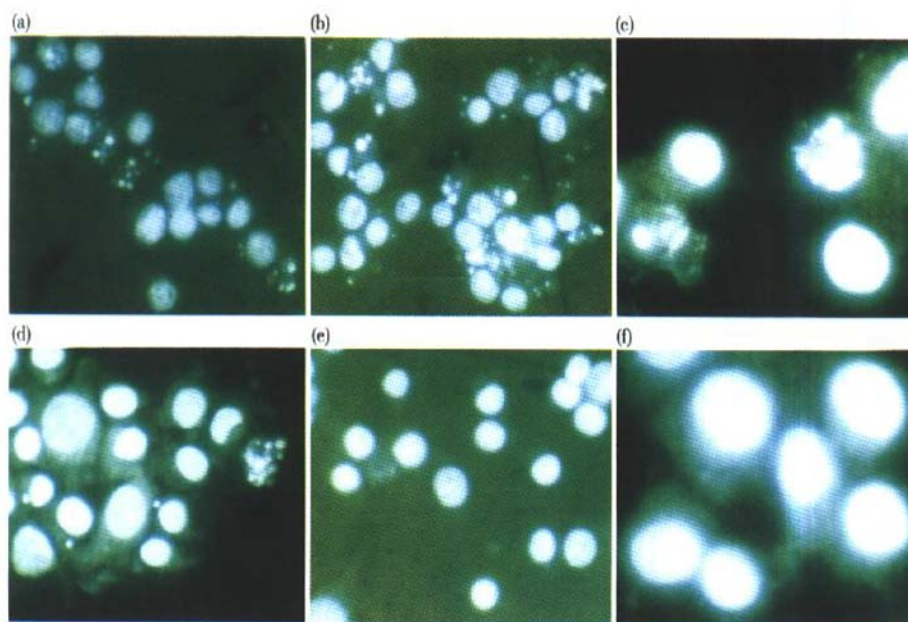


Fig. 3 Nuclear staining of SL-1 cells with DAPI

(a) ~ (d) SL-1 transfected with SpltNPV DNA; (e) SL-1 treated with lipofectin; (f) control of SL-1.

体的出现, 这是一个非常有趣的现象, 因为杆状病毒的病毒粒子主要由三部分构成——最外层的脂质囊膜, 中间由衣壳蛋白聚集而成的衣壳以及最内层的髓核部分, 而髓核则是由病毒 DNA 及 DNA 结合蛋白共同构成。比较病毒粒子和病毒 DNA 的结构成分我们不难得出两点结论: a. SpltNPV 病毒粒子的非 DNA 结构成分不能有效介导其 DNA 向细胞质或核内释放, 因为转染实验已经证实 DNA 的进入可以诱导高比率的细胞凋亡, 而高滴度病毒液

处理的 SL-1 细胞并没有观察到凋亡的发生; b. 在 SL-1 细胞的凋亡过程中, 凋亡的触发因子应该是病毒早期基因的表达, 或 DNA 复制而非病毒粒子的非 DNA 结构成分或病毒粒子对细胞的吸附, 因为单纯病毒 DNA 转染细胞即可诱导细胞的凋亡, 这一点充分说明了病毒 DNA 在诱导 SL-1 细胞发生凋亡过程中的核心作用。此前我们的研究发现, AcNPV、SfaNPV 两种病毒的病毒粒子攻毒 SL-1 细胞均可诱导 SL-1 细胞的凋亡^[3], 提取 AcNPV、

SfaNPV 的病毒 DNA 转染 SL-1 细胞亦可诱导凋亡, 这为上述第二点提供了依据. AcNPV、SfaNPV、SpltNPV 三种病毒, 不管其病毒粒子是否可以诱导 SL-1 细胞的凋亡, 其 DNA 均可诱导 SL-1 的凋亡, 这似乎暗示 SL-1 对外源 DNA 很敏感, 一旦有外源 DNA 的“入侵”, 便会触发它的凋亡程序, 基于这一点, 我们提取了中国棉铃虫病毒 HaSNPV 以及粉纹夜蛾细胞的 DNA 分别转染 SL-1 细胞, 结果并没有观察到 SL-1 细胞发生凋亡, 这说明在这种病毒-细胞凋亡系统中, 是特异的基因起着重要作用.

迄今为止, 已经发现大量的基因涉及细胞凋亡, 就杆状病毒-昆虫细胞凋亡系统而言, 涉及凋亡的基因有 p35 和 iap 等抗凋亡基因, 而 iε-1 基因可以诱导昆虫细胞的凋亡^[11], 这些基因都是定位于病毒基因组中, SpltNPV 基因组全序列已被测定^[12], 其中便存在 iε-1、iap、p49 三种已知涉及凋亡的基因, 其中 iε-1 具有早期启动子, 而抗凋亡基因 iap 只有晚期启动子, p49 的启动子则未知, 但 p49 基因和 AcNPV 中的 p35 基因 (具有早期和晚期启动子) 及家蚕病毒 BmNPV 中的 p35 基因 (仅有晚期启动子) 是同源物^[13, 14]. 根据 SpltNPV 的 DNA 诱导 SL-1 细胞凋亡的现象, 我们推测: SpltNPV 抗凋亡基因在 SL-1 细胞中受到宿主因子的影响不能表达或表达产物无活性. 细胞凋亡可能是 iε-1 基因表达或 DNA 复制的结果, 但这需要进一步研究证明.

据我们检索有关资料, 这是第一例同源病毒的病毒粒子对离体细胞不产生有效感染, 又不诱导凋亡而病毒 DNA 却诱导了细胞凋亡的报道, 这为深入研究杆状病毒诱导昆虫细胞凋亡机制提供了一个新的实验体系.

参 考 文 献

1 高 丰, 宋今丹. 维甲酸诱导的大肠癌细胞凋亡. 细胞生物学

- 杂志, 2000, **22** (1): 35~ 39
Gao F, Song J D. Chin J Cell Biol, 2000, **22** (1): 35~ 39
- 2 Clem R J, Fechheimer M, Miller L K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. Science, 1991, **254** (5036): 1388~ 1390
 - 3 姚伦广, 杜昌升, 彭建新, 等. 杆状病毒诱导昆虫细胞凋亡的初步研究. 微生物学报, 2002, **42** (3): 380~ 383
Yao L G, Du C S, Peng J X, et al. Acta Microbiologica Sinica, 2002, **42** (3): 380~ 383
 - 4 庞 义, 代小江, 施先宗. 两种昆虫杆状病毒诱导的细胞凋亡. 中山大学学报, 1998, **37** (3): 1~ 5
Pang Y, Dai X J, Shi X Z. Acta Scientiarum Naturalium Universtatis Sunyatseni, 1998, **37** (3): 1~ 5
 - 5 Chejanovsky N, Gershburg E. The Wild-type *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus induces apoptosis of *Spodoptera littoralis* cells. Virology, 1995, **209** (2): 519~ 525
 - 6 Nancy J B, Maria H, Margaret H, et al. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. Science, 1995, **269** (5232): 1885~ 1887
 - 7 Ahmad M, Srinivasula S M, Wang L J, et al. *Spodoptera frugiperda* caspase 1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is the target of the baculovirus antiapoptotic protein P35. J Biol Chem. 1997, **272** (3): 1421~ 1424
 - 8 Bertin J, Mendrysa S M, Lacount D J, et al. Apoptotic suppression by baculovirus P35 induces cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. J Virol, 1996, **70** (9): 6251~ 6259
 - 9 Xue D, Horvitz H R. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell death protease CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. Nature, 1995, **377** (6546): 248~ 251
 - 10 秦椿华, 沈建英, 黄仕和, 等. DNA 断裂检测方法——单细胞凝胶电泳法. 生物化学与生物物理进展, 1995, **22** (6): 517~ 520
Qin C H, Shen J Y, Huang S H, et al. Prog Biochem Biophys, 1995, **22** (6): 517~ 520
 - 11 Prikkhodko E A, Miller L K. Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1. J Virol, 1996, **70** (10): 7116~ 7124
 - 12 Pang Y, Yu J X, Wang L H, et al. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus genome. Virology, 2001, **287** (2): 391~ 404
 - 13 Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, et al. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J Virology, 1994, **202** (2): 568~ 605
 - 14 Gomi S, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. J Gene Virol, 1999, **80** (Pt 5): 1323~ 1337

Apoptosis of *Spodoptera litura* Cells Induced by *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus DNA*

DU Chang-Sheng, PENG Jian-Xin** , HONG Hua-Zhu

(Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract The SpltNPV DNA can induce the apoptosis of SL-1 was discovered. Microscopic examination of *Spodoptera litura* (SL-1) cell transfected with DNA of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus revealed progressive cell blebbing starting at 6 h postinfection and culminating in total cell destruction at 18 h postinfection. The fragmentation of the infected cell nuclei and apoptotic body were observed by stained with the specific fluorescent dye DAPI. Agarose gel electrophoresis analysis of the DNA extracted from infected cells showed typical DNA ladder. All these supported that the transfected SL-1 cells undergo apoptosis. Neither apoptosis nor polyhedra was observed in the SL-1 infected with the virions of SpltNPV.

Key words SpltNPV, *Spodoptera litura* cell, apoptosis

* This work was supported by a grant from The Project-sponsored by SRF for ROCS, SEM.

** Corresponding author. Tel: 86-27-87658590, E-mail: ttdds@yahoo.com.cn

Received: December 21, 2001 Accepted: January 28, 2002