

苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒的感染对 Sf9 细胞周期的影响*

王颖¹, 余泽华^{1**}, 姚汉超¹, 陶德定², 陈曲侯¹

(1. 华中师范大学昆虫研究所, 湖北武汉 430079; 2. 华中科技大学同济附属医院分子实验中心, 湖北武汉 430030)

Affection of Infection of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus on Sf9 Cell CycleWANG Ying¹, YU Ze-hua^{1**}, YAO Han-chao¹, TAO De-ding², CHEN Qu-hou¹

(1. Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China; 2. Department of Molecular Biology, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Baculovirus infection resulted in many changes in host cells. The progress of the cell cycle of *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21-AE clonal isolate 9 (Sf9) cells was directed by Flow cytometry analysis (FACS). The results showed that the whole time of the cell cycle was about 18 hours and the gaps between every two phases were about 6 hours. At 12-18 hours post AcNPV infection, Sf9 cells were arrested in G₂/M phase. When the cells in G₁/S phase synchronized by drug were infected by AcNPV, 2/3 of the cells was in G₂/M phase and 1/3 of the cells in S phase.

Key words: AcNPV; Cell cycle; FACS; Cell cycle arresting

摘要: 病毒的感染导致细胞内部发生一系列变化。应用流式细胞仪 FACS 的荧光检测, 测出 Sf9 细胞完成整个周期循环大约需要 18h, G₁/S、G₂/M 各时相的时间间隔约为 6h; AcNPV 感染 Sf9 细胞 12-18h, 细胞被抑制于 G₂/M 期; Sf9 细胞同步于 G₁/S 期后释放细胞并用 AcNPV 感染, 12h 后, 2/3 的细胞处于 G₂/M 期, 1/3 的细胞处于 S 期。

关键词: 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒; 细胞周期; 流式细胞仪分析; 周期抑制

中图分类号: S433 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)02-0132-05

细胞周期是细胞完成自身增殖必经过程, G₁、S、G₂、M 是细胞按功能划分的四个时相。在每一时相细胞将启动不同基因、表达不同蛋白、进行不同调控, 从而完成不同的生化事件。近年来的研究表明, 作为外源寄生物的病毒入侵宿主细胞后在进行自身增殖之前, 首先要依靠宿主细胞的转录翻译系统表达一系列极早期蛋白, 然后由这些蛋白控制宿主细胞内多种蛋白水平, 这一步骤最直接的影响就是抑制宿主细胞周期。I 型疱疹病毒 HSV-1 的研究已经证实病毒的感染诱导了细胞周期的抑制^[1,2], 而且此抑制与病毒极早期基因 ie1 的表达产物密切相关^[3,4]。对于 HSV-1 攻击的宿主细胞而言, 在感染的早期细胞内多种周期蛋白的活性与含量都发生了

显著变化^[5-8]。本实验以 AcNPV-Sf9 系列为实验体系, 确定了 Sf9 细胞周期各时相的时间间隔以及 AcNPV 的感染对 Sf9 细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) IPLB-Sf21-AE 克隆分离株 9 (Sf9) 细胞由武汉大学病毒所孟小林教授提供。苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcNPV) 为本所保存。

1.1.2 抑制剂 Nocodazole (诺考达挫) 与 FdUrd (5-氟脱氧尿嘧啶核苷酸) 购于 Sigma 公司。

收稿日期: 2001-09-10, 修回日期: 2001-11-21

* 基金项目: 国家自然科学基金资助 (39870039); 华中师范大学自然科学基金资助 (200112)。

作者简介: 王颖 (1977-), 女, 湖北省籍, 硕士研究生。

** 通讯作者: 余泽华 (1945-), 男, 湖北省籍, 教授, 主要从事昆虫病毒的研究。Correspondence author

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用 Grace 粉剂加上 10% 胎牛血清配制的完全培养基培养 Sf9 细胞。Sf9 细胞由贴壁细胞瓶培养转入转瓶进行悬浮培养,接种量控制在 10^5 cells/mL;加入新鲜完全培养基 40 mL,转速为 70 r/min~80 r/min, 27℃ 培养 3~5 d,细胞密度达 2×10^6 cells/mL,即此时细胞处于对数生长期。下述实验操作所作用细胞均为对数生长期细胞。

1.2.2 病毒扩增 弃除 Sf9 细胞培养基,加入病毒原液,吸附 2 h,除去上清,换入新鲜培养基,72 h 收获上清。病毒的感染复数(M.O.I.)为 2.1。

1.2.3 细胞抑制剂对细胞的抑制 细胞周期抑制剂 Nocodazole 与 FdUrd 用来确定 Sf9 细胞周期各时相的时间,可分别将细胞抑制在 G_2/M 期与 G_1/S 期。首先将两种抑制剂分别用二甲亚砜和 pH7.4 的磷酸缓冲液配制成母液,Nocodazole 的母液浓度为 1 mg/mL,FdUrd 母液浓度为 1.25 mg/mL。直接将母液加入 Sf9 细胞培养液中,设置一系列浓度及取样时间,实验分析确定抑制 Sf9 细胞周期的最佳浓度与时间。

1.2.4 Sf9 细胞周期各时相测定 收集并离心被 Nocodazole 与 FdUrd 分别抑制的 Sf9 细胞,用 PBS 重悬细胞沉淀进行清洗,离心吸弃 PBS,加入新鲜培养基,于不同时间取样,FACS 分析,测定 Sf9 细胞周期各时相的时间间隔。

1.2.5 AcNPV 的感染对 Sf9 细胞周期的影响 离心去掉悬浮培养的 Sf9 细胞的培养基,加入 20 mL 病毒液重悬细胞,吸附 2 h,除去病毒液,加入 40 mL 新鲜培养基,于不同时间取样,FACS 分析,确定 Sf9 细胞周期。

1.2.6 AcNPV 的感染对同步于 G_1/S 期的 Sf9 细胞周期的影响 被 FdUrd 抑制的 Sf9 细胞在换上新鲜培养基时,对其进行病毒感染。在感染后于不

同时间取样,进行 FACS 分析,确定细胞所在的时期。

1.2.7 FACS 分析 通过流式细胞仪对染色细胞进行荧光检测,确定各细胞所在细胞周期时相。首先将取样细胞 2000 r/min 离心 5 min,收集细胞,PBS 洗两次,离心后加入 75% 乙醇固定,存放于 -20°C ,待上机之前,离心除去乙醇,加入碘化丙啶(PI)液(PI30-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶于 PBS,加入 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EDTA, 0.1% Tritonx-100, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase) 500 μL , 37℃ 溶解 15 min,上机检测。

2 结果

2.1 细胞抑制剂抑制点的测定

设置 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四种终浓度,确定 FdUrd 抑制 Sf9 细胞周期的最佳浓度。结果证实 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为最佳浓度。加入终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FdUrd 12 h 后,80% 以上的细胞被抑制在 G_1/S 期(表 1、图 1)。

用 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 五种终浓度,进行 Nocodazole 抑制 Sf9 细胞周期的实验,结果表明 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为最佳抑制终浓度。加入终浓度 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Nocodazole 16 h 后,70% 以上的细胞被抑制在 G_2/M 期(表 1)。

表 1 FdUrd、Nocodazole 抑制过程中 Sf9 细胞周期时相分布

Table 1 Sf9 Cell Cycle Phase Distribution and Drug-Induced Arrest

时间 h	FdUrd(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)			Nocodazole(12 $\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	G_1 %	S %	G_2/M %	时间 h	G_1 %	S %	G_2/M %
0	23	38	39	0	27	40	33
2	21	39	40	4	14	47	39
4	22	44	34	8	11	46	43
8	23	51	26	12	8	40	52
12	28	52	20	16	6	20	74
16	33	60	7	18	5	18	77
18	32	63	5	24	4	20	76

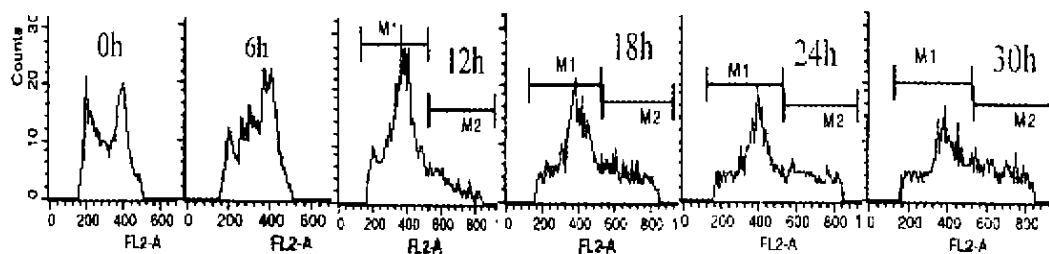


图 1 FdUrd 抑制 Sf9 细胞周期测试图

Fig. 1 DNA histograms of normal and FdUrd-induced Sf9 cells

2.2 Sf9 细胞周期各时相时间间隔测定

Sf9 的细胞分别被 FdUrd 与 Nocodazole 抑制 18 与 20h 后, 释放细胞, 间隔 2h 取样, 各时相细胞分布绘制如图 2、3。

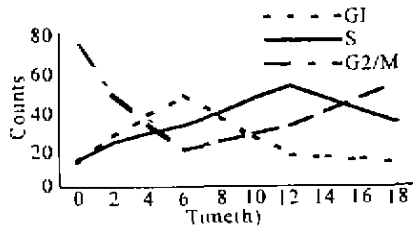


图2 FdUrd 同步细胞释放, 细胞周期检测

Fig.2 The time course and relative cell cycle phase distribution after release from FdUrd block

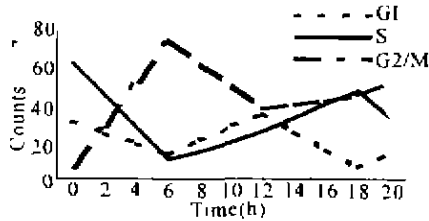


图3 Nocodazole 同步细胞释放, 细胞周期检测

Fig.3 The time course and relative cell cycle phase distribution after release from Nocodazole block

当细胞被 FdUrd 同步于 G₁/S 期时, 释放细胞。在释放的第一个 6h, G₁、S 期细胞量减少, 细胞积累发生在 G₂/M 期, 并达到最高点, 随后 G₂/M 期细胞量减少, G₁、S 期细胞量增大; 释放 12h, G₁ 期细胞量达到高峰; 细胞释放达到 18h, G₁ 期细胞量减至最小值, S 期细胞数量最多。整个释放过程说明同步于 G₁/S 期的细胞释放后到 G₂/M 期需要 6h, 即 S→G₂/M 间隔约为 6h; 同样 G₂/M→G₁、G₁→S 的历期均为 6h 左右, 因而整个细胞周期大概为 18h。

2.3 AcNPV 的感染对 Sf9 细胞周期的影响

Sf9 细胞吸附 AcNPV 2h 后, 加入新鲜培养基, 将此刻刻定为 0h, 依次按 0、6、12、18、24、30、36h 取样, 经流式细胞仪检测发现感染 12h 后, 细胞大部分被抑制在 G₂/M 期, G₁ 期的细胞占很少部分(表 2)。与正常细胞周期分析比较, 感染 12h 后, 细胞培

养液中开始出现异倍体细胞 (>4N DNA), 异倍体细胞的出现应该是病毒的感染所致, 进一步的, 病毒 DNA 的复制导致了 >4N DNA 细胞的出现。

表 2 AcNPV 的感染对 Sf9 细胞周期的抑制

Table 2 Infected Sf9 cycle phase distribution by AcNPV

时间(h. p. i)	G ₁ %	S %	G ₂ /M %
0	30	32	38
6	23	41	36
12	14	28	36
18	4	14	82
24	6	13	81
30	3	23	74
36	2	10	88

2.4 AcNPV 的感染对同步于 G₁/S 期的 Sf9 细胞周期的影响

为了检测 AcNPV 的感染导致的细胞周期抑制是否与细胞周期各时相有关, 我们用 FdUrd 将细胞抑制在 G₁/S 期的, 释放后吸附 AcNPV 2h, 加入新鲜培养基, 并以此时刻为取样 0h, 6、12、18、24、30h 分别取样, FACS 分析发现从 12h 开始, G₂/M 期细胞呈积累状态, 同时出现异倍体细胞(表 3 与图 4)。

表 3 同步于 G₁/S 期 Sf9 细胞受 AcNPV 感染后细胞分布情况

Table 3 After releasing from FdUrd block, infected Sf9 cycle phase distribution by AcNPV

时间(h. p. i)	G ₁ %	S %	G ₂ /M %
0	26	53	21
6	7	53	40
12	3	36	61
18	0	31	69
24	0	27	73
30	0.39	32	67

值得指出的是 Sf9 细胞释放后感染 AcNPV, 从 12h 开始细胞分布虽大部分集中于 G₂/M 期, 但仍将近 1/3 的细胞处于 S 期, 而 G₁ 期几乎没有细胞(图 5)。

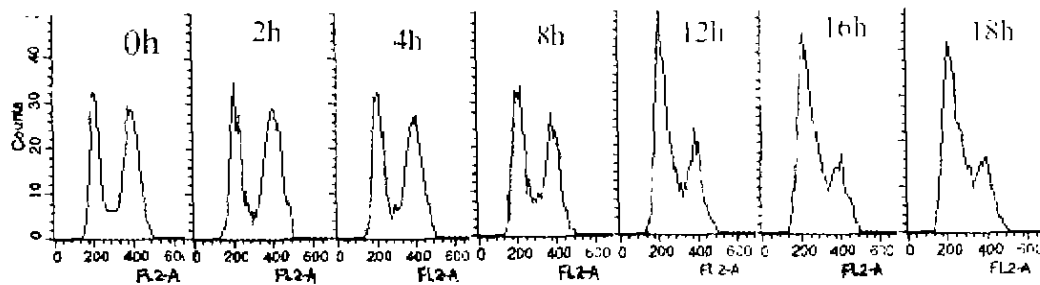


图 4 同步细胞感染后异倍体细胞比例图(M_1 :二倍细胞比例; M_2 :异倍细胞比例)

Fig. 4 After infecting synchronized Sf9 cells, the distribution on cells with $=4N$ DNA and $>4N$ DNA

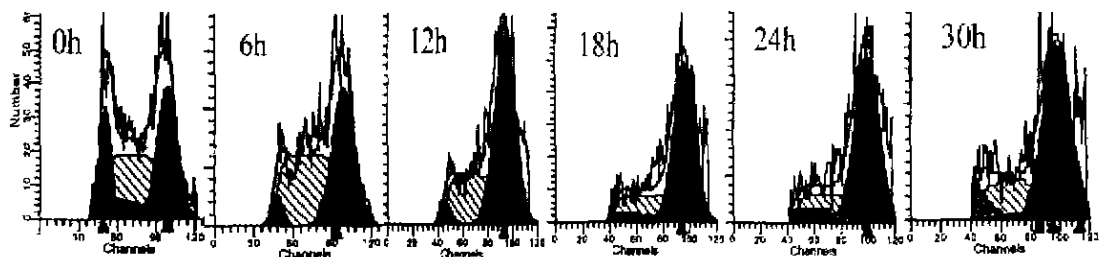


图 5 同步细胞感染后细胞周期分析图

Fig. 5 After infecting synchronized Sf9 cells, the distribution of cell cycle

3 讨论

悬浮培养的 Sf9 细胞在处于对数生长期时细胞周期各时相的分布几乎是一致的,即 20%~30% 的细胞处于 G_1 期,30%~40% 的细胞处于 S 期,30%~40% 的细胞处于 G_2/M 期(表 1)。细胞受到抑制剂 FdUrd、Nocodazole 的抑制后释放,分别同步于 G_1/S 、 G_2/M 期的细胞完成整个细胞周期循环时间大致相等,18h 左右,并且 $G_1 \rightarrow S$ 、 $S \rightarrow G_2/M$ 、 $G_2/M \rightarrow G_1$ 的历期均在 6h 左右。这与 Braunagel 测得的结果基本一致^[9]。Braunagel 实验结果表明: $G_1 \rightarrow S$ 、 $S \rightarrow G_2/M$ 、 $G_2/M \rightarrow G_1$ 的历期均在 6h~7h 左右,整个周期时间为 18h~20h 左右。

FACS 分析正常的 Sf9 细胞没有发现异倍体 ($>4N$ DNA) 细胞,但在被病毒感染的 Sf9 细胞中出现了 $>4N$ DNA 的异倍体细胞。从异倍体细胞出现的时间来看产生异倍体细胞的原因主要是病毒 DNA 的复制。Sf9 细胞被 AcNPV 感染 12h 后,大部分细胞 ($>80\%$) 被抑制在 G_2/M 期(表 2)。虽然 G_2/M 期细胞比例的增大,可能是因为 G_1/S 期的细胞受到 AcNPV 攻击后死亡造成的,但是经过检测证实感染 48h 的细胞存活率约为 96%,可以推论出 Sf9 细胞的周期抑制是由于 AcNPV 诱导产生。在

HSV-1 的研究中证实 HSV-1 的感染对宿主细胞存在两个抑制点: G_1/S 与 G_2/M ^[1,2]。当细胞处于 G_0 期时进行病毒感染,将诱导细胞周期抑制在 G_1/M 期。我们的实验也证明了正常 Sf9 细胞被 AcNPV 感染后细胞周期被抑制于 G_2/M 期。说明病毒引起的细胞周期抑制并非是某种病毒具有的特性,可能是多数病毒具有的共性。

AcNPV 的感染导致 Sf9 细胞周期最终抑制在 G_2/M 期,那么分别对细胞、病毒而言细胞的哪些方面与病毒诱导的周期抑制有关,而病毒的哪些蛋白与基因参与了抑制作用呢?另外,处于哪一时相的 Sf9 细胞对 AcNPV 的感染更敏感?为了解决这些问题,我们所做的第一步是将细胞抑制在 G_1/S 期,检测同步于 G_1/S 期的细胞在感染 12h 后 60%~70% 的细胞处于 G_2/M 期,30% 左右的细胞处于 S 期, G_1 期几乎没有细胞分布。与 AcNPV 感染非同步细胞的周期分布相比,同步细胞受到病毒感染抑制后 G_2/M 期细胞量的减少,S 期细胞量的增加,能否说明 G_1/S 期存在影响 AcNPV 诱导周期抑制的因素?这有待于进一步的实验证明。另外 Sf9 细胞处于哪一周时相对 AcNPV 的感染更敏感以及 AcNPV 的哪些因子参与周期抑制诱导,这两方面的实验正在进行当中。

参考文献

- [1] Song B, Lin J J, Yeh K C, *et al*. Herpes simplex virus infection blocks events in the G₁ phase of the cell cycle[J]. *Virology*, 2000, 267:326 - 334.
- [2] Ehmman G L, Mclean T I, Bachenhermer S L. Herpes simplex virus type 1 infection impose a G₁/S block in asynchronously growing cells and prevents G₁ entry in quiescent cell[J]. *Virology*, 2000, 267:335 - 349.
- [3] Hobbs I, WE, Deluca N A. Perturbation of cell cycle progression and cellular gene expression as a function of herpes simplex virus ICP0[J]. *J Virol*, 1999, 73:8245 - 8255.
- [4] Lomonte P, Enverett R D. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 inhibits progression of cells through mitosis and from G₁ into S phase of the cell cycle[J]. *J Virol*, 1999, 73: 9456 - 9567.
- [5] Parkiuson J, Lees-Millet S P, Everett R D. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase[J]. *J Virol*, 1999, 73:650 - 657.
- [6] Kawaguchi Y, Bruni R, Roizman B. Interaction of herpes simplex virus 1 a regulatory protein ICP0 with elongation factor 1 δ ; ICP0 affects translational machinery [J]. *J Virol*, 1997, 71: 1019 - 1024.
- [7] Kawaguchi Y, Sant C V, Roizman B. Herpes simplex virus 1 a regulatory protein ICP0 interacts with and stabilizes the cell cycle regulator cyclinD₃[J]. *J Virol*, 1997, 71:7328 - 7336.
- [8] Everett R D, Earnshaw W C, Findlay J, *et al*. Specific destruction of kinetochore protein CENP-C and disruption of cell division by herpes simplex virus immediate-early protein Vmw110[J]. *EMBO J*, 1999, 18:1526 - 1538.
- [9] Braunagel S C, Pan R, Belyavskiy M, *et al*. *Autographya californica* nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cells cycle arrest at G₂/M phase[J]. *Virology*, 1998, 224:195 - 211.