

# AcMNPV P35 抑制 HaSNPV 诱导的 Tr-Hi5 细胞凋亡\*

南方, 宋建华, 王瑞青, 梁昌镛, 陈新文\*\*

(中国科学院武汉病毒研究所 分子病毒学重点实验室, 湖北武汉 430071)

## AcMNPV P35 Inhibit Apoptosis Induced by HaSNPV in Tr-Hi5 Cell

NAN Fang, SONG Jian-hua, WANG Rui-qing, LIANG Chang-yong, CHEN Xin-wen\*\*

(Key Lab of Molecular Virology Wuhan, Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) blocked the Tr-Hi5 cell apoptosis stimulated by *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaSNPV). Furthermore AcMNPV could rescue HaSNPV replication in Tr-Hi5 cell and produced infective virus. This means that HaSNPV extend the host range with AcMNPV help. The transient expression assay indicated that Ac-p35 could significantly inhibit the Tr-Hi5 apoptosis induced by HaSNPV. A recombinant HaSNPV which overexpression of p35: vHap35, was constructed to further analyse P35 function. vHap35 was used to infect Tr-Hi5 as we expected the Tr-Hi5 cell did not undergo apoptosis. Anyhow, no infective virus BV was detected. Under the electronic microscope viral particles were observed, which probably are the ODVs. The results demonstrate that p35 is functional as both apoptosis inhibitor and host range factor.

**Key words:** Apoptosis, *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, Ac-p35, Tr-Hi5

**摘要:** 苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV) 能够抑制棉铃虫核多角体病毒 (*Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus, HaSNPV) 诱导的 Tr-Hi5 细胞凋亡, 并能辅助 HaSNPV 在 Tr-Hi5 细胞中复制, 产生具有感染能力的子代病毒。瞬时表达实验证明, 在 Tr-Hi5 细胞中, p35 具有明显抑制凋亡的能力, 但是不能辅助 HaSNPV 在 Tr-Hi5 细胞中的复制; 进一步构建超表达 p35 的重组病毒: vHap35, 发现 vHap35 能够抑制 Tr-Hi5 细胞凋亡, 但是不能产生具有感染力的病毒粒子。电镜观察发现感染重组病毒的部分细胞中存在单粒包埋的病毒粒子 (ODV)。

**关键词:** 细胞凋亡; 苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒; 棉铃虫核多角体病毒; Ac-p35, Tr-Hi5

**中图分类号:** S 852.65      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1003-5125(2005)02-0173-05

细胞凋亡或者称细胞程序性死亡是一种受遗传调控的细胞自杀的过程, 在生物体正常发育, 机体组织新陈代谢以及疾病的发展过程中都起到了十分重要的作用<sup>[1,2]</sup>。细胞凋亡同时也是宿主细胞对抗病毒入侵的一种重要的防护策略<sup>[3]</sup>。杆状病毒是一类寄生于节肢动物的杆状的病原微生物, 宿主大多为昆虫和某些甲壳类动物。由于其特有的生物学特性作为一种高效的生物杀虫剂及真核表达载体而得到广泛的应用。杆状病毒是第一个发现含有凋亡抑制

蛋白的病毒, 所以它为研究宿主对病毒入侵的凋亡反应提供了非常理想的研究系统<sup>[3,4]</sup>。

在杆状病毒研究中发现大量病毒能诱导异源昆虫细胞凋亡。Kobayashi 等用 7 种杆状病毒感染 Ld635 Y 细胞, 发现有 5 种病毒都能诱导凋亡<sup>[5]</sup>。在虫体水平上, 也观察到病毒诱导的细胞凋亡<sup>[6]</sup>。另一方面, 病毒在进化过程中产生了一套机制来抵抗宿主的这种通过自杀抵抗病毒的方式。AcMNPV p35 基因是第一个发现的能够诱导和抑制宿主

收稿日期: 2004-08-29, 修回日期: 2004-11-01

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (30325002); 国家 973 项目 (2003CB114202)

作者简介: 南方 (1978 - ), 女, 湖北浠水籍, 硕士研究生, 研究方向为生物化学和分子生物学。

\*\* 通讯作者: 陈新文 (1964 - ), 男, 湖北省籍, 研究员, 博士生导师, 研究方向为分子病毒学及基因工程。

Corresponding author. E-mail: chenxw@pentium.whiov.ac.cn

细胞凋亡的病毒基因<sup>[7]</sup>。*p35* 基因可以在线虫、果蝇、哺乳动物等多种生物中抑制细胞凋亡<sup>[8,9]</sup>,其分子机制是能够直接和细胞凋亡的执行人 Caspase 相互作用,目前已经发现当使用纯化蛋白时,它能抑制 caspase 1, 2, 3, 4, 7, 8 a 和 10<sup>[10,11]</sup> 由于这些特征,*p35* 被看作是广谱的 caspase 抑制因子<sup>[12]</sup>。缺失 *p35* 的 AcMNPV 感染秋黏虫幼虫,病毒的感染、复制和传播能力明显下降。可见细胞凋亡抑制因子在杆状病毒的宿主决定中有重要的作用<sup>[13]</sup>。

杆状病毒由于其高效性和安全性,被广泛的作用于生物杀虫剂<sup>[14]</sup>,棉铃虫核多角体病毒(HaSNPV)就是一株成功的商品化的生物杀虫剂,但是存在着杀虫谱狭窄的缺点。在采用共感染方法扩大杀虫范围的重组病毒的研究过程中,我们发现苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(AcMNPV)能够抑制由棉铃虫核多角体病毒诱导的甜菜夜蛾 Tn-Hi5 细胞凋亡,并且能够拯救其复制,产生具有感染性的子代病毒。瞬时表达实验证明,*p35* 基因能够有效的抑制由 HaSNPV 诱导的 Tn-Hi5 细胞凋亡;进一步通过 Bac-to-Bac 系统构建分别超表达 *p35* 基因的重组 HaSNPV 病毒,希望获得宿主范围扩大了的重组病毒。结果发现含有 *p35* 的重组病毒可以抑制 Tn-Hi5 细胞凋亡,电镜观察发现感染重组病毒的部分细胞中存在单粒包埋的病毒粒子(ODV),但不能产生具有感染性的 BV。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和大肠杆菌

DH5 和 DH10B 均由本室保存。真核表达载体 pIZ/V5 和重组病毒转移载体 pFastBacDual 购自 Invitrogen 公司。pFBG,是 pFastBacDua 在 p10 启动子下插入了 *egfp* 基因,为本室王瑞青构建。pIGFP 为改造过的 pIZ/V5 载体,含有在果蝇热休克启动子控制下的 *egfp* 基因。

### 1.2 酶和试剂

限制性核酸内切酶、修饰酶,核酸分子量 marker DL2000 等及其配套缓冲溶液均购自 TaKaRa 公司;T4 连接酶购自 NEB 公司;MLV,oligoT 购自 Promega 公司;RNA 酶抑制剂购自 Biostar 公司;核酸分子量 marker 为噬菌体 DNA 经 *Hind*、*Bam*H、*Eco*R 酶切制备。常用化学试剂为国产或进口分装。质粒纯化和胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司和 V-gene 公司,凋亡检测试剂盒,HOECHST 检测试剂盒购自碧云天公司。抗生素购自华美生物公司。Zeocin<sup>TM</sup> 购自 Invitrogen 公司,PCR 引物由

上海博亚生物技术有限公司合成

### 1.3 昆虫病毒和细胞系

HaSPNV、HaCXW1<sup>[15]</sup>、HaHZ8 Bacmid<sup>[16]</sup> 和 AcMNPV,HzAM1 细胞,Tn-Hi5 细胞,Sf21 细胞均由本室保存。细胞于 28℃ 培养,培养液为 Grace's 培养基加 10%胎牛血清(Gibico 公司)。

### 1.4 病毒制备和滴度测定

HaSPNV、HaCXW1 和 AcMNPV 病毒多角体分别感染 3 龄棉铃虫幼虫和甜菜夜蛾幼虫,感染 3~4d 后,收集血淋巴,经 0.45μm 的滤器过滤,血淋巴分别感染 HzAM1 和 Sf21 细胞增殖病毒,收集细胞上清,离心后去沉淀,通过终点稀释法测定病毒滴度,-80℃ 和 4℃ 避光保存备用。

### 1.5 病毒诱导细胞凋亡

将  $2 \times 10^5$  个细胞在直径 35mm 小皿贴壁过夜或  $1 \times 10^6$  细胞贴壁 2h,用适量出芽病毒悬液吸附 1.5h,用无血清培养基洗两次,补加 2mL 新鲜培养基。此时计为病毒感染后 0h。用不同的 MOI 感染细胞,细胞凋亡出现的时间和凋亡率不同,MOI=2 和 MOI=5 没有显著区别,所以选用 MOI=2。

### 1.6 DNA ladder 的提取

收集小皿中的细胞,PBS 洗 2 次,用 100 μL 消化缓冲液重悬,8 000r/m 离心 5 min,取上清加入 SDS 以及 RNaseA,56℃ 处理 2h,随后加入 proteinase K,37℃ 处理 2h。加入 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠和 3 倍体积冷乙醇沉淀,1%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.7 凋亡检测

按照试剂盒说明书操作。诱导凋亡后的细胞先用固定液固定,室温 10min 或 4℃ 过夜,吸去固定液,PBS 洗两次,吸去 PBS,加入染色液,避光染色 10min。在荧光显微镜下使用激发波长为 364nm 观察。

### 1.8 载体构建

根据 GenBank 中 AcMNPV 基因组序列设计引物,以提纯的 AcMNPV 基因组 DNA 作为模板通过 PCR 方法得到 Ac-*p35* 基因,引物 p35F:5'-AAGCTTATGTGTGTAATTTTCCGGTAA-3',引物 p35R:5'-ATAATGACAA GCAATGACAAA-3'。PCR 条件和步骤:95℃ 变性 5min;95℃ 变性 1min,57℃ 复性 1min,72℃ 延伸 1min,25 个循环;72℃ 延伸 5min,4℃ 保持 10min。

将纯化后的 *p35* 基因片段和 pGEMTeasy 载体,连接转化 DH5 菌株,通过蓝白斑筛选阳性克隆,提取质粒经 DNA 酶切鉴定,命名为 pT-p35,送

至测序公司测序鉴定。

用 *EcoR* 将 *p35* 基因从 *pT-p35* 上切下,连接上用 *EcoR* 切并用 CIAP 处理过的 *pIGFP* 和 *pFB-G* 载体上,转化 DH5 菌株,通过抗性筛选阳性克隆,提取质粒 DNA 酶切鉴定。分别命名为 *pIGp35* 和 *pFBGp35*。

取 1  $\mu$ L *pFBGp35* 质粒 DNA 转化含有 Hz8 Bacmid 和辅助质粒的 DH10B 感受态细胞,通过蓝白斑筛选阳性克隆,PCR 鉴定正确后,用 Bacmid DNA 转化 DH10B 感受态,选择在四环霉素抗性中不能生长的阳性克隆,提取 Bacmid DNA 转染 HzAM1 细胞获得重组病毒。

### 1.9 DNA 转染昆虫细胞

在直径 35mm 的培养皿中接种  $1 \times 10^6$  的 HzAM1 细胞,用不含血清的培养液洗涤细胞 2 次,弃去培养基;将 1-2 $\mu$ g DNA 与 10 $\mu$ L cellfectin 分别用无血清的培养液稀释至 50 $\mu$ L,5min 后将 DNA 加入稀释后的 cellfectin 中,每隔 5min 轻轻混匀一次,45min 后轻轻加入 900 $\mu$ L 不含血清的培养液培养基,混匀。在培养皿中加入含有转染混合物的培养基,25 温箱培养;6 h 后用含 10% 血清的 Grace 培养基替换原有的培养基。

### 1.10 RT-PCR

收集直径 35mm 小皿中的细胞,加入 1mL Trizol (Invitrogen 公司)后,提取细胞总 RNA,用 OligodT 引物进行反转录,反转录完毕后取部分产物进行特异性 PCR,电泳检测结果。

### 1.11 电子显微镜的观察

重组病毒感染 Tr-Hi5 细胞,感染后 120h 进行固定、切片,电子显微镜观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 AcMNPV 抑制 HaSNPV 诱导的 Tr-Hi5 细胞凋亡

用 HaSNPV 的出芽病毒感染 Tr-Hi5 细胞,感染后细胞形态发生改变:细胞变圆,停止生长,感染 48h 后,细胞边缘逐渐出现小泡,感染 72h 出现明显的凋亡,高峰在 96h,最终形成凋亡小体(图 1A)。与 Dai 等的报道相似<sup>[7]</sup>,和 AcMNPV *p35* 缺失诱导 Sf 细胞凋亡相比,凋亡发生在感染的极晚期。

用相同 MOI 的 AcMNPV 和 HaSNPV 共感染 Tr-Hi5 细胞,细胞不发生凋亡并能产生多角体(图 1B)。

### 2.2 Hoechst33258 细胞染色

为了进一步确认 AcMNPV 能阻止 HaSNPV

所诱导的 Tr-Hi5 细胞凋亡,用 Hoechst33258 细胞凋亡检测试剂盒检测感染不同时相的病毒感染的 Tr-Hi5 细胞,发现在感染晚期,HaSNPV 感染的细胞细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染(图 2A),而 AcMNPV 和 HaSNPV 共感染细胞呈均一着色(图 2B)。结果进一步说明 AcMNPV 可以抑制由 HaSNPV 所诱导的 Tr-Hi5 细胞凋亡。

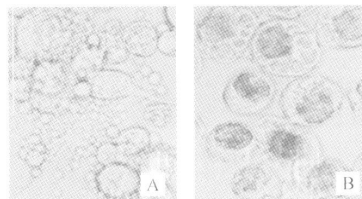


图 1 HaSNPV 和 AcMNPV 感染 Tr-Hi5 细胞

Fig. 1 HaSNPV infected Tr-Hi5 cell individually and co-infect with AcMNPV

A, HaSNPV induce apoptosis in Tr-Hi5 cell; B, Co-infection AcMNPV and HaSNPV inhibit apoptosis and rescue the replication of HaSNPV in Tr-Hi5 cell.

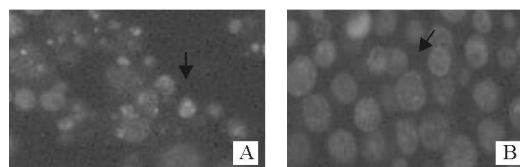


图 2 Hoechst 检测细胞凋亡

Fig. 2 Detection of apoptosis by Hoechst staining

A, Tr-Hi5 cell infected by HaSNPV, arrow shows desely-stained apoptotic cell; B, Tr-Hi5 cell infected by HaSNPV + AcMNPV, arrows show loosely-stained nonapoptotic cell.

### 2.3 DNA ladder 分析

发生细胞凋亡的细胞另一个典型特征是基因组 DNA 降解,形成 DNA ladder。在感染后 72h 提取 Tr-Hi5 细胞基因组 DNA,能看到明显的 DNA ladder;而当用 AcMNPV 与 HaSNPV 共感染 Tr-Hi5 细胞,感染晚期不出现 DNA ladder(图 3)。说明凋亡被完全抑制。

### 2.4 AcMNPV 拯救 HaSNPV 的增殖

HaSNPV 和 AcMNPV 共同感染 Tr-Hi5 细胞,感染后细胞不形成凋亡小体,没有明显的细胞凋亡现象,在感染后 48h 能看见明显的多角体产生,为了检测 AcMNPV 是否能拯救 HaSNPV 在 Tr-Hi5 细胞中的增殖,选择了具有荧光标记的重组病毒 HaCXW1,与 AcMNPV 共同感染 Tr-Hi5 细胞,感染后 48h 在荧光显微镜下可见细胞表达绿色荧光(图 4)。而 HaCXW1 感染和 HaSNPV 一样导致高水平的细胞凋亡(结果未显示)。为了进一步证明 AcMNPV 能拯救 HaSNPV 在 Tr-Hi5 细胞中的产生子代病毒,取共感染上清感染 HzAMV1 细胞,均

能产生多角体,而感染 Sf21 细胞无荧光(表 1)。证明 AcMNPV 能够拯救 HaSNPV 在 Tr-Hi5 细胞中的增殖。

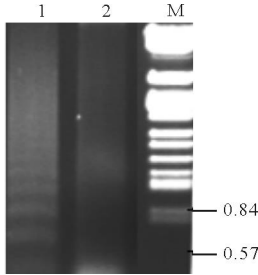


图 3 DNA Ladder 分析

Fig. 3 Analysis of DNA of Tr-Hi5 cell infected

1, HaSNPV; 2, HaSNPV + AcMNPV. Typical DNA ladder in lane 1 and no ladder in lane 2. M, DNA + EcoR I + HindIII + BamH I.

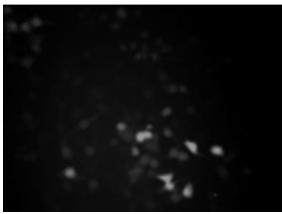


图 4 HaCXW1 和 AcMNPV 共感染 Tr-Hi5 细胞

Fig. 4 Tr-Hi5 cell coinfecting by HaCXW1 + AcMNPV. Green fluorescence shows that HaCXW1 can replicate in Tr-Hi5 cell.

2.5 p35 基因克隆及载体构建

利用引物 p35F 和 p35R 以 AcMNPV 基因组为模板合成 p35 基因并克隆到连接到 pGEM-Teasy

载体获得阳性克隆 pT-p35,经序列测定正确。然后以 EcoR 从 pT-p35 上切下 p35 基因克隆到以相同酶切的瞬时表达载体 pIGFP 获得 pIGp35,酶切鉴定正确。同时 p35 基因克隆到 pFBG 的 EcoR 位点获得构建重组病毒的转移载体 pFBGp35,酶切鉴定正确。

表 1 AcMNPV 拯救 HaSNPV 在 Tr-Hi5 细胞中的复制 Table1 AcMNPV rescued the replication of HaCXW1 in Tr-Hi5 cell

Table with 4 columns: HaCXW1, Hi5, HzAM1, Sf21. Rows show results for HaCXW1, HaCXW1 + AcMNPV, and AcMNPV.

Virus first infect Tr-Hi5 cell, then the supernatant was applied to HzAM1/ Sf21 cell. Green fluorescence/ polyhedron/ apoptosis. -:negative, +:positive, ND: not detect.

2.6 p35 基因抑制了由 HaSNPV 诱导的 Tr-Hi5 细胞凋亡

2μg 纯化的 pIGp35 质粒转染 HaSNPV BV (2 MOI) 感染 24h 后的 Tr-Hi5 细胞。转染后 24h, 48h, 72h 分别观察细胞的生长状况。与未转染的细胞相比, p35 能够抑制由 HaSNPV 诱导的 Tr-Hi5 细胞凋亡,但是未能看见多角体产生(图 5A、B),说明 p35 单独不能拯救 HaSNPV 的完整复制。

2.7 重组病毒 vHap35 的构建

为了获得大量表达 P35 的病毒,并进一步分析 P35 是否能帮助病毒复制,利用转移载体 pFBGp35 转化含有 HaSNPV Bacmid ( Ha Hz8) 的大肠杆菌构

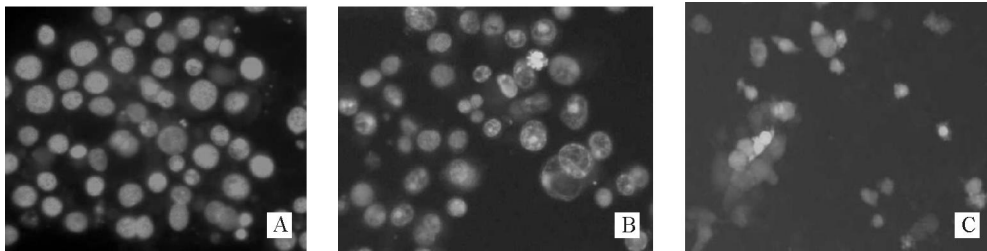


图 5 p35 瞬时表达抑制了由 HaSNPV 诱导的 Tr-Hi5 细胞凋亡

Fig. 5 Transient expression of p35 blocked apoptosis induced by HaSNPV

Tr-Hi5 cell was infected by HaSNPV (A) and superinfected by HaSNPV and pIGp35 (B, C). B showed significant decrease in apoptosis, C shows the rate of transfection of pIGp35.

建了能超表达目的基因的重组病毒 vHap35 Bacmid。以 M13 下游引物和 p35 上游引物对转座得到的 Bacmid DNA 进行 PCR 鉴定,得到 1.5kb 产物,说明转座成功。HindIII 酶切分析表明和亲本的 HaHz8 Bacmid 相比, vHap35 少了一条 9.5kb 的带。多了一条 11kb 的带(图 6)。综合以上结果证明重组病毒构建成功。用 Bacmid DNA 转染 HzAM1 细胞获得重组病毒 vHap35 BV。

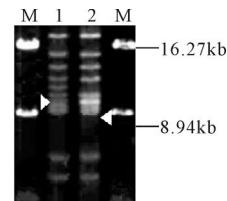


图 6 酶切鉴定重组病毒

Fig. 6 Detection of recombinant virus by Hind Lane 1, Hap35; 2, Ha8. Arrows show different bands. p35 and egfp genes were cut down at the sme time, but too small to see(data not shown).

## 2.8 重组病毒 vHap35 的感染特性

以 2MOI 的病毒感染 Tr-Hi5 细胞,感染 48h 后,细胞变圆,与健康细胞相比,停止生长,表现出感染症状,且在荧光显微镜下可见绿色荧光,感染 96h 后,凋亡细胞增加,荧光细胞增加,说明重组病毒可以在 Tr-Hi5 细胞中表达其晚期蛋白,病毒 DNA 可以在 Tr-Hi5 细胞中复制。我们通过 RT-PCR 检测,得到 980bp 的阳性带,说明 Ac-p35 基因在 Tr-Hi5 细胞中表达(图 7),进一步说明了这个问题。在荧光显微镜下观察,vHap35 感染的 Tr-Hi5 细胞,表达荧光蛋白的细胞没有出现凋亡小体,但少数

分没有荧光的细胞仍然出现凋亡(图 8B、C)。可能是由于其所用的启动子为晚期启动子,从而降低了其凋亡抑制效率。

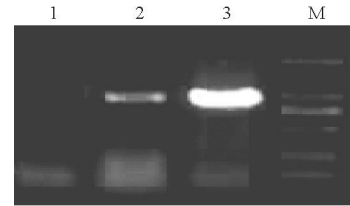


图 7 RT-PCR 检测 p35 在 Tr-Hi5 细胞中的表达  
Fig. 7 Detection of expression of p35 in Tr-Hi5 cell  
Lane 1, negative control; 2, RT product; 3, Positive control; M, Marker.

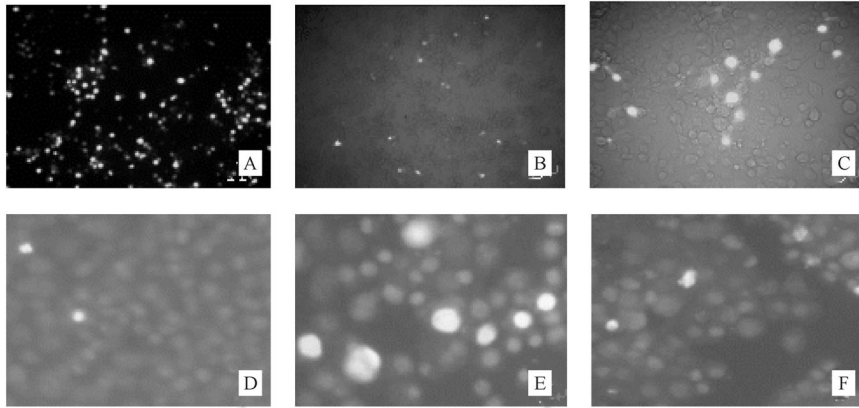


图 8 重组病毒 vHap35 的感染特性

Fig. 8 Infectious characters of vHap35

vHap35 infected HzAM1 cell (A), Tr-Hi5 cell 48h pi (B) and Tr-Hi5 cell 96h pi (C). Green fluorescence shows that virus DNA can replicate in Tr-Hi5 cell. Apoptosis detection by Hoechst staining, D, mock infect; E, HaSNPV; F, vHap35. Dark blue show nonapoptotic cells, light blue show apoptotic cells and red show dead cells. The rate of apoptosis of Tr-Hi5 cell infected by vHap35 significant decrease compared with HaSNPV.

进一步用 Hoechst 和 PI 染色法检测细胞凋亡。并计算凋亡比例。和 HaSNPV G4 株(78%)相比,vHap35(19%)表现出了明显的抑制凋亡的作用。

为了检测重组病毒能否在 Hi-5 细胞中进行完整的复制,我们分别用所获得的细胞上清再感染 HzAm1 细胞,但感染不成功,即不能产生完整的感染性的 BV 病毒粒子。利用超薄切片,电镜观察进一步研究重组病毒是否能在 Tr-Hi5 细胞中复制。

## 2.9 重组病毒 vHap35 在 Tr-Hi5 细胞中的复制

vHap35BV 以 MOI 2 感染 Tr-Hi5 细胞,切片电镜观察。结果发现在感染的晚期(感染后第 4d)能观察到细胞核中有明显的病毒发生基质,说明病毒 DNA 能在细胞中复制,在感染的极晚期(感染后 5d),在部分细胞中我们能观察到完整的病毒粒子,病毒粒子为单粒包埋型,具有完整的膜结构,应该为 ODV 而不是 BV(图 9B)。部分细胞能产生完整的病毒颗粒,与我们只观察到部分细胞具有 GFP 绿色荧光的结果吻合。Tr-Hi5 在感染的第 5 天已全部凋亡。

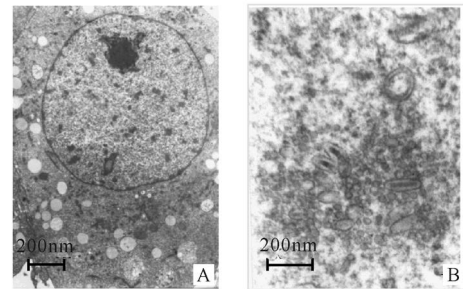


图 9 重组病毒感染 Tr-Hi5 细胞 5d 后电镜照片

Fig. 9 Electric microscope photos of Tr-Hi5 cells  
A, healthy cell; B, cell infected by vHap35.

## 3 讨论

HaSNPV 是一株成功的商品化的生物杀虫剂,但是受宿主范围狭小的限制。AMNPV 和 HaSNPV 共感染 Tr-Hi5 细胞能使后者在非允许细胞系中复制,并能产生具有感染力的子代病毒,为我们扩大其宿主范围提供了依据。已报道的杆状病毒宿主决定因子主要有 Helicase<sup>[17]</sup> 和 HRF<sup>[18]</sup>,而 P35

除能抑制细胞凋亡外,也参与辅助病毒在宿主细胞中的复制<sup>[19]</sup>。

在本实验中,我们首先通过瞬时表达发现 P35 能抑制细胞凋亡,但是不能单独拯救 HaSNPV 的完整复制,这与 Dai 等瞬时表达粉纹夜蛾核多角体病毒 TnMNPV 的 p35 基因能够抑制 HaSNPV 在 Tn-Hi5 细胞中的凋亡一致<sup>[20]</sup>。随后我们通过 Bacto-Bac 系统成功的构建了含有 AcMNPV p35 基因的重组 HaSNPV 病毒,在感染 Tn-Hi5 细胞时不能完全抑制细胞凋亡,这可能是由于所用的启动子为晚期启动子有关。AcMNPV 还存在属于凋亡抑制蛋白家族的 *iap1* 和 *iap2* 基因,而已有报道表明 Cp-IAP5 具有刺激有凋亡抑制功能的 Cp-IAP3 执行其功能的作用<sup>[21]</sup>。AcMNPV *iap1* 和 *iap2* 是否具有这样的功能尚有待实验证明。

vHap35 感染 Tn-Hi5 细胞虽然不能产生具有感染性的 BV,但超薄切片分析发现在感染的晚期 vHap35 能在 Tn-Hi5 细胞中产生病毒(ODV),尽管产生的病毒的活性有待进一步分析,但仍说明 P35 拯救了 HaSNPV 在 Tn-Hi5 细胞中的复制,表现出决定宿主范围的功能。有研究报道无法在 Tn-368 细胞中得到缺失 p35、*iap1* 和 *iap2* 的病毒<sup>[5]</sup>,说明 *iap* 基因也可能参与宿主决定范围。

## 参考文献

- [1] Blissard G W. Baculovirus-insect cell interactions [J]. Cytotechnology, 1996, 20:73-93.
- [2] Gozani O, Boyce M, Yoo L, *et al.* Life and death in paradise [J]. Nat Cell Biol, 2002, 4:E159-162
- [3] Krakauer D C, Payne R J. The evolution of virus-induced apoptosis [J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1997, 264:1757-1762.
- [4] Kamita S G, Majima K, and Maeda S. Identification and characterization of the p35 gene of Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis [J]. J Virol, 1993, 67:455-463.
- [5] Ishikawa H, Ikeda M, Yanagimoto K, *et al.* Lavina-Caoili, and M. Kobayashi. Induction of apoptosis in an insect cell line, IPLB-Ld652 Y, infected with nucleopolyhedroviruses [J]. J Gen Virol, 2003, 84:705-714.
- [6] Clarke T E, and Clem R J. In vivo induction of apoptosis correlating with reduced infectivity during baculovirus infection [J]. J Virol, 2003, 77:2227-2232.
- [7] Clem R J, Fechheimer M, Miller L K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells [J]. Science, 1991, 254:1388-1390.
- [8] del Pozo O, Lam E. Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N gene-mediated disease resistance response to Tobacco mosaic virus [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2003, 16:485-494
- [9] Sugimoto A, Friesen P D, Rothman J H. Baculovirus p35 prevents developmentally programmed cell death and rescues a ced-9 mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Embo J, 1994, 13:2023-2028.
- [10] Ahmad M, Srinivasula S. M, Wang L, *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]. J Biol Chem, 1997, 272:1421-1424.
- [11] Argaud O, Croizier L, Lopez-Ferber M, *et al.* Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae [J]. J Gen Virol, 1998, 79 ( Pt 4):931-935.
- [12] Zhuo M, Yu F R, Xu D H, *et al.* Baculovirus p35 gene greatly enhances PC12 cells resistance against oxidative stress [J]. J Neuro Sci, 2003, 216:135-141.
- [13] Clarke T E, Clem R J. Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis [J]. Int Rev Immunol, 2003, 22:401-424.
- [14] Miller L K. Baculovirus interaction with host apoptotic pathways [J]. J Cell Physiol, 1997, 173:178-182.
- [15] Chen X, Sun X, Hu Z, *et al.* Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus as an improved pesticide [J]. J Invertebr Pathol, 2000, 76:140-146.
- [16] Wang H, Deng F, Pijlman G P, *et al.* Cloning of biologically active genomes from a *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolate by using a bacterial artificial chromosome [J]. Virus Res, 2003, 97:57-63.
- [17] Argaud O, Croizier L, Lopez-Ferber M, *et al.* Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae [J]. J Gen Virol, 1998, 79 ( Pt 4):931-935.
- [18] Thiem S M, Du X, Quentgen M E, *et al.* Identification of baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line [J]. J Virol, 1996, 70:2221-2229.
- [19] Hershberger P A, LaCount D J, Friesen P D. The apoptotic suppressor P35 is required early during baculovirus replication and is targeted to the cytosol of infected cells [J]. J Virol, 1994, 68:3467-3477.
- [20] Dai X, Shi X, Pang Y, *et al.* Prevention of baculovirus-induced apoptosis of BTF Tn-5B1-4 (Hi5) cells by the p35 gene of *Trichoplusia ni* multicapsid nucleopolyhedrovirus [J]. J Gen Virol, 1999, 80 ( Pt 7):1841-1845.
- [21] Vilaplana L, O'Reilly D R. Functional interaction between *Cydia pomonella* granulovirus IAP proteins [J]. Virus Res, 2003, 92:107-111.