

感染 HaSNPV 棉铃虫幼虫的组织病理和免疫组化研究*

欧阳志荃, 孙修炼, 邓 菲, 袁 丽, 胡志红**

(中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学重点实验室, 无脊椎动物病毒学联合开放实验室, 湖北武汉, 430071)

Pathogenic and Immunohistochemical Studies of the
HaSNPV Infected *Helicoverpa armigera* Larvae

OUYANG Zhi-quan, SUN Xiu-lian, DENG Fei, YUAN Li, HU Zhi-hong**

(Key lab of Molecular Virology and Joint-laboratory of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: Here we report the pathogenesis process of *Helicoverpa armigera* larvae infected with *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (HaSNPV) using H.E staining and immunohistochemistry with antibody against polyhedrin. The fourth instar *Helicoverpa armigera* larvae were injected with 5×10^3 PFU HaSNPV per larva. H.E staining showed that no apparent pathogenesis could be detected in all tissues at 24 hours post infection (hpi). But at 48 hpi, the nucleus of the fat body and trachea epidermis became swollen, and the shape of the cells in these tissues were changed. At 72 h p i, significant hispathogenesis were observed in fat body, trachea epidermis and the epidermis, while no changes were found in midgut and muscles. At 96 hpi, the constitution of the fat body, trachea and epidermis were destroyed. The immunohistochemistry results indicated the polyhedrin protein could not be detected at 24 hpi. At 48 hpi, it was found partially expressed in the tissues of fat body, trachea epidermis and epidermis. From 72 to 96 hpi, the polyhedrin was found heavily expressed in fat body, trachea epidermis and epidermis. No polyhedrin was found expressed in midgut until larvae dead and the musculature was not be infected all the time.

Key Words: HaSNPV; Time course of pathogenesis; Polyhedrin; Immunohistochemistry

摘要: 本文报道了棉铃虫单核衣壳核多角体病毒 (*Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, HaSNPV) 感染棉铃虫幼虫的病理时相及 HaSNPV 多角体蛋白在幼虫组织中表达的免疫组化研究。以 5×10^3 PFU 的 HaSNPV 出芽病毒粒子 (BV) 注射 4 龄初的棉铃虫幼虫, 石蜡切片的 H.E 染色表明, 在感染后 24h, 病理变化不明显; 48h 后脂肪体、气管组织的细胞核开始肿大, 细胞开始变形; 72h 后脂肪体、气管、真皮细胞核肿大十分明显, 组织结构松散; 但中肠和肌肉组织未见明显病变; 96h 后, 脂肪体、气管、真皮组织结构完全被破坏, 肌肉组织变疏松。免疫组化结果表明, 感染后 24h, 未能检测到多角体蛋白在幼虫组织中的表达; 感染后 48h, 多角体蛋白可在部分脂肪体、气管组织、血细胞和真皮组织的细胞核中表达; 72h 后, 被感染的脂肪体、气管组织、和真皮组织的细胞数比 48h 多; 96h 后, 多角体蛋白可以在脂肪体、气管、真皮组织中大量表达, 48h 到 96h 间, 被感染的血细胞数目基本不变, 中肠组织和肌肉都未检测到多角体蛋白的表达; 幼虫死亡后, 可在中肠上皮细胞的基底膜间隙中检测到多角体蛋白的表达, 肌肉组织中未见表达信号, 其它组织全部被感染并且组织结构被破坏, H.E 的结果与免疫组化的结果基本相符。

关键词: 棉铃虫核多角体病毒; 病理时相; 多角体蛋白; 免疫组化

中图分类号: 432.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2003)06-0603-04

收稿日期: 2003-05-21, 修回日期: 2003-07-10

* 基金项目: 国家杰出青年基金 (3002503)、中国科学院创新工程重要方向性项目 (kscx21-02, kscx-sw-301-09); 863 项目 (2001AA214031: 101-06-10-01); 国家 973 计划 (2003CB114202)

作者简介: 欧阳志荃 (1977-) 女, 湖南双峰籍, 硕士研究生, 研究方向为分子病毒学。

** 通讯作者: Corresponding author

棉铃虫属于实夜蛾属害虫,是一种危害多种农作物的世界性害虫,也是我国农业上的主要害虫。棉铃虫单核衣壳核多角体病毒(Helicoverpa armigera single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, HaSNPV)作为生物杀虫剂已经在我国获准商品化生产并在田间大量应用^[1, 2]。目前大量生产病毒制剂的主要方法是通过病毒感染棉铃虫幼虫,待幼虫死亡后,收集虫体,分离多角体获得^[3]。研究 HaSNPV 感染幼虫的病理过程,一方面可以深入了解病毒的致病机理及其与宿主相互作用的关系,另一方面将有利于提高病毒杀虫剂的生产效率,并为研制高效的基因工程病毒杀虫剂提供依据。本研究选取野生型 HaSNPV 感染后不同时间的幼虫,利用 H.E 染色,进行组织病理研究,并利用多角体蛋白基因抗体进行免疫组化研究,以揭示病毒对虫体的感染过程。

1 材料方法

1.1 病毒、细胞及抗体

本实验采用的 HaSNPV 为 HaSNPV G4 株,它是野生型棉铃虫病毒经虫体克隆得到的一个分离株^[1]。出芽病毒粒子(BV)来源于被 HaSNPV 感染幼虫的血淋巴,再经 HzAM1 (McIntosh and Ignoffo, 1983)细胞增殖,上清中出芽病毒粒子的滴度用终点稀释法测定并表示为 PFU/mL。HzAM1 细胞用含 10%胎牛血清的 Grace's 培养基于 27℃培养。胎牛血清、Grace's 培养基等购自 GIBCO/BRL 公司。免疫组化反应中用的一抗为多角体蛋白抗体,来源于原核表达 HaSNPV 多角体蛋白经纯化、免疫新西兰大白兔后分离血清获得。

1.2 供试昆虫及其感染过程

本实验所用棉铃虫由中国科学院武汉病毒所养虫室提供,人工饲料 28℃培养,挑选 3 龄末棉铃虫,待其蜕皮后 10min,置于冰上,等幼虫数目达到需要数目后,用 50μL 注射器将 5μL 共 5×10^3 PFU 的 BV 溶液注射于幼虫两侧腹趾之间的皮下。BV 用 TCID₅₀ 法测得,为 5.50×10^6 TCID₅₀/mL,即 3.79×10^6 PFU/mL。同时设注射无菌蒸馏水的健康对照。

1.3 组织切片及 H.E 染色

在幼虫感染后 24、48、72、96h 分别取 10 头虫,用 10mL 注射器将 carnoy's 固定液从幼虫尾部缓慢注入,直到虫体变僵,充满固定液;虫子投入固定液中固定 12h,经梯度酒精脱水,石蜡包埋后,旋转切片机连续切片,切片厚度 4μm,粘片,脱蜡

复水后,苏木精染 5min,流水冲洗 15min 后,伊红复染 1min,水洗后,脱水,透明,中性树胶封片,显微镜下观察记录。

1.4 免疫组化反应

1.4.1 载玻片的处理:将洁净的载玻片在新鲜制备 APES 稀释液(APES:丙酮=1:50)中浸泡 30s 左右,取出后干燥 3~5min,纯丙酮涮洗 2~3 次,捞出于无尘处干燥。

1.4.2 免疫组化 SABC 法^[4]:石蜡切片展片后,捞在经 APES 处理的载玻片上,置烤箱内 60℃处理 30min 使切片紧密粘附。具体方法见博士得公司 SABC 即用型试剂盒说明书,多角体抗体为 1:500 倍稀释。二抗反应结束后,滴加 25μg/mg 的链亲和素,室温 15min, PBS 洗 10min,以消除内源性生物素的背景,其他步骤不变。APES、SABC 即用型试剂盒及 DAB 染色试剂盒均购自武汉博士得公司,链亲和素购自 Promega 公司。

1.4.3 结果记录及分析:光学显微镜下观察,亮丽的棕黄色为阳性信号。显微镜为 Leica DLM/HCS,附带数码相机及 Leica DC300 成像软件。免疫组化结果用同济千屏影像工程公司 HPIAS 图象分析软件分析。

2 结果

2.1 被感染幼虫的 H.E 染色

我们选择注射感染的 4 龄棉铃虫幼虫,感染后不同时间点取样,幼虫经石蜡切片后进行 H.E 染色,染色结果表明,在感染后 24h,病理变化不明显,细胞形态保持较好,与健康对照无差异;感染 48h 后,脂肪体、气管上皮组织的细胞核变肿大,脂肪体结构不如健康组织致密,脂肪细胞之间边界变模糊,细胞开始变形,但中肠组织和肌肉组织未见明显的病理变化;72h 后脂肪体、气管、真皮细胞核肿大十分明显,组织结构变得松散;但中肠和肌肉组织未见明显病变;96h 后,脂肪体、气管、真皮组织结构完全被破坏(见表 1,彩版 III 图 1)。被感染昆虫在 96h 开始死亡。

表 1 病毒感染组织病理时相

Table 1 Pathogenic time course of the infected larvae tissues

hpi	Fat body	Trachea epidermic	Epidermic	Midgut
24h	-	-	-	-
48h	+	+	+	-
72h	++	++	+	-
96h	+++	+++	++	+/-

Note: + indicates pathology; - indicates no pathology.

2.3 多角体蛋白表达的免疫组化检测

注射感染后的幼虫经石蜡切片后,以多角体抗体为一抗,进行免疫组化实验,实验结果表明:幼虫被感染后 24h,所有组织都未检测到棕黄色的阳性信号(见彩版IV图 2, A、B、C),表明此时在组织中未见多角体蛋白的表达;感染后 48h 后,在大多数脂肪体细胞(见彩版IV图 2 D)、气管上皮细胞(见彩版IV图 2 E)、真皮组织(见彩版IV图 2 F)的细胞中可观测到阳性信号,表明多角体蛋白的表达。其中,脂肪细胞的阳性信号主要出现在细胞核中,此外,在血淋巴中也显示很强的阳性信号,但血细胞中仅有部分细胞呈阳性,在气管上皮和真皮组织中则在细胞核和细胞质中都见到阳性信号;感染后 72h,气管上皮细胞、脂肪体(见彩版IV图 2 G)和真皮细胞(见彩版IV图 2 I)的细胞核肿大,绝大部分细胞都显棕黄色,只有个别未显阳性,显棕色的血细胞(见彩版IV图 2 G)数量并未见增加;感染后 96h,在脂肪体(见彩版IV图 2 J)、气管(见彩版IV图 2 J)、真皮的上皮组织(见彩版IV图 2 L)几乎全部的细胞都显棕黄色阳性信号,多角体蛋白得到大量表达,血淋巴的感染与 72h 相似,没有大的变化(见彩版IV图 2 L);幼虫死亡后,虫体的组织开始液化,脂肪体、气管等组织结构完全被破坏(见彩版IV图 2 M),且整个组织都显示阳性信号,肌肉和中肠保持比较完整,未能检测到阳性信号(见彩版IV图 2 M、N),但在中肠上皮细胞的基底膜间隙有阳性信号(见彩版IV图 2 N),说明多角体蛋白在此组织中有表达,脂肪体细胞的阳性率在 24h、48h、72h、96h 及死后幼虫分别为 0%、62.4%、83.6%、91.0%、99%。

3 讨论

多角体病毒感染幼虫的过程一直是比较关注的热点,许多学者通过构建含标记基因(如 GFP, lacZ, GUS 等)的重组病毒通过口服或注射感染幼虫,在不同时间点取样,检测标记基因的不同组织中的表达情况,以推测病毒在幼虫中的感染历程^[5-9]。病毒在幼虫体内传播过程中,继发感染目前主要存在 3 种理论:BV 在血腔中循环而感染其他组织^[10];通过感染血细胞而感染其他组织^[11,12];通过气管系统或转运 BV 到气管系统的肌间而感染其他组织^[7]。

本文首次利用免疫组化的方法观察野生型 HaSNPV 出芽病毒粒子感染四龄幼虫的过程,选择了 HaSNPV 的多角体蛋白作为检测病毒复制的指标。多角体蛋白基因是 HaSNPV 的极晚期表达基

因,在体外培养细胞中,在感染后 24h 开始表达,48h 开始有多角体产生,感染晚期大量表达,其表达产物是感染晚期形成的包含体(多角体)的主要组分^[13,14]。本实验证明,在 HaSNPV BV 注射感染过程中,气管、脂肪体、表皮和血细胞是病毒感染的敏感组织,这几种组织在感染后 48h,同时检测到多角体蛋白的表达,说明这些组织的感染可能是在同一时间发生的,因此推测感染是通过 BV 在血腔中循环而感染其他组织;在随后的时间中,被感染的管、脂肪体、表皮细胞数目递增。Engelhard E K 等^[7]构建含 hsp70-LacZ 的重组 AcMNPV,注射 BV 感染四龄粉纹夜蛾幼虫,他们发现 40% 的被试幼虫注射后 20h 能同时在血细胞和微气管中看到 LacZ 的表达。Thomas E 等^[15]利用表达 GFP 基因的 AcMNPV 注射感染草地贪夜蛾幼虫,发现感染后 12-18h 可在脂肪体中看到绿色荧光,24h 在气管和表皮发现荧光,而只有 5% 的血细胞显荧光。而我们的实验中在 48h 才检测到病毒的感染,因为我们选用的多角体蛋白基因是极晚期基因,而 Engelhard 和 Thomas E 选用的标记基因是组成型表达的,我们的结果与之并不冲突;同时在本实验中,取样时间跨度较大而没能检测到最早出现多角体蛋白表达的组织,我们将在以后的实验中增加取样的时间点。

吕雅颂等^[16]构建在多角体启动子控制下的 GFP 基因标记的重组棉铃虫病毒,经口服三龄幼虫,在荧光下观测 GFP 的表达从而跟踪病毒感染进程。他们认为,HaSNPV 在进入中肠后,以两条路线进行感染:其一是在中肠复制、表达、装配成子代病毒粒子和多角体,即初级感染;其二,病毒感染的扩散除血淋巴之外,还有气管系统,病毒粒子通过真皮、中肠和脂肪体的气管系统感染其他组织,中肠和血淋巴只是病毒感染传播通道。本文采用的 BV 注射感染的方式,出芽病毒粒子直接进入血淋巴,没有通过中肠,实验结果显示,表达多角体蛋白的血细胞数目并未随感染时间而明显递增,也就是说病毒在血细胞中并未产生大量多角体,我们推测在注射感染的幼虫中,血淋巴是主要扩散通道,BV 通过血淋巴的循环而感染与其接触的气管、表皮及脂肪体组织,而不是病毒大量复制的场所。Trudeau D 等^[12]证明,用 AcMNPV 感染烟蚜夜蛾和美洲棉铃虫幼虫时,血细胞起核心作用,它携带病毒随血淋巴循环,并参与宿主的黑化作用。中肠围食膜是口服感染过程中幼虫抵制病毒入侵的一道很重要的屏障^[17],我们将在下一步实验中进一步研

究 HaSNPV 经口感染过程。

多角体蛋白基因中具有细胞核定位信号, 在细胞质中表达后将运输到细胞核中进行多角体包装^[18,19], 实验中, 我们在气管上皮、表皮等组织中都观察到多角体蛋白在细胞质和细胞核中的存在, 在脂肪组织中, 虽然阳性信号主要出现在细胞核中, 但可能是由于制片过程中脂肪细胞的大部分细胞质未固定下来而造成的假象, 实际上在图 2L 中可以看到在脂肪细胞的细胞质中的阳性信号。因此, 可以认为多角体蛋白表达之后在细胞质和细胞核中都同时存在, 但从信号的强弱可以判断多数蛋白位于细胞核中。实验中, 我们发现在所有样品中, 肌肉组织和中肠上皮组织都没有检测到多角体蛋白的表达信号, 这两种组织在注射感染中可能只被 BV 感染, 也可能是非敏感组织, Volkman 实验组^[10]曾利用 AcMNPV 的 P39 的多克隆抗体和 GP64 的单克隆进行免疫组化实验, 他们发现, 在肌肉组织中, 病毒只在肌纤维膜里发现。

在本实验中, 我们还通过传统的 H.E 染色法, 对幼虫的病理情况进行光学分析, 观察到不同时间点的组织病变情况组织病理结果与免疫组化结果基本一致, 但由于 H.E 染色只能揭示形态学上的病理特征, 需要细心的观察和比较专业的昆虫病理学基础才能辨别 NPV 引起的病变; 而免疫组化则从蛋白质分子水平揭示病毒在虫体内的感染状况, 直接以不同颜色显示病毒在幼虫组织中的感染复制过程, 阴性和阳性结果颜色区别明显, 具有较高的灵敏度和特异性, 是一种研究病毒感染机理的好方法。

致谢: 感谢华中科技大学同济医学院法医系周亦武教授, 邓伟年老师对石蜡切片, 免疫组化技术的指导和帮助。

参考文献:

- [1] 孙修炼, 张光裕. 棉铃虫核型多角体病毒四个分离株的比较研究[J]. 中国病毒学, 1994, 9: 309-318.
- [2] 张光裕. 我国棉铃虫病毒杀虫剂的研究开发和应用[J]. 长江流域资源与环境, 1994, 3: 1-6.
- [3] 孙修炼, 张光裕, 张忠信, 等. 中国棉铃虫核型多角体病毒不同基因型的虫体克隆[J]. 中国病毒学, 1998, 13: 83-88.
- [4] Thomas Boenisch. Handbook of Immunocytochemical Staining Methods 3rd Edition[M], CA, USA: DAKO Corporation, 2001. 26-33.
- [5] Barrett J W, Brownwright A J, Primavera M J, et al. Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insects by using the green fluorescence protein as a reporter[J]. J Virol, 1998, 72(4): 3377-3382.
- [6] LeDuc P R, Whiteley E M, Bao G, et al. Investigating the secretory pathway of the baculovirus-insect cell system using a secretory green fluorescent protein[J]. Biotechnol Prog, 2000, 16(5): 716-723.
- [7] Engelhard E K, Kam-Morgan L N, Washburn J O, et al. The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91: 3224-3227.
- [8] Knebel-Morsdorf D, Flipsen J T, Roncarati R, et al. Baculovirus infection of *Spodoptera exigua* larvae: lacZ expression driven by promoters of early genes pe38 and me53 in larval tissue[J]. J Gen Virol, 1996, 77 (Pt 5): 815-824.
- [9] Kirkpatrick B A, Washburn J O, Engelhard E K, et al. Primary infection of insect tracheae by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus[J]. Virology, 1994, 203: 184-186.
- [10] Keddie B A, Apone G W, Volkman L E. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host[J]. Science, 1989, 243: 1728-1730.
- [11] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263: 802-805.
- [12] Trudeau D, Washburn J O, Volkman L E. Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*[J]. J Virol, 2001, 75(2): 996-1003.
- [13] Rivkin H, Mor M, Chejanovsky N. Isolation, replication and polyhedrin gene sequence of an Israeli *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus[J]. Virus Genes, 1998, 17(1): 11-19.
- [14] Russell R L, Pearson M N, Rohmann G F. Immunoelectron microscopic examination of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* cells: time course and localization of major polyhedron-associated proteins[J]. J Gen Virol, 1991, 72 (Pt 2): 275-83.
- [15] Clarke T E, Clem R J. Lack of involvement of haemocytes in the establishment and spread of infection in *Spodoptera frugiperda* larvae infected with the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus by intrahaemocoelomic injection[J]. J Gen Virol, 2002, 83: 1565-1572.
- [16] 吕颂雅, 杨复华, 刘祖强, 等. gfp 基因标记的重组杆状病毒对棉铃虫的侵染历程[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17 (6): 743-750.
- [17] Adang M J, Spence K D. Surface morphology of peritrophic membrane formation in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*[J]. Cell Tissue Res, 1981, 218(1):141-147.
- [18] Jarvis D L, Bohlmeier D A, Garcia A Jr. Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedrin protein[J]. Virology, 1991, 185(2): 795-810.
- [19] Katsuma S, Deng D X, Zhou C L, et al. Identification of novel residues involved in nuclear localization of a baculovirus polyhedrin protein[J]. Virus Genes, 2000, 21(3): 233-240.

彩版 III

欧阳志荃, 等. 感染 HaSNPV 棉铃虫幼虫的组织病理和免疫组化研究(正文见第 603 页)

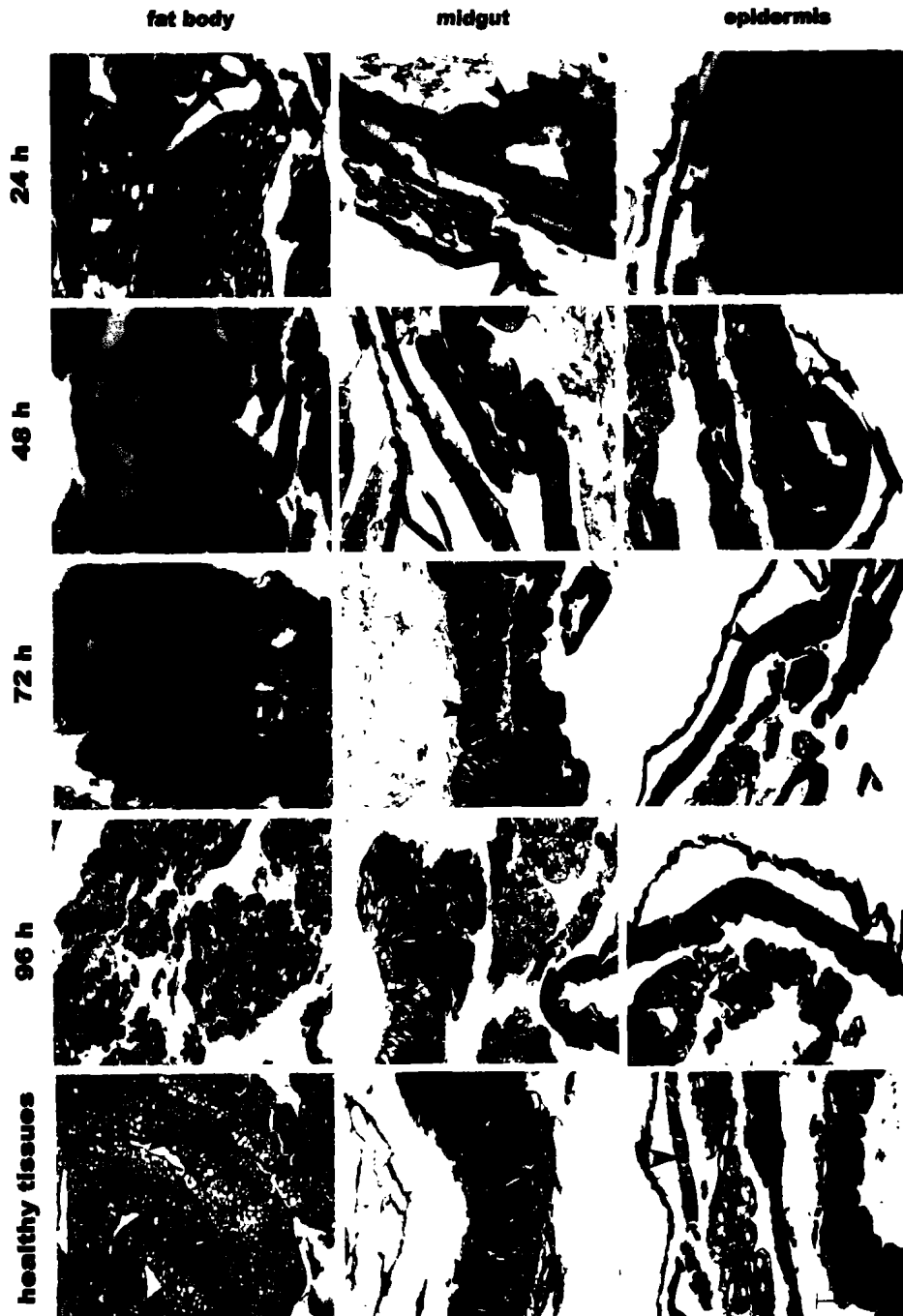


图 1 4 龄棉铃虫幼虫感染 HaSNPV 后不同组织的 H.E 染色结果

Fig.1 Haematoxylin-eosin staining of selected tissues of 4th instar *H. armigera* infected with wild-type HaSNPV and the mock infection at different time points. A, B, C, showed the larvae tissues infected by HaSNPV at 24 hpi; D, E, F, at 48 hpi; G, H, I at 72 hpi; J, K, L at 96 hpi; M, N, O mock infection of larvae(healthy larvae at 48 hour). All the pictures have the same magnification and the bar indicated 100 μ m. f, Fat body; e, Epidermis; t, Trachea; mg, Midgut; m, Muscle. Arrow indicate nucleus;

彩版 IV

欧阳志荃,等. 感染 HaSNPV 棉铃虫幼虫的组织病理和免疫组化研究(正文见第 603 页)

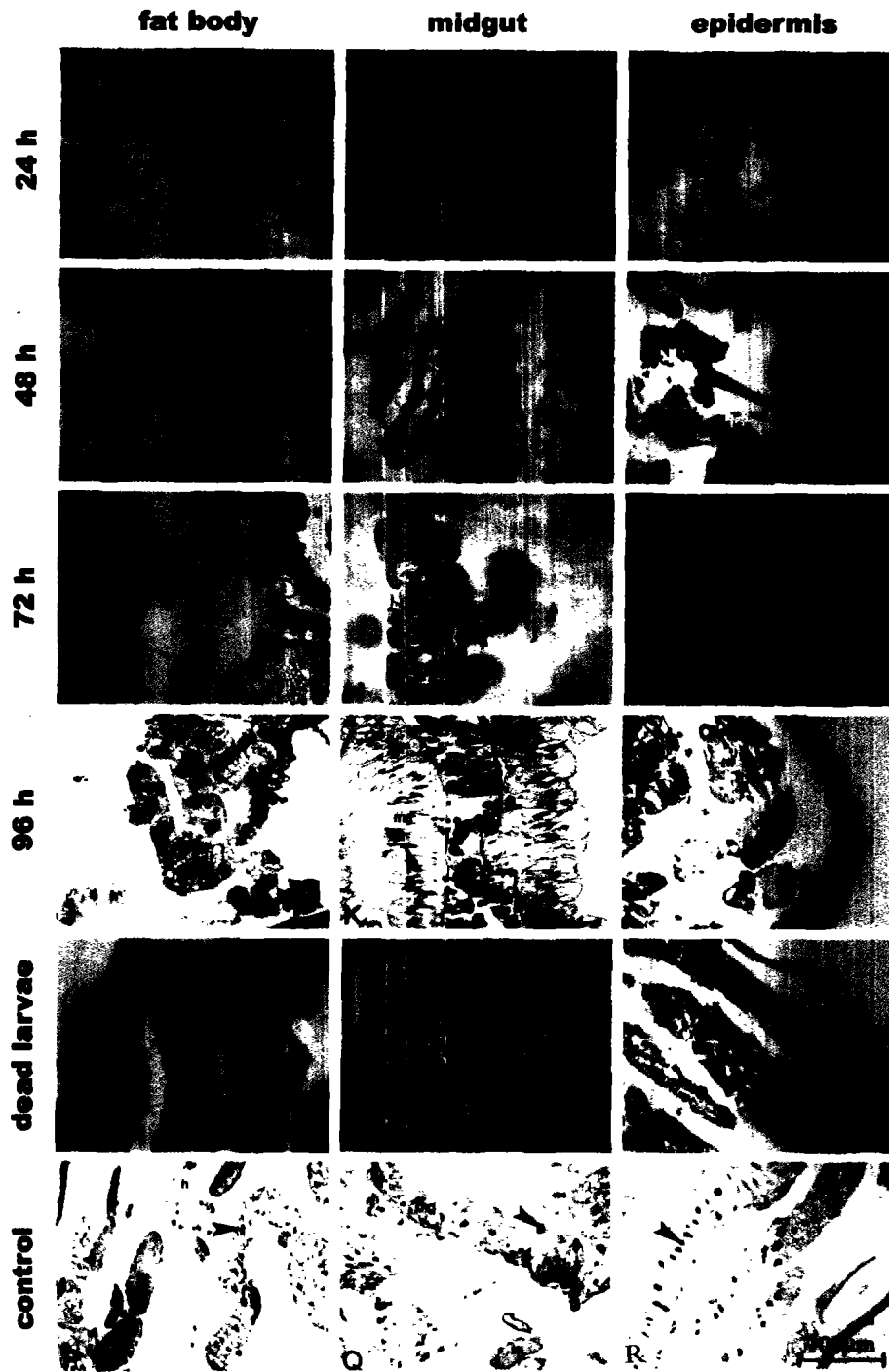


图 2 4 龄棉铃虫幼虫感染 HaSNPV 后不同组织的多角体蛋白免疫组化结果

Fig.2 Immunohistochemistry staining(DAB staining, Haematoxylin re-staining) of the tissues from 4th instar *H. armigera* larvae infected by HaSNPV at different time points post infection

A/B/C, showed the larvae tissues at 24hours post infection; D/E/F, 48hpi ; G/H/I, 72hpi; J/K/L, 96hpi; M/N/O, dead larvae; P, the healthy larvae tissues; Q, healthy larvae tissues without the treatment of the anti-polyhedrin in immunohistochemistry process; R, larvae infected by HaSNPV at 48hpi without the treatment of the anti-polyhedrin antibody in immunohistochemistry process. All the pictures have the same magnification and the bar indicated 100um. f, Fat body; e, Epidermis; t, Trachea; mg, Midgut; m, Muscle; h, Haemolymph. Arrow indicated nucleus.