

网络出版时间:2014-01-02 16:06

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.02.066

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.02.066.html

BmNPV 对家蚕 BmN 细胞周期及周期蛋白基因 表达水平的影响

刘丽华¹, 沈卫德^{2,3}, 李 兵^{2,3}, 王文兵⁴

(1 通化师范学院 生物系, 吉林 通化 134000; 2 苏州大学 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123;

3 现代丝绸国家工程实验室, 江苏 苏州 215123; 4 江苏大学 生命科学研究院, 江苏 镇江 212001)

[摘 要] **【目的】**研究家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* Nucleopolyhedroviruses, BmNPV)对家蚕卵巢巢细胞系(BmN)细胞周期及细胞周期蛋白基因转录水平的影响。**【方法】**用 BmNPV 感染家蚕 BmN 细胞,分别在病毒感染后的不同时间(12, 24, 36, 48 h),应用实时荧光定量 PCR 方法检测细胞周期蛋白基因 *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinE* 的表达情况,用流式细胞仪检测细胞周期的变化。**【结果】**BmNPV 感染 24 h 后, BmN 细胞出现明显感染症状,变为圆形; 48 h 后细胞核内出现多角体。随着感染时间的延长, *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinE* 基因表达量均下降,分别在感染 12, 24, 36 h 后,表达量降低为 0。流式细胞仪检测结果显示,在 BmNPV 感染后 24 h 左右,抑制于 G2/M 期的 BmN 细胞达到 68%。**【结论】**BmNPV 感染家蚕 BmN 细胞后,导致 *CyclinB*、*CyclinE* 基因表达量降低,对 *CyclinA* 基因表达量的影响较小;同时 BmNPV 感染可以将 BmN 细胞发育抑制于 G2/M 期。

[关键词] BmNPV; *Cyclin* 基因; 细胞周期

[中图分类号] S884.5⁺1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)02-0041-05

Effect of BmNPV on BmN cell cycle and expression level of *Cyclin* in silkworm

LIU Li-hua¹, SHEN Wei-de^{2,3}, LI Bing^{2,3}, WANG Wen-bing⁴

(1 Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134000, China;

2 School of Basic Medicine and Biological Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China;

3 National Engineering Laboratory for Modern Silk, Suzhou, Jiangsu 215123, China;

4 Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

Abstract: **【Objective】**This study aimed to study the effect of BmNPV (*Bombyx mori* Nucleopolyhedroviruses) on the cell cycle and expression level of *Cyclin* in silkworm BmN cell line. **【Method】**BmN cell was infected with BmNPV, and the transcription levels of *CyclinA*, *CyclinB* and *CyclinE* genes were detected by QRT-PCR at different times (12, 24, 36, and 48 h). Flow cytometer was used to detect the change of cell cycle. **【Result】**BmN cells showed obvious infection symptoms 24 h after infection and the shape of cells changed to circle. Polyhedrosis appeared in the nucleus 48 h after infection. As the increase of time after viral infection, the expression levels of *CyclinA*, *CyclinB* and *CyclinE* decreased. The expression levels of *CyclinA*, *CyclinB*, *CyclinE* reduced to zero at 12, 24 and 36 h, respectively. Flow cytometer results showed that 68% cells were inhibited at the G2/M phase 24 h after infection. **【Conclusions】**Infection of

[收稿日期] 2013-02-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31072086); 吉林省科技厅项目(20130101100JC); 吉林省教育厅项目(2013493)

[作者简介] 刘丽华(1972—), 女, 吉林通化人, 副教授, 博士, 主要从事动物资源与功能基因组研究。E-mail: liulihua209@163.com

[通信作者] 沈卫德(1951—), 男, 江苏苏州人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物资源与功能基因组研究。

E-mail: shenwd@suda.edu.cn

BmNPV reduced the expression levels of *Cyclin*. The effect on *CyclinA* was less than that on *CyclinB* and *CyclinE*. Infection of BmNPV inhibited BmN cells at G2/M phase.

Key words: BmNPV; *Cyclin* gene; cell cycle

家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* Nucleopolyhedroviruses, BmNPV)属于杆状病毒,可经口或创伤感染家蚕,引起家蚕脓病。近年来的研究表明,作为外源寄生生物的病毒入侵宿主细胞后,在自身复制之前,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^[1]。许多病毒可以干扰宿主细胞周期,如细小病毒、多瘤病毒、腺病毒等,且不同的病毒采取策略不同,如有的通过刺激静止细胞阻碍细胞周期进程,有的阻碍增生细胞的细胞周期进程^[2]。

有关昆虫杆状病毒的研究,主要集中于病毒基因对病毒宿主域及病毒复制的相关性方面^[3-5]。而关于杆状病毒感染对宿主细胞周期影响的研究较少。目前已有 AcMNPV^[6-9]、HaSNPV^[10]等感染对宿主细胞周期影响的报道,但有关 BmNPV 对家蚕卵巢细胞系(BmN)细胞周期及细胞周期蛋白基因影响的研究尚未见报道。为此,本试验从病毒感染与细胞周期的相互关系入手,分析 BmNPV 感染家蚕 BmN 细胞后,对其细胞周期及细胞周期蛋白 A(*CyclinA*)、细胞周期蛋白 B(*CyclinB*)、细胞周期蛋白 E(*CyclinE*)基因表达水平的影响,以期能阐明杆状病毒的病毒因子与宿主细胞因子的相互作用机理,为进一步改造生物杀虫剂及深化病毒与宿主细胞相互关系的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

家蚕卵巢细胞系(BmN)和 BmNPV,由苏州大

学蚕桑实验室保存。细胞培养基 TC-100 和脂质体转染试剂 Oligofectamine 购自 Invitrogen 公司;Trizol RNA 提取试剂盒、SYBR PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒、M-MLV 反转录试剂盒及其他化学试剂,均购自宝生物工程(大连)有限公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 BmN 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的 TC-100 培养基于 27 ℃ 培养。

1.2.2 BmN 细胞总 RNA 的提取及 cDNA 的制备 取 4 μL BmNPV 保存液接种 10⁶ mL⁻¹ BmN 细胞,于 27 ℃ 培养 5 d 后收集细胞培养上清液作为病毒母液。培养细胞密度至 1×10⁶ mL⁻¹ 时换入新鲜的培养液,试验设对照组和感染试验组,对照组为正常培养的细胞,感染试验组中接种 30 mL(1×10⁸ PFU)BmNPV 病毒液,于 27 ℃ 培养,分别在培养 12, 24, 36 和 48 h 后收获病毒感染的细胞。按照 Trizol RNA 提取试剂盒说明书提取试验组和对照组细胞的总 RNA。用紫外分光光度计测定其纯度和浓度。用 M-MLV 反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 根据 NCBI 上下载的家蚕 *CyclinA* (GenBank 登录号: NM001160187)、*CyclinB* (GenBank 登录号: D84452)、*CyclinE* (GenBank 登录号: 619696) 基因序列,采用 Primer 5.0 软件,按照 Real-time PCR 要求,设计扩增 *Actin3* 内参基因和 *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinE* 基因的引物(表 1)。

表 1 *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinE* 及内参基因 *Actin3* 的 Real-time PCR 扩增引物信息

Table 1 Amplification primers for real-time fluorescent quantitative PCR of *CyclinA*, *CyclinB*, *CyclinE* and internal reference gene *Actin3*

基因名称 Target gene	引物序列 Primer sequence	产物长度/bp Length of product
<i>Actin3</i>	F: 5'-CGGCTACTCGTTCCTACTACC-3'	147
	R: 5'-CCGTCGGGAAGTTCGTAAG-3'	
<i>CyclinA</i>	F: 5'-CTCTCAACACCCACCTCAC-3'	153
	R: 5'-CGCTGCTATTACTGAGGGT-3'	
<i>CyclinB</i>	F: 5'-TTGCGAGACCGATACCTTTTG-3'	161
	R: 5'-AGATTGCTGCCGCTGCTA-3'	
<i>CyclinE</i>	F: 5'-CCCAAGACAATCCAGGCAA-3'	102
	R: 5'-AGAGGCGAGTCCACCCCA-3'	

以合成的 cDNA 为模板,采用 SYBR Prime-Script™ RT-PCR 试剂盒对各基因进行实时荧光定

量 PCR,具体步骤按照试剂盒说明书进行,反应体系为 20 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 变性 1 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 31 s,40 个循环。反应过程由 ABI 7300 测定仪软件自动设定,每个样品重复 3 次。

Real-time PCR 的结果数据用 ABI 7300 测定仪自带的 Sequence detection software version 1.3.1 软件处理,并参照 Schefe 等^[11]的方法进行效率校正。图表采用 SPSS16.0 软件制作。

1.2.4 标准曲线的制作 分别将 *CyclinA*、*CyclinB*、*CyclinE* 和 *Actin3* 基因以 10 倍梯度稀释成 6 个浓度梯度,进行 Real-time PCR,以所得循环阈值(*C_t* 值)为纵轴,对应的模板拷贝数(*N*)的常用对数($\lg N$)为横轴作图,绘制各基因扩增的标准曲线。

1.2.5 细胞周期的流式细胞仪检测 用移液器吹打细胞瓶中的 BmN 细胞,使细胞悬浮,300 $\times g$ 离心 6 min,PBS 洗 2 次。用 4 $^{\circ}$ C 预冷的体积分数 70% 无水乙醇于 -20 $^{\circ}$ C 固定 12 h。将细胞沉淀重悬于 5 mL PBS 中,室温静置 1 min,300 $\times g$ 离心 6 min,弃去 PBS。加入 50 μ g/mL PI 染色液 1 mL,室温避光孵育 30 min 后上流式细胞仪检测。

2 结果与分析

2.1 *CyclinA*、*CyclinB* 和 *CyclinE* 的 Real-time PCR 反应标准曲线

家蚕细胞周期蛋白家族基因 *CyclinA*、*Cy-*

clinB 和 *CyclinE* 的实时荧光定量 PCR 标准曲线见图 1。由图 1 可知,*CyclinA*、*CyclinB* 和 *CyclinE* 的 Real-time PCR 反应标准曲线的相关系数 R^2 均大于 0.99,表明线性关系较好,误差较小。

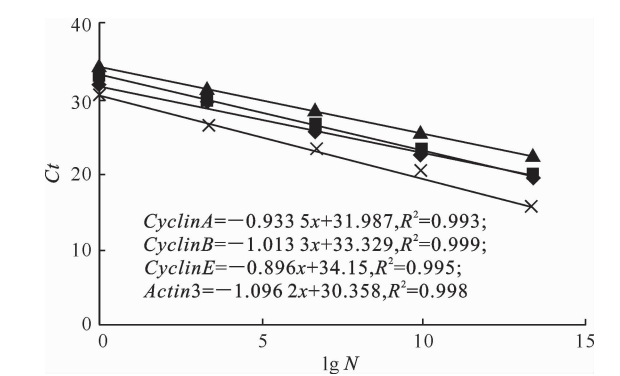


图 1 家蚕细胞周期蛋白家族基因 *CyclinA*、*CyclinB* 和 *CyclinE* 的实时荧光定量 PCR 标准曲线
◆, *CyclinA*; ■, *CyclinB*; ▲, *CyclinE*; ×, *Actin3*
Fig. 1 Real-time fluorescent quantitative PCR standard curves for *Bombyx mori* *Cyclin* genes
CyclinA, *CyclinB* and *CyclinE*

2.2 BmNPV 感染时间对 BmN 细胞形态的影响

图 2 显示,BmNPV 感染 BmN 细胞 24 h 后,细胞出现明显的感染症状,形态变圆(图 2-C);随着感染时间延长,细胞感染数量增多,并悬浮在培养基中(图 2-D、E),感染 48 h 后细胞中出现了多角体(图 2-F)。

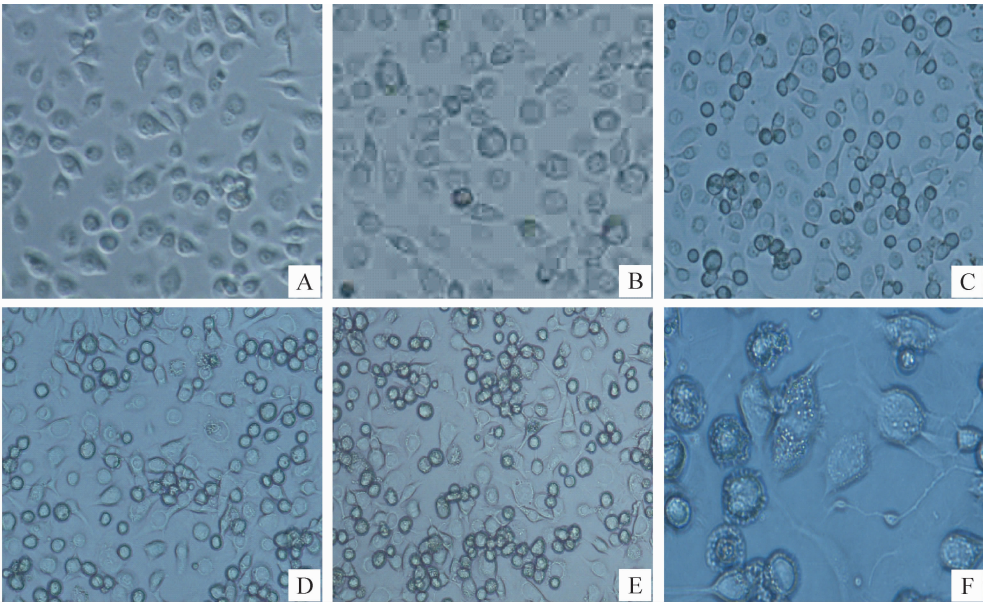


图 2 BmNPV 感染不同时间对 BmN 细胞形态的影响
A. 对照;B~E. 感染 12,24,36,48 h;F. 感染 48 h 后出现多角体
Fig. 2 Effect of BmNPV infection on the morphology of BmN cells at different infection times
A. Control;B~E. 12,24,36,48 h after infection;F. 48 h after infection,polyhedrosis appeared

2.3 BmNPV 感染对 BmN 细胞周期蛋白家族基因表达水平的影响

用 BmNPV 感染家蚕 BmN 细胞,实时荧光定量 PCR 分析细胞周期蛋白家族基因的表达情况,结果如图 3 所示。

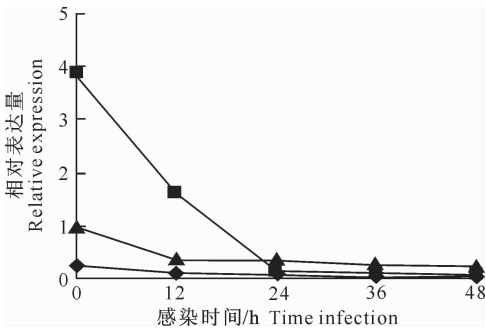


图 3 BmNPV 感染对 BmN 细胞周期蛋白家族基因表达水平的影响
—◆—CyclinA; —■—CyclinB; —▲—CyclinE

Fig. 3 Effect of BmNPV infection on transcription levels of Cyclin genes

由图 3 可见,随着病毒感染时间的延长,CyclinA、CyclinB、CyclinE 基因表达量均下降。CyclinA 基因在整个感染期间,表达量一直较低,感染 12 h 后,表达量几乎为 0。说明 BmNPV 感染对 CyclinA 基因的影响较小。CyclinB 基因在感染 0~24 h 的表达量持续降低,24 h 时表达量几乎为 0。CyclinE 基因在感染 0~12 h 的表达量持续下降,随着感染时间的延长,表达量平缓降低;至 36 h 时表达量几乎为 0。

2.4 BmNPV 感染对 BmN 细胞周期的影响

对正常细胞及 BmNPV 感染 8,16,24,48 h 的 BmN 细胞取样,经流式细胞仪检测(图 4)发现,正常 BmN 细胞周期分布为 G1 期 44.55%、S 期 38.87%、G2/M 期 16.58%,感染 8 h 后,有 48% 的细胞被抑制在 G2/M 期;16 h 后有 59% 的细胞被抑制在 G2/M 期;24 h 后,有 68% 的细胞被抑制在 G2/M 期;48 h 后,有 75% 的细胞被抑制在 G2/M 期。说明 BmNPV 感染 BmN 细胞后,可将其细胞周期抑制于 G2/M 期。

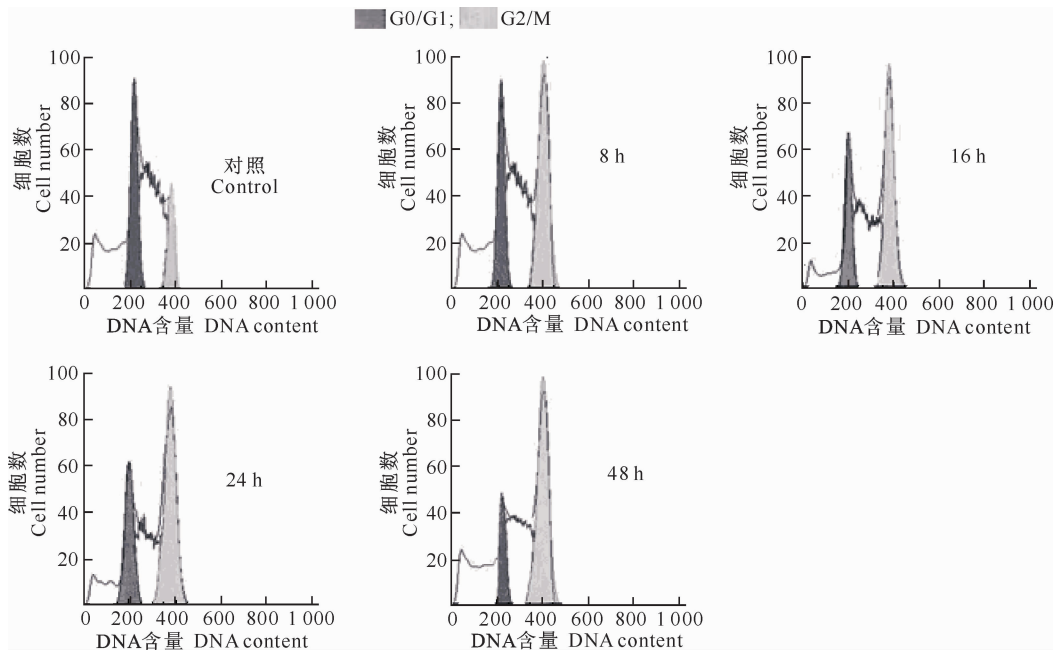


图 4 BmNPV 感染对 BmN 细胞周期的影响
Fig. 4 Effect of BmNPV infection on BmN cell cycle

3 讨论

本研究发现,用 BmNPV 感染 BmN 细胞后,经流式细胞仪分析,BmN 细胞周期被阻滞在 G2/M 期,其中感染 24 h 后,抑制于 G2/M 期的细胞比例达到 68%,并且随着感染时间的延长,被抑制于 G2/M 期的细胞越多,这与 Braunagel 等^[6]用 AcM-

NPV 和 Motoko1 等^[8]用 WcMNPV 感染 Sf9 的细胞结果一致,说明不同种类杆状病毒的感染均可以抑制宿主细胞周期。Prihod Ko 等^[7]和王颖等^[12]分别用 AcMNPV 的极早期基因转染 Sf9 细胞,细胞周期被阻滞,说明病毒极早期基因的产物可能参与了对宿主细胞周期的调控。在本研究中也发现 BmNPV 感染 8 h 后,就已经对细胞周期存在阻滞作

用,推测 BmNPV 的极早期基因的产物也可能参与了对宿主细胞周期的调控。已有研究证明,AcMN-PV^[13] 及 HaSNPV^[14] 等的感染会导致宿主细胞微管和微丝的重排。在细胞周期进程中,细胞骨架也起到了十分重要的作用。推测核型多角体病毒感染宿主细胞引起细胞周期抑制的生物学意义可能是有利于细胞骨架的重排,从而满足病毒复制的需要。

CyclinA 是在 S 期和 G2/M 期起重要作用的周期蛋白,其在正常细胞中的表达量较少,在 BmNPV 感染 12 h 后就几乎检测不到表达,因此 BmNPV 的感染对 BmN 细胞 *CyclinA* 基因的表达影响较小。

本试验发现,BmNPV 感染后 0~24 h,*CyclinB* 的表达一直呈下降趋势;24 h 后表达量几乎为 0,这与 Sudhakar^[15] 的研究结果一致,这可能是由于病毒的感染降低了宿主细胞 *CyclinB* 基因的转录活性,从而使 *CyclinB* 基因的表达量降低。

CyclinE 是细胞周期蛋白家族成员之一,是细胞周期中重要的调节因子。CyclinE 合成出现在 G1 中期,S 期含量最高而后逐渐降解消失,在 G2 期和 M 期不表达^[16]。在本试验中,BmNPV 感染 12 h 后,*CyclinE* 基因表达量显著下降,随着感染时间延长,下降趋缓。推测原因在于病毒将 BmN 细胞阻滞在 G2/M 期,导致 *CyclinE* 基因的表达量降低。

[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] Op De Beeck A,Caillet-Fauquet P. Virus and the cell cycle [J]. Prog Cell Cycle Res,1997,3:1-19.

[3] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学 [M]. 北京:中国农业科技出版社,1998:149-153.

Lü H S. Insect molecular biology [M]. Beijing:China Agricultural Science and Technology Press,1998:149-153. (in Chinese)

[4] Xue J,Qiao N,Zhang W,et al. Dynamic interactions between *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and its host cells revealed by transcriptome analysis [J]. J Virol,2012,86(13):45-59.

[5] Xu F,Vlak J M,Eker A P,et al. DNA photolyases of *Chryso-*

deixis chalcites nucleopolyhedrovirus are targeted to the nucleus and interact with chromosomes and mitotic spindle structures [J]. J Gen Virol,2010,91(4):907-914.

[6] Braunagel S C,Pan R,Belyavskiy M,et al. *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cell cycle arrest at G2/M phase [J]. Virology,1998,224:195-211.

[7] Prikhod Ko E A,Miller L K. Role of baculovirus IE2 and its rING finger in cell cycle arrest [J]. J Virol,1998,72:684-692.

[8] Motokol,Michihiro K. Cell-cycle perturbation in Sf9 cells infected with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus [J]. Virology,1999,258:176-188.

[9] Saito T,Dojima T,Park E Y. The effect of cell cycle on GFPuv gene expression in the baculovirus expression system [J]. J Biotech,2002,93:212-229.

[10] Zhou R,Yu Z H,Li X Q,et al. *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus induces Hz-AM1 cell cycle arrest at the G2 phase with accumulation of Cyclin B1 [J]. Virus Res,2004,105:113-120.

[11] Schefe J H,Lehmann K E,Buschmann I R,et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis:Current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula [J]. J Mol Med,2006,84:901-910.

[12] 王 颖,余泽华,姚汉超,等. 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 [J]. 中国病毒学,2002,17:132-136.

Wang Y,Yu Z H,Yao H C,et al. *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) infection effect on cell cycle of Sf9 [J]. China Virology,2002,17:132-136. (in Chinese)

[13] Desai A,Mitchison T J. Microtubule polymerization dynamics [J]. Annu Rev Cell Develop Biol,1997,13:83-117.

[14] 陈巨星. 中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒复制与宿主细胞核骨架相关性的研究 [D]. 武汉:华中师范大学,2001.

Chen J X. The study of association of the replication of HaSNPV with nuclear matrix in Hz cells [D]. Wuhan:Central China Normal University,2001. (in Chinese)

[15] Sudhakar Baluchamy. Characterization of a Cyclin homolog from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus [J]. Virus Research, 2004, 108:69-81.

[16] Berger C,Pallavi S K,Prasad M,et al. Cyclin E acts under the control of Hox-genes as a cell fate determinant in the developing central nervous system [J]. Cell Cycle,2005,4:422-425.