

杆状病毒 *gp 64* 基因可能是细胞凋亡诱导因子^{*}

代小江 庞 义^{**} 农 广 施先宗
(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要 发现野生型苜蓿丫纹夜蛾多粒包埋核多角体病毒 (*Autographa californica multica-*
psid nuclear polyhedrosis virus, *AcMNPV*) 诱导斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 细胞 SI-zsu-1 发
生典型的细胞凋亡. 该细胞凋亡发生于病毒感染后 10~12 h, 在病毒感染后的 24 h 左右的高峰
期细胞凋亡率为 95%~100%. *AcMNPV* DNA 和包埋型病毒粒子不能诱导细胞凋亡, 只有芽生
型病毒粒子才能诱导细胞凋亡. *AcMNPV gp 64* 基因编码的 GP64 膜融合蛋白不仅是位于芽生
型病毒粒子囊膜上已知唯一的病毒结构蛋白, 还是病毒感染时最早接触细胞的病毒因子. 首次
提出 *AcMNPV gp 64* 基因编码的 GP64 膜融合蛋白可能是一种细胞凋亡诱导因子, 并设计了构
建 *AcMNPV GP64* 膜融合蛋白异源包装病毒的实验方案以便加以证实.

关键词 杆状病毒, *AcMNPV*, *gp 64* 基因, 细胞凋亡诱导因子

分类号 Q 71

诱导细胞发生凋亡的因素很多, 诸如激素、辐射、高温、细胞毒性剂、单链 DNA 或受
损 DNA、血清或生长因子的去除等^[1,2], 病毒感染也是常见的诱导细胞凋亡的因素. 细胞采
取这种自杀性行为, 是适应不良环境的一种策略, 特别在遭到病毒攻击时, 细胞通过自杀,
可以阻止或限制病毒的复制. 作为打破宿主防御体系的一种策略, 不少病毒的基因组编码
有抗细胞凋亡的基因, 使之获得最大的生长优势. 目前已经在腺病毒科、疱疹病毒科和杆
状病毒科中发现能够调节细胞凋亡的基因^[1,2]. 迄今, 尚未见有关杆状病毒的细胞凋亡诱导
因子的报道.

在杆状病毒的生活史中, 存在 2 种类型的病毒粒子: 一种是在感染细胞的核中获得囊
膜并包埋的多角体蛋白晶格中的病毒粒子, 称包埋型病毒粒子 (Polyhedra-Derived Virus,
PDV); 另一种是以出芽方式穿过细胞质膜, 进入昆虫血淋巴或细胞培养基中的病毒粒子,
称芽生型病毒粒子 (Budded Virus, BV). PDV 引起水平传播, 即从一个昆虫体传染到另一
个虫体, BV 则引起虫体内或离体培养细胞的系统感染.

杆状病毒苜蓿丫纹夜蛾多粒包埋核多角体病毒 (*Autographa californica multica-*
psid nuclear polyhedrosis virus, *AcMNPV*) 的 *gp 64* 基因编码的 GP64 膜融合蛋白是芽生型病毒
粒子囊膜上的独有成分, 主要功能是在病毒感染细胞时介导 pH 依赖的病毒囊膜与内吞体
膜的融合^[3], 将核衣壳释放到细胞质中. GP64 为酸性蛋白, 成熟的蛋白发生糖基化、磷酸

^{*} 国家自然科学基金重点 (39730030) 资助项目 ^{**} 通讯联系人

收稿日期: 1998-03-04 代小江, 女, 33 岁, 博士, 讲师

化, 相对分子质量中有 10^4 是由糖基化所产生. 在其 N 端有一信号肽, 起着运输作用; 在 C 端具有一个由 23 个氨基酸残基组成的疏水性跨膜锚定域 (membrane-spanning anchor domain), 使之插入细胞质膜中^[4-6]. 核衣壳在插入膜颗粒的质膜位置出芽, 形成在病毒粒子囊膜上含有 GP64 蛋白的芽生型病毒粒子. gp 64 基因是病毒的必需基因, 其编码的 GP64 膜融合蛋白不仅是位于芽生型病毒粒子囊膜上已知唯一的病毒结构蛋白, 并在病毒侵入细胞中起着重要作用^[7].

根据实验结果和理论分析, 本文首次提出 AcMNPV 的 gp 64 基因编码的 GP64 膜融合蛋白为一种细胞凋亡诱导因子的假说, 并设计了构建 AcMNPV GP64 膜融合蛋白异源包装病毒的实验方案以证实这一假说.

1 材料和方法

(1) 病毒和细胞: 野生型 AcMNPV 引自美国加州大学 Riverside 分校 Federici B A 教授实验室. 斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 细胞 SI-zsu-1 由本实验室自建; 草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞 Sf-9 引自英国自然环境研究委员会病毒研究所 (NERC, Institute of Virology, Oxford, England); 粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 细胞 Tn-5B1-4 由美国康乃尔大学 Granados R R 教授惠赠. 细胞培养液为 TC-100 (GIBCO), 补加 10% 的胎牛血清 (GIBCO), 培养温度 27°C .

(2) 病毒感染: 将病毒加入细胞之时定为病毒感染时间零时. AcMNPV 在 Sf-9 或 Tn-5B1-4 细胞中扩增, 用作毒种的 AcMNPV 分别来自于感染 Sf-9 和 Tn-5B1-4 细胞后 72 h 的细胞上清. 病毒滴度的测定采用空斑定量法. 在病毒感染后不同时间, 相差显微摄影记录细胞形态变化, 并用 $d=0.08\%$ 台盼蓝染色计数细胞成活率.

(3) 芽生型病毒粒子的制取: 收集 AcMNPV 感染 Tn-5B1-4 细胞后 48 h 的细胞上清, $5\,000\text{ r/min}$ 离心 30 min, 除去细胞碎片等杂质, 收集上清, 实验重复一次; 上清 $17\,000\text{ r/min}$ 离心 1 h, 吸弃上清, 将沉淀的病毒粒子重悬于适量的无菌 TC-100 培养基中, $17\,000\text{ r/min}$ 离心 1 h, 吸弃上清, 将病毒粒子再次重悬于适量无菌 TC-100 培养基中, 4°C 保存.

(4) 包埋型病毒粒子的制取: 取 $100\mu\text{L}$ AcMNPV 病毒多角体悬液, 加入等体积的裂解缓冲液, 37°C 作用 15 min 至病毒悬液较澄清, 用 HAc 调 pH 至 7.0, 并用 20 mL 无菌 PBS (pH 7.2) 稀释. 4°C 下 $5\,000\text{ r/min}$ 离心 30 min, 上清在 4°C 下 $20\,000\text{ r/min}$ 离心 60 min, 将沉淀悬浮在 1.5 mL 无血清 TC-100 培养基中, 经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 4°C 保存.

(5) 病毒 DNA 的纯化: 取 $100\mu\text{L}$ 病毒多角体悬液, 加入等体积的裂解缓冲液, 37°C 作用 15 min 至病毒悬液较澄清, 加入 $200\mu\text{L}$ $d=2\%$ 的 SDS 和 $25\mu\text{L}$ 蛋白酶 K ($10\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 50°C 作用 30 min, 至病毒悬液完全澄清, 用酚, 酚: 氯仿, 氯仿: 异戊醇依次小心轻柔抽提, 乙醇沉淀.

(6) 病毒 DNA 转染昆虫细胞: 采用磷酸钙沉淀法.

(7) 细胞凋亡体 DNA 片断的提取: 参见文献 [8].

2 结果和讨论

2.1 AcMNPV 诱导 SI-zsu-1 细胞发生细胞凋亡

如图 1 所示, AcMNPV 的芽生型病毒粒子诱导 SI-zsu-1 细胞发生典型的细胞凋亡反

应. 在细胞形态学上, 光镜下首先观察到细胞表面出现突起, 然后细胞进一步碎裂成球形的亚细胞小体, 即凋亡体 (apoptotic bodies) (图 1). 用 $d = 0.08\%$ 台盼蓝染色, 凋亡细胞和凋亡体被染成蓝色. 在生物化学上, 由于受内源性核酸酶的降解, 细胞 DNA 断裂成 180~200 bp 的片段或这些寡核苷酸片段的多聚体. 在细胞受病毒攻击后 24 h 左右提取细胞总 DNA, 在 $d = 1.5\%$ 的琼脂糖凝胶上电泳, 其凝胶电泳区带呈特征性的梯形. 综合细胞形态学和生物化学的特征, 可以判定 SI-zsu-1 细胞在 AcMNPV 的芽生型病毒粒子诱导下发生了典型的细胞凋亡反应.

用 MOI 为 5 的病毒攻击细胞, AcMNPV 诱导 SI-zsu-1 细胞发生的细胞凋亡开始于感染后 10~12 h 左右, 在 12~24 h 内, 发生细胞凋亡的细胞数量持续上升, 在 24 h 左右达到高峰, 细胞死亡率达 95%~100%, 在光镜下观察到几乎所有的细胞均碎裂成亚细胞的凋亡小体 (图 1). 病毒感染后 72 h 左右, 在不足 0.1% 的细胞中观察到病毒包涵体.

2.2 芽生型病毒粒子能够单独诱导细胞凋亡

通常所用的病毒接种液为病毒感染后的细胞上清. 考虑到在该细胞上清中不仅含有 BV, 还含有大量病毒基因产物及其降解产物, 这些产物也可能是细胞凋亡诱导因子. 为了排除细胞上清中存在的病毒基因产物和降解产物, 确定 BV 能够单独诱导细胞凋亡, 通过高速离心分离 BV. 用只含 BV 的接种液感染 SI-zsu-1 细胞, 同时用该接种液感染 Sf-9 细胞作为对照以检查该 BV 是否具有感染活性. 病毒感染后 48 h 左右, Sf-9 细胞正常复制出病毒多角体, 说明经高速离心后的 BV 仍然具有感染活性. 病毒感染后 12 h 左右, SI-zsu-1 细胞开始出现细胞凋亡, 24 h 后 90% 以上的细胞发生细胞凋亡. 结果说明, BV 能够单独诱导细胞凋亡 (图 2, 3).

2.3 病毒 DNA 转染不能诱导细胞凋亡

采用磷酸钙沉淀法将 AcMNPV DNA 转染入细胞, 结果发现, 细胞并不发生程序化死亡, 只有在培养的细胞中加入含 BV 的接种液才能诱导细胞凋亡, 如图 2, 3 所示. 由于磷酸钙沉淀法的转染效率只有 20% 左右, 为了保证有足量的病毒 DNA 转染入细胞, 分别用 1, 2, 5, 10 μg 的 AcMNPV DNA 转染 2×10^6 个 SI-zsu-1 细胞, 同时设立对照. 转染后细胞在 27 $^{\circ}\text{C}$ 连续培养观察 10 d. 细胞形态学和生物化学特征显示, 各组受不同量 DNA 转染后的 SI-zsu-1 细胞均没有发生程序化死亡. 细胞正常生长和分裂. 在对照中, 用 1 μg AcMNPV

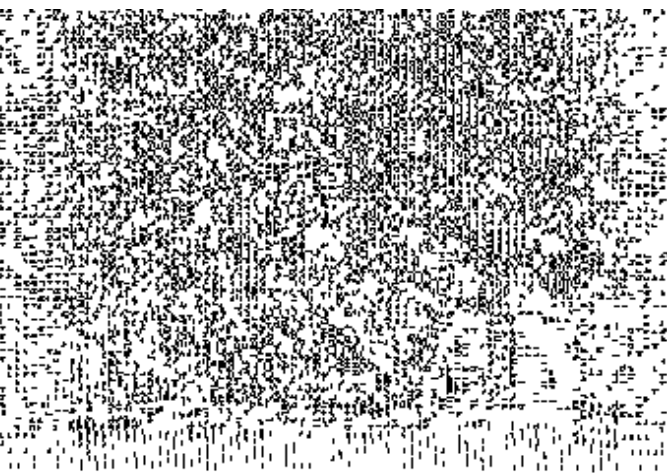


图 1 SI-zsu-1 细胞及细胞凋亡的

光学显微镜照片 ($\times 100$)

Fig. 1 SI-zsu-1 cells and their apoptotic bodies at the microscopic level

a 正常的 SI-zsu-1 细胞; b~d 感染 AcMNPV 的 SI-zsu-1 细胞, 病毒接种量为 5 个 MOI, 示病毒感染后不同时间的细胞凋亡反应, b, c, d 分别为感染后 18, 12, 24 h



图 2 不同感染处理的几种细胞的光学显微镜照片

Fig. 2 Phenotype of insect cells infected with different treatments at the microscopic level

a 正常的 *Sl-zsu-1* 细胞; b 转染 *AcMNPV* DN A 96 h 的 *Sl-zsu-1* 细胞, 示没发生细胞凋亡; c 感染 *AcMNPV* 芽生型病毒粒子 48 h 的 *Sl-zsu-1* 细胞, 示细胞凋亡体; d 转染 *AcMNPV* DN A 96 h 的 *Tn-5B1-4* 细胞, 示病毒包涵体; e 感染 *AcMNPV* 包埋型病毒粒子 96 h 的 *Sl-zsu-1* 细胞, 示没发生细胞凋亡

PV DN A 转染其复制敏感细胞 *Tn-5B1-4*, 结果在转染后 3 d 左右, *Tn-5B1-4* 细胞就呈现典型的病毒感染特征并复制出病毒多角体. 对照实验说明, 本研究所用的病毒 DN A 具有转染活性并且有足量的病毒 DN A 被转染入细胞. 实验重复 3 次, 结果表明, *AcMNPV* DN A 转染 *Sl-zsu-1* 细胞的确不能诱导细胞凋亡 (图 2, 3).

2.4 包埋型病毒粒子不能诱导细胞凋亡

用适量的 *AcMNPV* PDV 感染 *Sl-zsu-1* 细胞, 同时用 MOI 为 2 的 BV 感染细胞作为对照. 病毒感染后 24 h, 对照发生典型的细胞凋亡, 而用 PDV 感染的 *Sl-zsu-1* 细胞却没有发生细胞凋亡 (图 2, 3).

根据以上的实验结果, 芽生型病毒粒子诱导了细胞凋亡而病毒 DN A 转染细胞不能诱导细胞凋亡, 两者的区别在于芽生型病毒粒子带有病毒结构蛋白而 DN A 没有. 目前所知, 在 *AcMNPV* 基因组中定位了 12 种杆状病毒的结构蛋白基因, 在这些结构蛋白中, *gp64* 基因编码的 GP64 膜融合蛋白是位于芽生型病毒粒子囊膜上已知唯一的病毒基因编码的结构蛋白. 进一步的实验结果表明, 包埋型病毒粒子不能诱导细胞凋亡, 只有芽生型病毒粒子才能诱导细胞凋亡. BV 和 PDV 的主要区别在于 BV 的囊膜上有 GP64 膜融合蛋白, 而 PDV 则无.

gp64 基因编码的 GP64 膜融合蛋白是迄今发现的位于芽生型病毒粒子囊膜上已知唯一的病毒结构蛋白, 并在病毒侵入细胞时起重要作用. 不仅如此, GP64 膜融合蛋白还是病毒感染时最早接触细胞的病毒因子. 细胞在遭到病毒攻击时, 采取程序化死亡这种自杀性行为, 是适应不良环境的一种策略, 细胞通过自杀, 可以阻止或限制病毒复制, 这是细胞

长期适应环境或被环境选择的结果. 为了及时阻止病毒复制, 细胞凋亡必须快速发生, 最有效的方式就是细胞在接触到病毒最早的信号时就开始启动凋亡的发生, 以最大限度地阻止病毒的复制. 实际上在 *AcMNPV* 感染细胞时, 病毒通过 GP64 膜融合蛋白释放核衣壳进入细胞从而侵入细胞^[6,7], 因此, GP64 膜融合蛋白应该是病毒感染时最早接触细胞的病毒因子. 另外, 本研究所观察到的 *AcMNPV* 诱导 SI-zsu-1 细胞凋亡发生在病毒感染后 10 h 左右, 那么, *AcMNPV* 诱导细胞凋亡的因子应该是病毒接触细胞时的某种结构蛋白, 或病毒早期或接近早期的基因表达产物. *AcMNPV* gp64 基因启动子具有早晚期调控元件, 早期 mRNA 在病毒感染宿主细胞后 1~3 h 出现^[4,5]. 因此, 如果 *AcMNPV* 的结构蛋白为细胞凋亡诱导因子, 该结构蛋白最可能是 GP64 膜融合蛋白.

根据已有文献报道, 猪繁殖和呼吸综合症病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRS) 诱导典型的细胞凋亡, 其功能定位在 p25 基因上^[9]. p25 基因编码的 P25 蛋白是一种位于病毒粒子囊膜上的糖蛋白^[9]. GP64 膜融合蛋白恰好也是位于病毒粒子囊膜上的糖蛋白, 与 P25 蛋白具有相似性. 另外, 人类免疫缺陷型病毒 1 型 (Human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 诱导 CD4⁺ T 细胞的凋亡. CD4⁺ T 细胞凋亡可被胞膜上的病毒 gp120-gp41 复合物与 CD4 受体相互作用而诱导, 因此, HIV-1 病毒的膜蛋白被认为是细胞凋亡诱导物^[10]. 这些文献报道说明, 病毒的膜蛋白可以是细胞凋亡诱导因子, 它通过与位于细胞膜上的病毒受体结合而诱发细胞凋亡.

根据以上的实验结果和理论分析, 作者认为, *AcMNPV* gp64 基因编码的 GP64 膜融合蛋白可能是一种细胞凋亡诱导因子. 当细胞受病毒攻击时, GP64 蛋白可能在信号传递路径中起首要作用, 对一些种类的细胞, GP64 蛋白可能促进病毒对细胞的侵染, 而对另一些种类的细胞, GP64 蛋白则可能启动细胞凋亡的发生. 这无疑涉及到病毒入侵的分子机理及宿主专一性问题, 值得深入探讨.

根据 GP64 膜融合蛋白在细胞内的合成和运输过程, 以及 GP64 膜融合蛋白在病毒侵入细胞中的作用机理^[3,7], 本文设计了一种实验方案以证实 gp64 基因编码的 GP64 膜融合蛋白是一种细胞凋亡诱导因子. 即构建一种只含 *AcMNPV* GP64 膜融合蛋白的异源包装病毒. 其原理为: 采用一种不诱导 SI-zsu-1 细胞凋亡的亲本病毒, 将 *AcMNPV* GP64 膜融合蛋白异源包装到该亲本病毒的 BV 囊膜上. 用该异源包装病毒的 BV 感染 SI-zsu-1 细胞, 如果诱导了细胞凋亡, 则直接证实了 *AcMNPV* gp64 基因编码的 GP64 膜融合蛋白为一种细

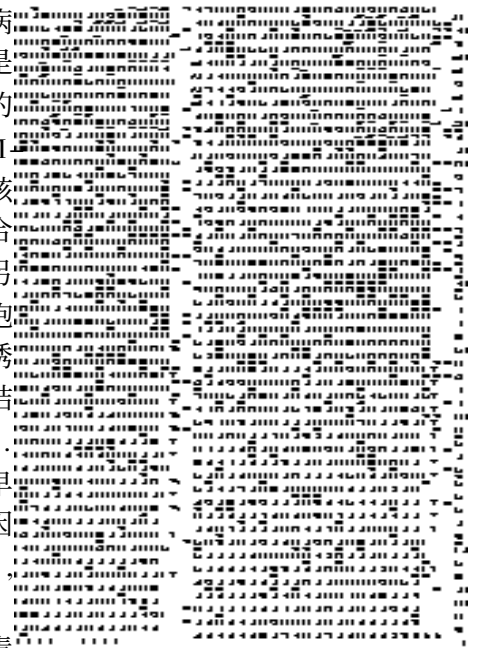


图 3 细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳照片

Fig. 3 Electrophoresis of cell

DN A in agarose gel

a 感染 *AcMNPV* 芽生型病毒粒子 48 h 的 SI-zsu-1 细胞, 示梯形的细胞凋亡体 DN A 片断; b 感染 *AcMNPV* 包埋型病毒粒子 96 h 的 SI-zsu-1 细胞; c 转染 *AcMNPV* DN A 96 h 的 SI-zsu-1 细胞; d 转染 *AcMNPV* DN A 96 h 的 Tn-5B1-4 细胞; m 标准相对分子质量, λ DN A / HindIII + EcoRI

胞凋亡诱导因子.

参 考 文 献

- 1 Clem R J, Fechheimer M, Miller L K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 1991, 254 1388~ 1390
- 2 Clem R J, Hockenberry D, Nunez G, Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 1990, 348 334~ 336
- 3 Blissard G W, Wenz J R. Baculovirus *gp* 64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol*, 1992, 66 6829~ 6835
- 4 Whitford M, Stewart S, Kuzio J, et al. Identification and sequence analysis of a gene encoding *gp* 67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*, 1989, 63 1393~ 1399
- 5 Monsma S A, Blissard G W. Identification of a membrane fusion domain and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein. *J Virol*, 1995, 69 2583~ 2595
- 6 Chernomordik L, Leikina E, Cho M S, et al. Control of baculovirus *gp*64-induced syncytium formation by membrane lipid composition. *J Virol*, 1995, 69 3049~ 3058
- 7 Monsma S A, Oomens A G P, Blissard G W. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol*, 1996, 70 4607
- 8 Herrmann M, Lorenz H M, Voll R, et al. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22 5506~ 5507
- 9 Suarez P, Diaz-Guerra M, Prieto C, et al. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J Virol*, 1996, 70 2876~ 2882
- 10 Westendorp M O, Frank R, Ochsenbauer C, et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tag and *gp* 120. *Nature*, 1995, 375 497~ 500

Is Baculovirus *gp* 64 Gene A Primary Factor Inducing Apoptosis of Insect Cells?

Dai Xiaojiang* Pang Yi Nong Guang Shi Xianzong

Abstract Apoptosis was observed in *Spodoptera litura* cell line SL-zsu-1 induced by *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus (*AcMNPV*). Apoptotic cell death appeared at 10~ 12 h after infection, and peak mortality was approximately 95%~ 100%. The Apoptosis was found in the SL-zsu-1 cells infected with budded virions but not in the cells transfected with viral DNA or infected with polyhedrin-derived virions. *AcMNPV* GP64 membrane fusion protein encoded by *gp* 64 gene is the major envelope glycoprotein of the budded virion, and is the earliest viral factor touching cells when cells were attacked by budded virion. A hypothesis was proposed that *AcMNPV* GP64 membrane fusion protein gene might be a primary apoptosis-inducer according with our experimental results and literature analysis. An experimental program has been designed to prove the hypothesis.

Keywords baculovirus, *AcMNPV*, *gp* 64 gene, apoptosis-inducing factor

* State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China