

XIEWEN YEE

HEDUOJIAOTI BINGDU YOUDAO XIBAO DIAOWANG

核多角体病毒诱导细胞凋亡

核多角体病毒诱导细胞凋亡

余倩◎著



中山大學出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

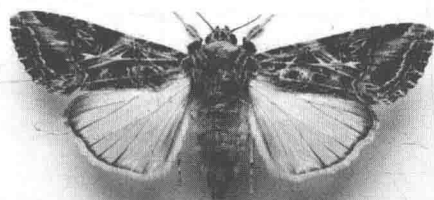
XIEWEN YEE

HEDUOJIAOTI BINGDU YOUDAO XIBAO DIAOWANG

斜纹夜蛾

核多角体病毒诱导细胞凋亡

余 倩◎著



中山大學出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

• 广州 •

版权所有 翻印必究

图书在版编目 (CIP) 数据

斜纹夜蛾核多角体病毒诱导细胞凋亡 / 余倩著. — 广州: 中山大学出版社, 2016. 4

ISBN 978 - 7 - 306 - 05651 - 1

I. ①斜… II. ①余… III. ①斜纹夜蛾—植物害虫—核型多角体病毒—诱导—细胞—凋亡—研究 IV. ①S433. 4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 059982 号

出版人: 徐 劲

策划编辑: 金继伟

责任编辑: 周 玢

封面设计: 曾 斌

责任校对: 杨文泉

责任技编: 何雅涛

出版发行: 中山大学出版社

电 话: 编辑部 020 - 84110771, 84110283, 84111997, 84110779

发行部 020 - 84111998, 84111981, 84111160

地 址: 广州市新港西路 135 号

邮 编: 510275

传 真: 020 - 84036565

网 址: <http://www.zsup.com.cn> E-mail: zdcbs@mail.sysu.edu.cn

印 刷 者: 广东省农垦总局印刷厂

规 格: 787mm × 1092mm 1/16 8 印张 148 千字

版次印次: 2016 年 4 月第 1 版 2016 年 4 月第 1 次印刷

定 价: 55.00 元

如发现本书因印装质量影响阅读, 请与出版社发行部联系调换

摘 要

杆状病毒感染昆虫细胞可诱导细胞凋亡 (apoptosis), 细胞凋亡作为一种宿主范围决定因子限制了杆状病毒的杀虫范围, 影响杆状病毒杀虫剂在生物防治中的应用; 然而, 在长期进化过程中, 杆状病毒获得了抗凋亡基因以阻止细胞凋亡, 使其能够正常复制。在已测序的杆状病毒中绝大部分都包含两个或两个以上的抗凋亡基因, 但是部分体外实验结果表明, 并不是所有抗凋亡基因都具有抗细胞凋亡活性。本研究首次利用 RNAi 技术对斜纹夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpltNPV) 中两个抗凋亡基因 *Splt-iap4* 和 *Splt-p49* 在 SpltNPV 受纳宿主中的抗凋亡功能进行研究, 通过瞬时表达检测探讨两个基因在 SpltNPV 非受纳宿主中的抗凋亡功能, 同时对抗凋亡基因与其宿主的进化关系进行了初步探讨。主要结果如下:

PCR 扩增得到 *Splt-p49* 基因和 *Splt-iap4* 基因, 分别将其连接到含有两个反向 T7 启动子的质粒载体上, 体外转录得到大片段的双链 RNA (double strain RNA, dsRNA), 将 dsRNA 分别或同时转染至被 SpltNPV 病毒感染的 SpLi-221 细胞以沉默 *Splt-iap4* 或 *Splt-p49*, 或者同时沉默 *Splt-iap4* 和 *Splt-p49* 的转录。经光学显微镜观察、DNA ladder 检测、细胞存活率计算及病毒滴度测定, 结果说明 SpltNPV 感染 SpLi-221 细胞时, *Splt-p49* 具有抗凋亡功能, 而 *Splt-IAP* 不具有这种功能。但实验中发现, SpltNPV 感染 SpLi-221 细胞在 48 h 之前细胞会聚集成团, 而 *Splt-iap4* dsRNA 处理细胞未出现此现象, 大部分依然是独立的单个细胞, 推断 *Splt-iap4* 基因在病毒感染期间起到了某种作用使得细胞的聚集受阻, 但 *Splt-iap4* 的功能与病毒产生可感染性的子代病毒无关。

在 vAcAnh 感染 Sf9 系统中, 分别瞬时表达 *Splt-iap4* 和 *Splt-p49* 两个基因, 经光学显微镜和细胞存活率计算方法检测, 结果同样显示 *Splt-p49* 具有抗凋亡功能而 *Splt-IAP* 不具有抗凋亡功能, 且 *Splt-IAP* 无辅助抗凋亡功能或延迟细胞凋亡功能。最后对杆状病毒中的抗凋亡基因与其来源宿主进行进化分析, 结果显示亲缘关系相近的杆状病毒所含的抗凋亡类型也相近, 说明抗凋亡基因与杆状病毒进化有着密切的关系, 也可能发挥着重要作用。

斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 和甜菜夜蛾 (*S. exigua*) 同属夜蛾科 (Noctuidae) 灰翅夜蛾属的昆虫, 亲缘关系很近, 且 SpltNPV 和甜菜夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus, SeMNPV) 基因组相似性

很高,但这两种病毒并不能交叉感染各自宿主。本文从细胞水平和亚显微水平对 SpltNPV 感染非受纳宿主离体细胞 Se301 的过程进行了描述,并对感染失败的原因进行了初步的生化分析。

光学显微镜显示,被 SpltNPV 感染的 Se301 细胞在感染后 24 ~ 120 h 期间细胞出现了明显的病理现象,包括细胞空泡、细胞聚集等,且随着时间的延长病理症状越来越严重,但感染细胞中始终没有病毒多角体。DAPI 染色荧光观察和电镜观察结果,都表明从 24 ~ 120 h 各样品中均显示细胞出现了早期凋亡的特征,但未形成晚期凋亡特征的凋亡小体。TCID₅₀检测表明病毒没有产生有感染性的芽生型子代病毒。Dot blotting 显示,在被感染的 Se301 细胞中可完成病毒 DNA 的复制;RT-PCR 分析也显示,感染细胞 72 h 时, SpltNPV 的早、晚期基因都有转录;Western blotting 没有检测到被感染细胞中有极晚期基因 polyhedrin 的表达。以上结果表明, SpltNPV 的感染可导致 Se301 细胞出现明显的早期凋亡症状,但不能进行到凋亡的最后阶段;虽然病毒可完成 DNA 的复制且早、晚期基因均有转录,但病毒的感染不能发展至极晚期,说明早期细胞凋亡仍然是限制病毒完成复制周期的重要因素。

前 言

杆状病毒是一类节肢动物专一性的病毒，它们带有杆状的核衣壳，基因组是由大小为 80 ~ 180 kbp 的双链环状 DNA 所构成 (Theilmann *et al.*, 2005)。杆状病毒科由核多角体病毒属 (Nucleopolyhedrovirus, NPV) 和颗粒体病毒属 (Granulovirus, GV) 组成 (Theilmann *et al.*, 2005)。杆状病毒的宿主范围窄，最近的研究表明细胞凋亡是限制杆状病毒宿主范围的因素之一 (Feng *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2002; Clarke & Clem, 2003)。细胞凋亡 (apoptosis) 又称为细胞程序性死亡 (program cell death)，其特征为细胞核浓缩和片段化，且常伴随细胞质膜出泡现象 (Kerr *et al.*, 1972b; Wyllie *et al.*, 1980)。细胞凋亡的发生机制在进化上是保守的。大量的凋亡诱导因素如放线菌素 D、紫外线和病毒感染等都能激活一个半胱氨酸蛋白酶家族 (CysteinyI aspartate specific proteinase, caspase) 从而促进细胞凋亡 (Roy *et al.*, 1997; Thornberry & Lazebnik, 1998)。所有的 caspase 都是以无酶活性的酶原形式存在，在凋亡过程中必须被蛋白酶水解激活。通常，caspase 被分成两类：起始 caspase 和效应 caspase。不同的凋亡刺激因素激活起始 caspase，有活性的起始 caspase 随后裂解并激活效应 caspase (Riedl & Shi, 2004)。细胞凋亡作为一个重要的病毒与宿主相互反应过程，可能影响着病毒的发病机理。在多细胞生物体中，凋亡作为一种抗病毒应答机制能限制入侵细胞中的病毒，从而减少子代病毒的产生，并造成流产性感染 (Zhang *et al.*, 2002; Clarke & Clem, 2003; Feng *et al.*, 2007)。尽管许多病毒包括杆状病毒感染细胞后能激发凋亡，但它们随后也能够合成一些抗凋亡蛋白阻止凋亡 (Birnbaum *et al.*, 1994b; Du *et al.*, 1999; Clem *et al.*, 1991; Crook *et al.*, 1993b)。

P35 是第一个被发现的杆状病毒抗凋亡蛋白，能抑制许多不同动物的凋亡，如线虫、昆虫和哺乳动物 (Clem, 2007; Clem *et al.*, 1991)。P35 是一 caspase 底物，能与 caspase 形成稳定的 caspase-P35 复合物从而阻止 caspase 蛋白酶活性 (Bump *et al.*, 1995; Xue & Horvitz, 1995)。在一些杆状病毒中发现的 P49 是一个更大的 P35 同源物，但它的三维结构和作用模式与 P35 相似。有些 P35 不能抑制的起始 caspase 却能被 P49 抑制 (Du *et al.*, 1999; Pei *et al.*, 2002a; Zoog *et al.*, 2002b)。第二大类杆状病毒抗凋亡蛋白为凋亡抑制因子 (inhibitor of apoptosis, IAP)。IAP 的 C 端含有一个 RING 的锌指环结构域，在

其 N 端含有 1~3 个半胱氨酸组氨酸富集基序,称为杆状病毒 IAP 重复基序 (BIR) (Clem *et al.*, 1994; Crook *et al.*, 1993a)。IAP 的 BIR 区域能与 caspase 相互作用, RING 基序具有泛素-蛋白连接酶活性,能将泛素转移至靶蛋白上 (Vaux & Silke, 2005)。我们发现一个有趣的现象,在所有已测序的杆状病毒中,大部分病毒全基因组中都包含两个或更多的抗凋亡基因,但是,在特定病毒和细胞系统中通常只有一个基因具有抗凋亡功能。例如,苜蓿丫纹夜蛾多粒包埋型核多角体病毒 (AcMNPV) 全基因中有 1 个 *p35* 和 2 个 *iap* 基因,但只有 *p35* 具有抗凋亡功能 (Clem & Miller, 1994)。杆状病毒中保留这些无抗凋亡功能的抗凋亡基因的原因还不清楚。对不同病毒基因组中不同抗凋亡基因的研究将使我们更好地理解抗凋亡基因的多样性,以及抗凋亡基因与病毒在进化上的关系。

本研究选取斜纹夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpltNPV) 中的两个抗凋亡基因 *Splt-iap4* 和 *Splt-p49*, 利用 RNAi 技术研究它们在受纳宿主中的抗凋亡功能,并且通过异位表达检测它们在非受纳宿主中的功能,同时对抗凋亡基因与宿主的关系进行了初步探讨。

斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 和甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 同属夜蛾科 (Noctuidae) 灰翅夜蛾属,昆虫亲缘关系很近,且各自的感染病毒斜纹夜蛾核多角体病毒和甜菜夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus, SeMNPV) 基因组相似性也很高 (Herniou *et al.*, 2003)。全基因组测序结果显示,SeMNPV 有 139 个 ORF (Ijkel *et al.*, 1999), SeMNPV 可以在它的受纳细胞 Se301 中正常复制并形成多角体。SpltNPV 有 141 个 ORF (Pang *et al.*, 2001), 它也能在受纳的 SpLi-221 细胞中正常复制并形成多角体。SeMNPV 与 SpltNPV 共有 105 个同源 ORF, 基因组分析表明无论从基因内容及基因排列来看两者都十分相似,但两者的病毒并不能口服感染各自的宿主,其中的原因不明。

为了研究 SpltNPV 感染 Se301 失败的原因,本研究在细胞水平上用 SpltNPV 感染其非受纳细胞 Se301,通过光学显微镜和电子显微镜的形态观察,以及 DAPI 染色等方法,首次发现被 SpltNPV 感染的 Se301 细胞发生了早期凋亡现象但未能进行至晚期凋亡而出现大量凋亡小体。这个发现为证明细胞凋亡是宿主抵抗病毒感染的一个防御机制又提供了一个直接的实验依据,具有普遍的生物学意义。先前已有关于杆状病毒诱导的离体细胞凋亡的报道:如野生型 AcMNPV 感染的 SL2 (Gershburg *et al.*, 1997) 和 CF-203 细胞 (Palli *et al.*, 1996), BmNPV *p35* 突变株感染的 Bm 细胞 (Kamita *et al.*, 1993), SeMNPV 感染 *S. littoralis* 细胞 (Yanase *et al.*, 1998a), HycuNPV 感染的 Ld652Y 细胞

(Ishikawa *et al.*, 2003), 以及 HaSNPV 感染的 Hi5 细胞 (Dai *et al.*, 1999) 它们均发生典型的细胞凋亡。在上述这些研究中细胞都出现了凋亡晚期事件, 即形成凋亡小体。杆状病毒诱导早期的细胞凋亡是否影响病毒复制周期的完成至今还少有报道。本研究从细胞水平和亚显微水平对 SpltNPV 感染非受纳宿主离体细胞 Se301 的过程进行了描述, 并对感染失败的原因进行了初步的生化分析。通过测定病毒 TCID₅₀、RT-PCR、蛋白质印迹法 (western blotting)、斑点印迹法 (dot blotting) 等方法, 进一步揭示 SpltNPV 在非受纳细胞 Se301 中的感染进程情况, 发现正是由于 Se301 的早期凋亡才阻止了 SpltNPV 产生 BV (budded virus) 和 ODV (occlusion derived virus) 子代病毒, 即使病毒的复制和晚期基因的转录都已经完成, 但极晚期蛋白却没有得到表达。

目 录

第 1 章 杆状病毒诱导的细胞凋亡及 RNAi 技术	1
1.1 核多角体病毒	1
1.2 杆状病毒感染与宿主的关系	2
1.3 杆状病毒宿主专一性	3
1.4 细胞凋亡概念及其形态学特征	6
1.5 细胞凋亡与细胞坏死的区别	6
1.6 细胞凋亡的分子机制	7
1.7 杆状病毒感染引起的细胞凋亡研究	10
1.8 抗凋亡基因	11
1.8.1 p35 基因	11
1.8.2 p49 基因	13
1.8.3 iap 基因	14
1.9 RNAi 技术	20
1.9.1 RNAi 的发现与发展	20
1.9.2 RNAi 作用机制	20
1.9.3 RNAi 机制中的主要成员	21
1.9.4 用 RNAi 方法研究特定基因功能的技术路线	22
第 2 章 <i>Splt-iap4</i> 、 <i>Splt-p49</i> 的基因转录和翻译研究	25
2.1 材料与方法	25
2.1.1 材料	25
2.1.2 方法	29
2.2 结果与分析	32
2.2.1 <i>Splt-iap4</i> 转录时相	32
2.2.2 <i>Splt-p49</i> 转录时相	32
2.2.3 <i>Splt-iap4</i> 表达时相	34
2.2.4 <i>Splt-p49</i> 表达时相	34
2.3 讨论	35
2.4 小结	36

第3章 应用 RNAi 技术研究 <i>Splt-iap4</i> 和 <i>Splt-p49</i> 基因功能	37
3.1 材料与方法	37
3.1.1 材料	37
3.1.2 方法	40
3.2 结果	43
3.2.1 <i>Splt-iap4</i> 和 <i>Splt-p49</i> 基因的 PCR 扩增结果	43
3.2.2 对照 <i>cat</i> 基因的 PCR 扩增结果	43
3.2.3 重组质粒 p28i-p49 和 p28i-iap4 的酶切鉴定	44
3.2.4 重组质粒 p28i-cat 的酶切鉴定	45
3.2.5 <i>Splt-P49</i> 和 <i>Splt-IAP4</i> 凋亡功能检测	46
3.2.6 <i>Splt-IAP4</i> 蛋白没有协同抗凋亡作用	47
3.2.7 <i>Splt-IAP4</i> 对细胞有聚集作用	48
3.2.8 <i>Splt-iap4</i> dsRNA 处理对产生感染性病毒粒子的影响	50
3.2.9 RNAi 对 <i>SpltNPV</i> 感染 <i>SpLi-221</i> 细胞的影响	51
3.3 讨论	53
3.4 小结	55
第4章 <i>Splt-iap4</i> 和 <i>Splt-p49</i> 瞬时表达及抗细胞凋亡活性研究	56
4.1 材料与方法	56
4.1.1 材料	56
4.1.2 方法	57
4.2 结果与分析	58
4.2.1 瞬时表达载体的构建	58
4.2.2 瞬时表达蛋白检测	60
4.2.3 <i>Splt-IAP4</i> 和 <i>Splt-P49</i> 抗凋亡活性检测	61
4.3 讨论	63
4.4 小结	63
第5章 杆状病毒与抗凋亡基因的进化关系研究	65
5.1 材料与方法	65
5.1.1 材料	65
5.1.2 方法	65
5.2 结果与分析	66
5.2.1 43 株杆状病毒全基因组特征	66

5.2.2	43 株杆状病毒全基因组中的抗凋亡基因	69
5.2.3	<i>iap</i> 的序列比对和进化分析	73
5.3	讨论	78
5.4	小结	79
第 6 章	SpltNPV 感染诱导 Se301 细胞凋亡的检测与分析	80
6.1	材料与方法	80
6.1.1	材料	80
6.1.2	方法	82
6.2	结果与分析	85
6.2.1	光学显微镜观察 SpltNPV 感染 Se301 细胞的形态学变化	85
6.2.2	电子显微镜观察 SpltNPV 感染 Se301 细胞的形态学变化	85
6.2.3	DAPI 染色	87
6.2.4	台盼蓝 (trypan blue) 染色	88
6.2.5	DNA ladder	88
6.2.6	滴度测定	88
6.2.7	dot blotting	90
6.2.8	RT-PCR	91
6.2.9	SDS-PAGE 和 western blotting 分析	93
6.3	讨论	94
6.4	小结	96
总结		97
参考文献		98
缩略词		114

第1章 杆状病毒诱导的细胞凋亡及 RNAi 技术

杆状病毒是一类节肢动物专一性的病毒，它们带有杆状的核衣壳，基因组是由大小为 80 ~ 180 kbp 的双链环状 DNA 所构成 (Theilmann *et al.*, 2005)。杆状病毒的宿主范围窄，最近的研究表明凋亡是限制杆状病毒宿主范围的因素之一 (Zhang *et al.*, 2002; Clarke & Clem, 2003; Feng *et al.*, 2007)。细胞凋亡又称为细胞程序性死亡，是一种有秩序、受控制并按某种预定程序发展的生理性的自然死亡过程。其形态学特征为细胞核浓缩和片段化，且常伴随细胞质膜出泡现象 (Wyllie *et al.*, 1980; Kerr *et al.*, 1972b)。杆状病毒感染昆虫细胞能引起细胞凋亡，但在长期进化过程中，杆状病毒都获得抗凋亡基因，能阻止昆虫细胞凋亡，使其能在凋亡细胞中继续复制。

RNAi 是存在于多细胞生物体内的一种天然机制，外源双链 RNA 的涉入可以特异性地降解内源基因。利用这种技术我们可以方便快速地进行基因的功能研究。目前，其在杆状病毒的抗凋亡基因研究中已广泛应用。

1.1 核多角体病毒

NPV 属的特征是病毒能形成大 (0.13 ~ 15 μm) 的多面形包涵体，又叫多角体。NPV 有着独特的复制周期，会产生两种不同类型的病毒粒子：一种是在感染晚期产生的包埋于包涵体蛋白晶体中的病毒粒子，病毒核衣壳在细胞核内获得囊膜，称为包埋型病毒 (ODV)；另一种不被包涵体所包埋，病毒核衣壳在核膜或细胞膜处以出芽方式获得囊膜，称为芽生型病毒 (BV) (Volkman *et al.*, 1976)。BV 可感染同一宿主里的不同细胞，主要负责病毒在体内或培养细胞中细胞 - 细胞之间的传播。而 ODV 则是在个体水平上传播病毒 (Keddie *et al.*, 1989; Blissard GW, 2000)。(见图 1-1)

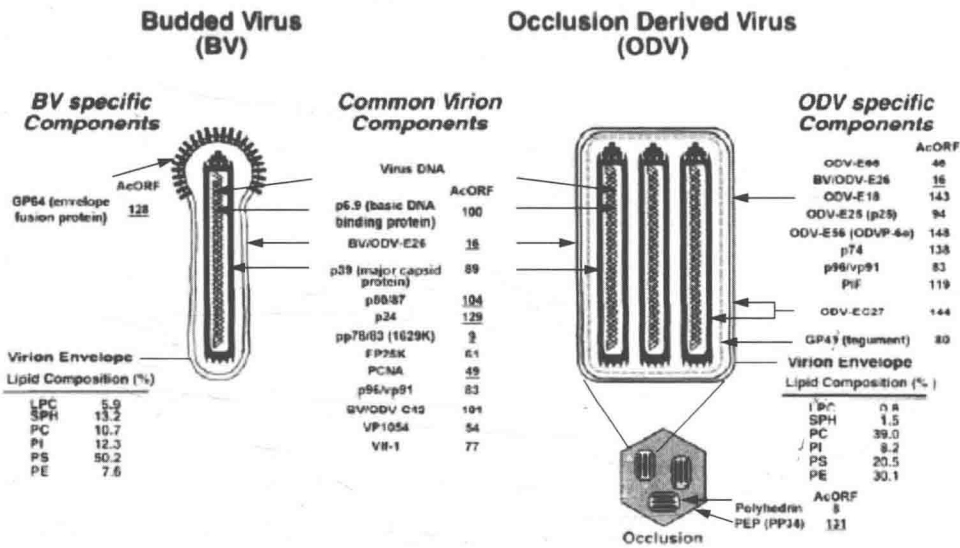


图 1-1 MNPV 两种形态病毒粒子的结构
(引自 Westenberg *et al.*, 2004)

Fig. 1-1 Two baculovirus virion phenotypes illustrated as diagrams with shared and thenotype-specific components
(Westenberg *et al.*, 2004)

1.2 杆状病毒感染与宿主的关系

通过长期的观察实践，人们认识到并不是所有的昆虫细胞对各种杆状病毒都敏感。病毒对昆虫细胞进行感染后出现三种结果：①能成功复制出具有感染性的子代病毒，这类细胞称为该病毒的受纳细胞（permissive cell）；②病毒能够进行部分复制活动，有时也能形成子代病毒，但产量极低，子代病毒产量的下降可由多种原因造成，这类细胞称为该病毒的半受纳细胞（semipermissive cell）；③完全不能复制出子代病毒，该类细胞称为非受纳细胞（nonpermissive cell）。有些非受纳细胞被病毒攻击后可被诱发细胞凋亡（apoptosis），从而导致病毒感染失败（Miller, 1997）。大部分杆状病毒只能感染几种昆虫甚至是专一性的一种，我们称其为宿主范围窄或专性强。

1.3 杆状病毒宿主专一性

杆状病毒科里的病毒都是节肢动物的病原物,通常只针对昆虫特别是鳞翅目、双翅目和膜翅目里的昆虫。在过去的20年里,杆状病毒研究变得十分热门,它们成功作为外源基因的高效表达载体(Miller, 1988; Maeda, 1989; Maeda, 1995; Possee, 1997),并且在农业和森林害虫防治的利用中能特异性地杀死特定的害虫,因此它们成为代替传统化学农药的安全生物杀虫剂(Miller, 1995; Thiem, 1997)。

核多角体病毒被用作一种生物杀虫剂的最使人感兴趣的一个特征是它们具有严格的宿主范围,通常它们都只感染一种或几种相关的昆虫。关于它们宿主范围专一性决定因子的认识我们还知之甚少(Ayres *et al.*, 1994; Lange *et al.*, 2004)。杆状病毒具有相对的宿主特异性,一种病毒只感染同一目中有限的几种近缘种的昆虫甚至单独的一种(Adams & McClintock, 1991; Federici & Hice, 1997)。许多病毒种类被应用于防治害虫,特别是蝴蝶、蛾类等鳞翅目害虫,这些害虫通常能导致农作物、观赏植物和森林等遭受巨大破坏。但是由于杀虫速度相对比较慢,使得杆状病毒杀虫剂难以同传统的化学农药竞争(Moscardi, 1999)。然而,昆虫具有很强的适应能力,会逐步产生对化学农药的抗性,使得采用生物防治的手段来防治害虫显得紧迫而又必需。一些生物技术手段如构建重组病毒等已经用于提高杀虫速度、减少损失(Black *et al.*, 1997; van Beek & Hughes, 1998),但是还没有一种重组病毒能满足市场需求。

杆状病毒宿主专一性研究现状:苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 AcMNPV 是最早发现的杆状病毒,它有着相对广泛的宿主范围,能感染鳞翅目中13个不同科共39个种的幼虫(Entwistle *et al.*, 1978; Bonning & Hammock, 1992),同时也能在其宿主来源的细胞如 Tn368、Sf21 和 Sf9 中复制。组织培养系统及对分子生物学详尽的研究促进了 AcMNPV 基因工程株的分选。家蚕核多角体病毒 BmNPV 是家蚕的一个主要病原物,它能使蚕丝的生产遭受重大的经济损失。对家蚕核多角体病毒(BmNPV)和苜蓿银纹夜蛾多角体病毒进行基因组比较分析,发现两者在基因组织安排、所含的基因及基因的保守序列上都是高度相似的(Hyres *et al.*, 1994; Gomi *et al.*, 1999),它们的基因组有着90%的一致性(Gomi *et al.*, 1999b)。尽管两者在遗传上如此相近,BmNPV 和 AcMNPV 还是有着不同的宿主范围(Miller & Lu, 1997)。在离体培养的细胞里,AcMNPV 能成功感染多种细胞而 BmNPV 直到目前为止也只发现它能在家蚕细胞系和蒙

斑污灯蛾的细胞系中成功扩增, 却不能在 AcMNPV 的受纳宿主草地贪夜蛾来源的 Sf21 和 Sf9 细胞系中复制 (Kondo & Maeda, 1991; Croizier *et al.*, 1994), 且在田蒙夜蛾和粉纹夜蛾细胞系中也不能成功复制 (Maeda *et al.*, 1990; Komodo & Maeda, 1991; Morris & Miller, 1993; Shirata *et al.*, 1999)。对 BmNPV 和 AcMNPV 两者在多种细胞系中所表现的生物学特征进行比较, 能让我们更好地了解决定杆状病毒宿主专一性的机制 (Kondo & Maeda, 1991; Kamita & Maeda, 1993; Croizier *et al.*, 1994; Shirata *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 2001; Katou *et al.*, 2001; Rahman & Gopinthan, 2003)。

在以前的研究中, 我们发现 BmNPV 并不能成功感染 Sf9 细胞, AcMNPV 能在这细胞中成功复制扩增大量子代病毒, 同时也发现是 BmNPV 极早期基因的表达抑制了它在 Sf9 细胞中复制 (Katou *et al.*, 2001)。但是用 BmNPV 转染 Sf9 细胞却能产生大量的子代 BVs (Martin & Croizier, 1997), 这些事实表明 Sf9 细胞对 BmNPV 的限制很可能发生在病毒进入细胞这一步。BmNPV 的 BV 能进入非受纳宿主细胞 Sf9 和 Hi5, 并且能迁移到细胞核附近, 但不能被运输进核内, 而重组型 BmNPV-vBmD64/ac-gp64 病毒 (它的 *bm-gp64* 基因被 *ac-gp64* 代替了) 就能被输送进 Sf9 和 Hi5 细胞的细胞核, 还发现 BmNPV-vBmD64/ac-gp64 能在 Hi5 细胞中产生大量子代病毒而在 Sf9 细胞中不能。这些结果表明 BmNPV 在 Hi5 细胞中的流产性感染是由于病毒不能入核造成的, 而 BmNPV 在 Sf9 细胞流产性感染是 Sf9 细胞对 BmNPV 感染周期多步的限制 (包括不能入核) 造成的。

AcMNPV 感染 Bm 细胞的研究表明: 在家蚕细胞中复制的阻断能通过 AcMNPV 基因组与 NPV 解旋酶基因的一个 133 bp 片断的同源重组方法使 AcMNPV 在家蚕细胞 Bm5 中顺利复制 (Croizier *et al.*, 1994)。DNA 解旋酶是基因复制必需的, 通过对 AcMNPV 中解旋酶基因的小修改就能使 AcMNPV 在 Bm5 细胞中顺利复制 (Kool *et al.*, 1994)。Martin 和 Croizier 研究了 BmNPV 感染非受纳的草地贪夜蛾细胞的情况, 指出细胞与细胞之间传送的下降是导致 BmNPV 在 Sf9 细胞中增殖失败的原因 (Martin & Croizier, 1997)。

草地贪夜蛾核多角体病毒 SfNPV、甜菜夜蛾核多角体病毒 SeMNPV 及海灰翅夜蛾核多角体病毒 SINPV 对于它们的同源宿主都是有致病性的病原物, 但是对异源宿主的反应就大不一样。草地贪夜蛾、海灰翅夜蛾对 SeMNPV 来说都是非受纳宿主, 但是甜菜夜蛾及海灰翅夜蛾的幼虫对 SfNPV 来说则是半受纳宿主, 而三种夜蛾科的幼虫对 SINPV 来说都是受纳的宿主 (Murillo *et al.*, 2003)。以前就有报道说 SeMNPV 只能够有效感染甜菜夜蛾的细胞系 (Yanase *et al.*, 1998b)。这种病毒能在多种非受纳细胞中起始复制, 包括草地贪夜蛾、

海灰翅夜蛾、家蚕及粉纹夜蛾的细胞系，但它们复制的抑制点是多种多样的，并取决于具体的细胞系 (Yanase *et al.*, 1998b)。不仅如此，SeMNPV 还能在与 AcMNPV 共感染的情况下在草地贪夜蛾的细胞中复制 (Yanase *et al.*, 1998a)。SeMNPV 与 AcMNPV 是亲缘关系十分相近的病毒，它们基因组的一致性达到 78% (Tumilasci *et al.*, 2003)，尽管这样，它们还是有着不同的宿主范围。对 SeMNPV 在半受纳宿主草地贪夜蛾和海灰翅夜蛾中行为的研究可作为一个从遗传水平上研究杆状病毒宿主专一性决定因素的模型。

海灰翅夜蛾幼虫对于 AcMNPV 的口服感染是高度抗性的，也有研究证明 AcMNPV 能引起海灰翅夜蛾的 SI2 细胞凋亡 (Chejanovsky & Gershburg, 1995)，这种凋亡现象是由 AcMNPV 的抗凋亡基因 *p35* 在 SI2 细胞中表达贫乏所引起的，这与 SINPV 感染 SI2 细胞相反。进一步研究表明，缺失或低水平表达极早期基因的 AcMNPV 重组病毒在 SI2 细胞中能比野生型产生更多的出芽型病毒 (BV) 并且能提高病毒在血淋巴注射情况下对幼虫的感染力 (Lu *et al.*, 2003)。尽管如此，这些研究并没有提高重组的 AcMNPV 对海灰翅夜蛾幼虫的感染能力，这提示我们可能是其他宿主相关因子如免疫应答等抑制了病毒的感染。

Ld652Y 细胞系来源于舞毒蛾 *Lymantria dispar*，它对舞毒蛾核多角体病毒 (D'Amico *et al.*, 1999) LdMNPV 和黄杉毒蛾 OpMNPV 是受纳的 (Bradford *et al.*, 1990)。1978 年一个非生产性感染的特征在 Ld652Y 细胞系被观察到 (Goodwin *et al.*, 1978)。用草地贪夜蛾核多角体病毒感染 Ld652Y 细胞就会导致在转录水平上所有蛋白质包括病毒的蛋白质合成的关闭 (Du & Thiem, 1997; Mazzacano *et al.*, 1999; Guzo *et al.*, 1991)。通过实验使 AcMNPV 获得 LdMNPV 的宿主范围因子 1 (*hrf-1*) (Thiem *et al.*, 1996) 基因形成重组型 AcMNPV 后其蛋白合成就不再被抑制并能达到像 LdMNPV 感染 Ld652Y 细胞的效果。这种获得 *hrf-1* 重组 AcMNPV 不仅能在 Ld652Y 细胞中复制和产生高剂量的病毒粒子，而且在舞毒蛾幼虫中也能达到同样的效果 (Thiem *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998)，这说明 *hrf-1* 与 AcMNPV 在 Ld652Y 细胞中的生产性感染直接相关。

对于任何一种病毒来说，它进入宿主细胞和组织的能力和它在那里复制并释放有感染活性病毒的能力决定着这种病毒的宿主范围。杆状病毒生活周期主要分为以下几步：进入细胞、早期基因表达、DNA 的复制、晚期基因表达、极晚期基因表达、BV 的组装和释放、核多角体蛋白包含体 (PIB) 的形成。众所周知，包含体病毒 BV 是在病毒表面的糖蛋白 GP64 或其同源蛋白 LD130 参与下通过包内吞作用进入细胞的 (Pearson & Rohrmann, 2002)。病毒进入细胞后杆状病毒的核衣壳就会移动到细胞核，病毒的 DNA 就在此复制，复制时

需要病毒早期基因的表达,而病毒早期基因表达是由宿主细胞的转录机制所调控的 (Fuchs *et al.*, 1983; Huh & Weaver, 1990)。

早期基因表达的产物包括一些病毒 DNA 复制所需要的酶还有一些病毒所需的能调节早期或晚期基因转录的转录因子。DNA 复制是晚期或极晚期基因表达的命令 (Thiem & Miller, 1989)。DNA 复制的起始在不同的杆状病毒中是不一样的。病毒特异性 DNA 复制的起始因不同的细胞系不同而不同,尽管病毒复制所需要的基因在不同的杆状病毒里都是十分保守的,这些基因都是用来帮助形成 DNA 复制最有利的形式 (Lu & Miller, 1995)。晚期和极晚期基因的表达需要一种新的 RNA 聚合酶来激活,这种 RNA 聚合酶对 α - 蝇蕈素不敏感 (Huh & Weaver, 1990)。

近年来发现病毒诱导的昆虫细胞凋亡可能是一种经过长期进化而获得的防御机制构成的昆虫自然免疫体系的一部分 (Clarke & Clem, 2003b)。

1.4 细胞凋亡概念及其形态学特征

细胞凋亡一词源于希腊文,指细胞死亡犹如秋天树叶掉落一样不可抗拒。凋亡现象发现于 1906 年,但直到 1972 年 Kerr 等人在英国癌症杂志发表论文,才首次提出细胞凋亡的概念,即在一定的生理或病理条件下,细胞受内在遗传机制的控制,自动结束生命的过程 (Kerr *et al.*, 1972a)。细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象,作为多细胞生物为维持体内平衡、适应不良环境所采用的一种策略,在生物体的进化、内环境的稳定及多个系统的发育中起着重要的作用。

细胞凋亡有其明显的形态学和生化学上的特征。形态学上的特征包括:核固缩、胞质浓缩、细胞体急剧变小、细胞骨架解体。生化学上的特征包括:染色质片段化,形成长度 180 ~ 200 bp 的整数倍的寡聚核苷酸片段,琼脂糖凝胶电泳时呈现梯状条带 (DNA ladder)。

1.5 细胞凋亡与细胞坏死的区别

细胞死亡根据起源、性质和生物学意义可分为凋亡或称程序性死亡和坏死。前者是一种受基因调节的自主控制过程,在生物个体发育和生存中起着非常重要的作用;而坏死则是细胞处于剧烈损伤条件下发生的细胞死亡。在体内两者主要的区别是凋亡不引起机体炎症反应,坏死则引起炎症反应。