

357-365

3968(10)

第8卷 第4期
1993年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 8 No. 4
Dec. 1993粘虫核型多角体病毒包涵体蛋白的性质
及其对几种肿瘤细胞生长的抑制作用

刘子夜 齐义鹏

(武汉大学病毒研究所, 武汉 430072)

S476.13

A

摘要 SDS-PAG 电泳分析表明粘虫核型多角体病毒 (*Leucania separata* Nuclear Polyhedrosis Virus, 简称 LaNPV) 的包涵体蛋白由几种多肽组成, 其中分子量为 32kD 的主带为多角体的主要结构多肽。经 Sephacryl S-200 柱层析纯化后分析了其氨基酸组成, 证明此包涵体蛋白是一种以疏水氨基酸为主要组成的特异性蛋白。我们发现 32kD 蛋白对 HeLa、HLAMP、HICAM 等三种肿瘤细胞的生长有不同程度的抑制, 用 ³H-TdR 标记核酸合成代谢的 HeLa 细胞的放射活性证实了这种观察。

关键词 LaNPV, 包涵体蛋白, 32kD 蛋白, 肿瘤细胞

粘虫, 核多角体病毒;

昆虫核型多角体病毒 (NPV) 是农作物害虫的病原体, 在农业生物防治研究中有较大的理论和应用意义。所有 NPV 外面都有一层厚厚的包涵体蛋白, 其含量约占病毒组成的 80% 以上。实验证明, 包涵体蛋白基因 (ocu) 是一个非必需的极晚期高表达基因, 有一个非常强大的启动子。从 80 年代起, 人们开始用 ocu 基因构建转移载体, 在昆虫细胞中表达外源基因, 同时对 ocu 基因的结构、表达和调控也进行了深入研究, 极大地推动了昆虫病毒分子生物学的发展^[1,2]。但是包涵体蛋白作为一种有价值的生物活性多肽未得到足够的重视。

有报道认为, 昆虫病毒包涵体蛋白是一种活跃的生物活性多肽, 它可以与蛋白质、核酸相结合, 在细胞膜上有其特异性结合位点, 有血凝性质, 也有人认为多角体蛋白还有抗肿瘤活性^[3,4]。我们以 LaNPV 为材料, 对其包涵体蛋白的某些性质, 特别是对肿瘤细胞恶性生长的抑制作用进行了研究, 为抗癌药物的筛选提供了又一个天然材料。

材料和方法

1 包涵体蛋白的分离 用常规方法从 LaNPV 感染致死的粘虫幼虫中提纯多角体并制成悬液 (25mg/ml), 将多角体悬液置 70℃ 水浴 2 小时; 加入等体积的碱解液 (0.1mol/L Na₂CO₃, 0.17mol/L NaCl, 0.1mol/L EDTA, pH10.8)。温和法: 置 0—4℃ 冰浴中 1 小时; 用 Tris-HCl (pH7.0) 调至 pH8.0 中止反应; 2000r/m 离心 20 分钟除去未降解的多角体, 取上清 41000g 高速离心 50 分钟; 取上面 1/2 上清装入透析袋, 覆盖聚乙二醇 (PEG)-6000 晶体吸水, 浓缩约 10 倍。常规法: 置室温 (约 25℃) 下 25 分钟, 滴加 1N HCl 调至 pH8.0 中止反应, 并向高速离心所得的上清中滴加 1N HCl 调至 pH5.5 等电点以得到浓缩蛋白^[5,6,7,8]。收集高速离心沉淀中的病毒粒子, 镜检。

2 SDS-PAG 电泳 常规法制备变性聚丙烯酰胺凝胶 (10% 分离胶, 3% 浓缩胶) 垂直板; 电泳后用 0.25% 考马斯亮蓝染色, 甲醇-冰醋酸脱色^[5,9]。低分子量标准蛋白购自上海东风生化技术公司。

• 本文于 1993 年 2 月 22 日收到, 3 月 8 日修回

3 凝胶柱层析 制备 $2 \times 60\text{cm}$ 的 Sephacryl S-200 分子排阻层析凝胶柱,加入温和法降解样品,用缓冲液 (0.1mol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, pH8.0) 洗脱,流速 1ml/min,分部收集样品用 Sephadex G-25 干粉浓缩^[10]。

4 氨基酸组成分析 常规方法水解层析纯化的蛋白,以 PITC 衍生物法在 Waters PICO. TAG 氨基酸分析系统上分析其 17 种氨基酸的组成^[2,8,11]。

5 肿瘤细胞的培养及生长抑制试验 HeLa 细胞及人胚肺二倍体细胞来源于中国典型培养物保藏中心(CCTC C,武汉),HLAMP(人肺腺癌转移胸水细胞系)及 HICAM(人小肠癌转移腹水细胞系)来源于本系医学病毒研究室李文鑫教授^[12,13],用 RPMI-1640(Gibco)(pH7.2)加 10% 小牛血清培养基,传代细胞浓度为约 4×10^5 细胞/ml,置 37℃ 培养。将实验样品(pH7.2)以 0.5ml/瓶浓度分别加入传代后 24 小时即处于对数生长期的肿瘤细胞 HeLa、HLAMP、HICAM 的培养基中,向对照组细胞中加入等量 PBS(pH7.2),每天观察细胞的生长情况,并将细胞洗下在血球计数板上统计当时的细胞浓度,直至对照组细胞因营养耗竭而瓦解;用人胚肺二倍体细胞作为对照细胞进行同样的试验^[14]。

6 ³H-TdR 标记 HeLa 细胞核酸检测实验样品对其核酸合成的影响 将适当浓度的实验样品(pH7.2)和用作对照的等体积 PBS(pH7.2)分别加入对数生长期的 HeLa 细胞培养基中,同时以 1μg/瓶的量加入 ³H-TdR(1μCi/μl);72 小时后,去掉培养液加入 0.5N NaOH 2ml 洗下细胞并使其释放出 DNA,将细胞 DNA 抽滤到纤维素酯滤膜上,并加入 PBS 冲洗三遍,将滤膜放入液闪瓶,置 37℃ 过夜烘干,以常规方法加入液闪溶剂,在液闪计数器(Beckman)上测定 ³H 的 cpm 值^[15]。

结果

1 多角体及病毒粒子纯化 多角体在蔗糖密度梯度 55% 处呈一条区带,光镜下观察见纯化的多角体分布均匀无杂质,电镜观察见多角体形态规则典型,多角体碱解后释放出放的病毒粒子也可见其典型形态没有受碱解操作的影响(图 1)

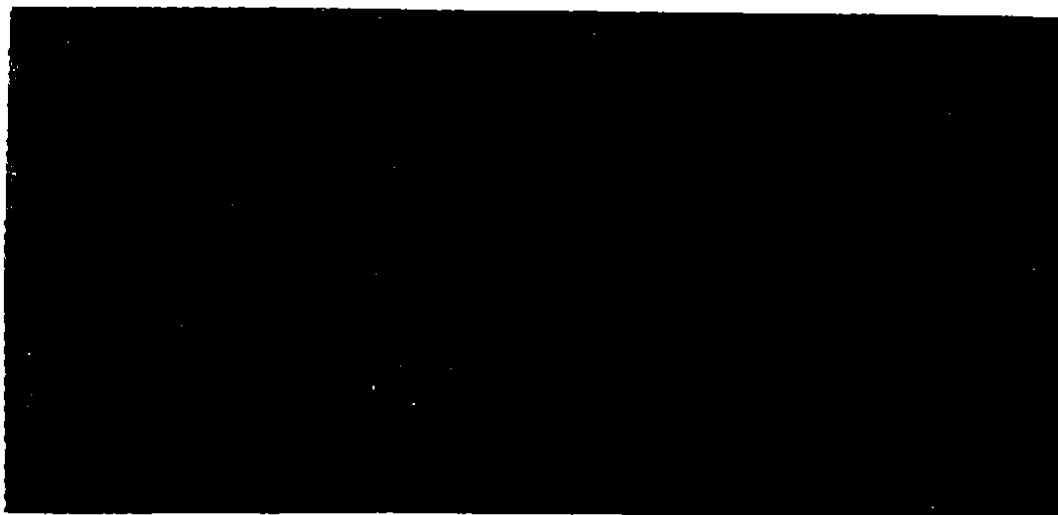


图 1 LsNPV 电镜照片

A, 纯化的多角体($\times 5,000$); B, 碱解多角体释放出的病毒粒子($\times 50,000$)

Fig. 1 Electron micrograph of LsNPV

A; Polyhedra purified($\times 5,000$) B; Virion released by exposure to alkaline saline($\times 50,000$)

2 包涵体蛋白的 SDS-PAGE 电泳和纯化 温和法碱解得到的包涵体蛋白电泳结果表明有 15 条带,其中出现一条明显的主带,分子量为 32kD;常规法碱解得到的多角体蛋白电泳结果则丢失了许多小带,但也有分子量 32kD 的主带。纯化包涵体蛋白洗脱曲线有 4 个典型的峰(Peak1、2、3);Peak1 紧随外水体积在 40—50ml 处出现,为大分子蛋白;Peak2 出现在 100—110ml 处,为 67kD 蛋白 Peak3 出现在 120—130ml 处,为主带 32kD 蛋白;收集 Peak3 经 Sephadex G-25 干粉浓缩,电泳结果表明只有 32kD 一条带(图 2)。



图 2 (1)LsNPV 多角体蛋白 SDS-PAGE 电泳
A:低分子量标准蛋白(上海东风);
B、C:温和法样品;
D、E:常规法样品;
F:柱层析洗脱第三峰(P3),表明为 32kD 蛋白。
(2)Sephacryl S-200 柱层析

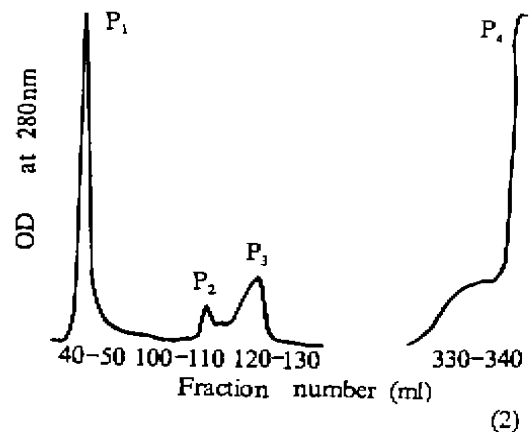


Fig. 2 (1)SDS-PAGE of polyhedrin of LsNPV
A, Marker proteins of low MW;
B, C, Sample digested at 0°C;
D, E, Sample digested at room temperature;
F, P3 from chromatography column.
(2)Chromatography of Sephadex G-25

3 32kD 蛋白氨基酸组成分析 分析 LsNPV 包涵体蛋白的 17 种氨基酸成份, Asp 和 Asn、Glu 和 Gln 未分开分析, Trp 未分析。摩尔百分比含量较高的疏水氨基酸有 Ile(20.8)、Leu(14.3)和 Phe(8.0), 含量较高的苯环氨基酸有 Pro(12.6)和 Phe。按分子量 32kD 计算, LsNPV 包涵体蛋白估计共有 213 个氨基酸残基, 其中 Ile 有 44 个, Leu 有 30 个, 最少是 Arg(4 个)和 Met(4 个), Cys 有 3 个残基, 可能参与构成了分子内及分子间的二硫键, 与蛋白质分子构型有关(表 1)

4 包涵体蛋白对几种肿瘤细胞生长的抑制作用 在细胞对数生长期加入多角体蛋白混合物或 32kD 蛋白 24 小时后, HeLa、HLAMP、HICAM 三种肿瘤细胞试验组和对照组的细胞浓度无明显区别; 48 小时后试验组细胞生长速度减慢, 而对照组细胞仍处于对数生长期; 72 小时后试验组细胞呈现不同程度的生长抑制和细胞破坏, 可见明显的细胞膜部分瓦解和细胞内颗粒增

表1 LaNPV多角体32kD蛋白氨基酸组成分析
Table 1 Amino acid composition of LaNPV 32kD protein

氨基酸 Amino acid	摩尔百分比 Mol%	估计残基数 No. of Residues
Asx	2.6	5
Glx	7.3	16
Ser	4.1	9
Gly	6.0	13
His	2.9	6
Arg	1.8	4
Thr	4.9	10
Ala	2.1	5
Pro	12.6	27
Tyr	2.3	5
Val	3.1	7
Met	2.1	4
Cys	1.6	3
Ile	20.8	44
Leu	14.3	30
Phe	8.0	17
Lys	3.5	8

多。加入PBS的对照组细胞没有这类典型变化。细胞培养至第五天时,对照组细胞已因营养耗竭出现部分破坏,而试验组的细胞则已全部瓦解。同时试验的人胚肺二倍体正常对照细胞,其试验组和对照组细胞的生长情况无明显区别(表2)(图3)(图4)。

表2 三种肿瘤细胞及人胚肺二倍体细胞在加入LaNPV多角体32kD蛋白后不同时间的细胞浓度($\times 10^4$ 个细胞/ml)

Table 2 Concentration ($\times 10^4$ cells/ml) of three tumor cells and human embryo lung diploid cell treated with 32kD protein from LaNPV polyhedrosis at different time

细胞 Cell	24小时 24hours		48小时 48hours		72小时 72hours	
	试验组 Test	对照组 Control	试验组 Test	对照组 Control	试验组 Test	对照组 Control
Hela						
1	7.2	7.0	9.5	11.0	7.5	22.0
2	6.8	7.2	9.5	12.0	8.0	25.0
3	7.0	7.0	10.0	12.0	7.8	18.0
4	7.5	7.5	9.0	9.5	8.5	22.0
平均值 Mean	7.2	7.2	9.5	10.0	8.0	22.0
HLAMP						
1	8.2	8.5	12.0	12.0	8.5	30.0
2	7.8	8.0	12.0	15.0	8.2	28.0
3	8.5	8.5	15.0	18.0	7.8	20.0
4	7.5	7.8	10.0	15.0	7.5	22.0
平均值 Mean	8.0	8.2	12.0	15.0	8.0	25.0
HICAM						
1	5.8	5.5	8.2	9.0	9.5	10.0

2	6.2	6.2	8.5	8.8	10.0	12.0
3	5.5	6.5	7.0	8.2	10.0	12.0
4	7.2	5.8	8.6	7.8	9.8	15.0
平均值 Mean	6.0	6.0	8.0	8.5	9.8	12.0
二倍体 HEL Diploid						
1	6.5	5.8	7.6	6.6	8.0	7.2
2	6.0	6.2	6.8	7.2	7.5	7.8
3	6.0	6.0	6.5	6.8	8.0	7.5
4	5.5	6.0	7.2	7.5	8.6	7.5
平均值 Mean	6.0	6.0	7.0	7.0	8.0	7.6

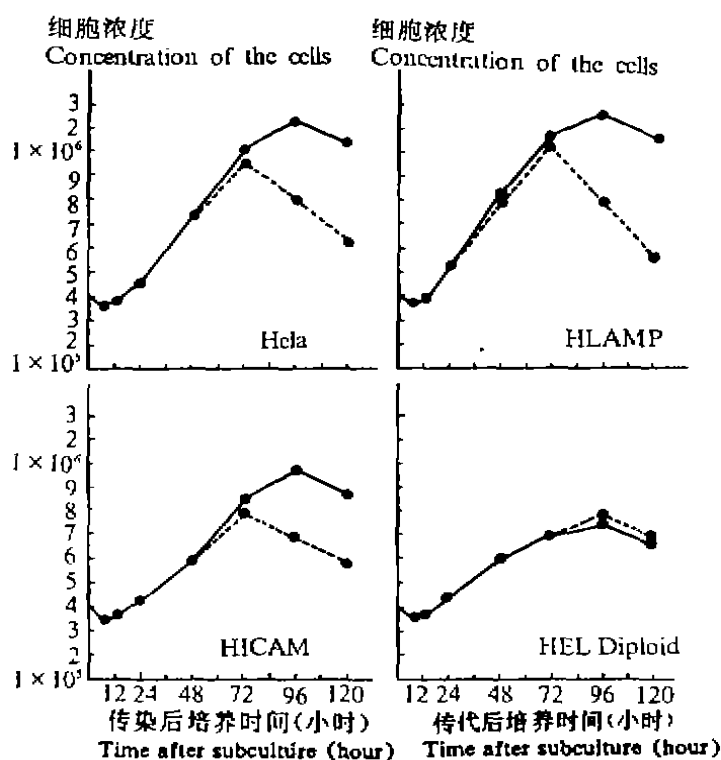


图 3 肿瘤细胞生长及生长抑制曲线

——生长(对照组),抑制(试验组)

传代细胞浓度约 4×10^5 个细胞/ml. 6 小时细胞刚变, 细胞量略有减少, 12 小时细胞开始增殖, 24 小时细胞即处于对数生长期早期, 48 小时细胞于对数生长期, 生长旺盛, 72

96 小时细胞量最多, 形成致密单层, 96—120 小时培养基营养消耗, 细胞单层开始瓦解.

在传代后 24 小时细胞进入对数生长期时加入 32kD 蛋白, 24 小时后(即 48 小时)细胞没有明显的抑制现象, 48 小时后(即 72 小时)细胞停止生长, 72 小时后(即 96 小时)细胞数量减少, 可见明显的生长抑制作用. 受抑制的程度, HLAMP > Hela > HICAM. 人胚肺二倍体细胞(HEL Diploid)没有受到抑制.

Fig. 3 Curve of growth and inhibition of three tumor cells——Growth(Control) ·····Inhibition (Test)

Concentration of the cells subcultured was 4×10^6 cells/ml. After 6 hours the cells attached bottom of bottles and entered a declining growth period; after 12 hours the cells began growing; after 24 hours the cells were at earlier logarithmic phase; after 48 hours the cells were at logarithmic phase and showed increased frequency; during 72—96 hours the most population of the cells formed thick monolayer; during 96—120 hours nutrient of medium was very poor and the monolayer began destroy.

Added 32kD protein at 24 hours after subculture. Obvious inhibition of the cells did not showed after 24 hours (at 48 hours); growth of the cells stop after 48 hours (at 72 hours); population of the cell decreased, distinct inhibition of the cells growing was found.

Extent of inhibition: HLAMP > HeLa > HICAM. Diploid cell of human embryo lung (HEL Diploid) was not inhibited.

5 ^3H -TdR 标记 HeLa 细胞核酸合成的抑制 加入 32kD 蛋白的 HeLa 细胞在镜下可见生长抑制现象。72 小时后测定细胞新合成的 DNA 中 ^3H 的 cpm 平均值, 约为同时加入 PBS 的对照组的 1/3, 表明试验组细胞 DNA 的复制受到 32kD 蛋白的抑制(表 3)。

表 3 ^3H -TdR 标记 HeLa 细胞 DNA 的 CPM 值
Table 3 The CPM of HeLa cell DNA ^3H -TdR labeling

样品 Sample	试验组 Test	对照组 Control
1	437	1630
2	996	2175
3	453	2191
平均值 Mean	629	1999

试验组: 加入 LsNPV 多角体 32kD 蛋白

对照组: 加入 PBS

Test: Add the cell medium with 32kD protein

Control: Add the cell medium with PBS

讨 论

实验结果证明, 温和法降解得到的包涵体蛋白, 在 SDS-PAGE 电泳图谱中出现了多于常规法样品的带, 可能更加真实地反映了包涵体蛋白的构成。关于包涵体蛋白究竟由一种或多种多肽组成的问题曾经有过讨论^[6,7,16,17], 我们的结果与某些作者的包涵体蛋白由多种多肽构成的观点是一致的。对于不同昆虫杆状病毒的多角体蛋白, 某些作者^[2,14]认为, 其结构和功能是保守的, 另一些作者^{[7][18]}认为是有特异性的, 我们对 LsNPV 氨基酸组成分析的结果支持了后一种观点。多角体蛋白一级结构的较大差异可能说明其功能也不同, 这个问题有待对其他包涵体蛋白基因 DNA 序列的深入比较研究^[1,7]。

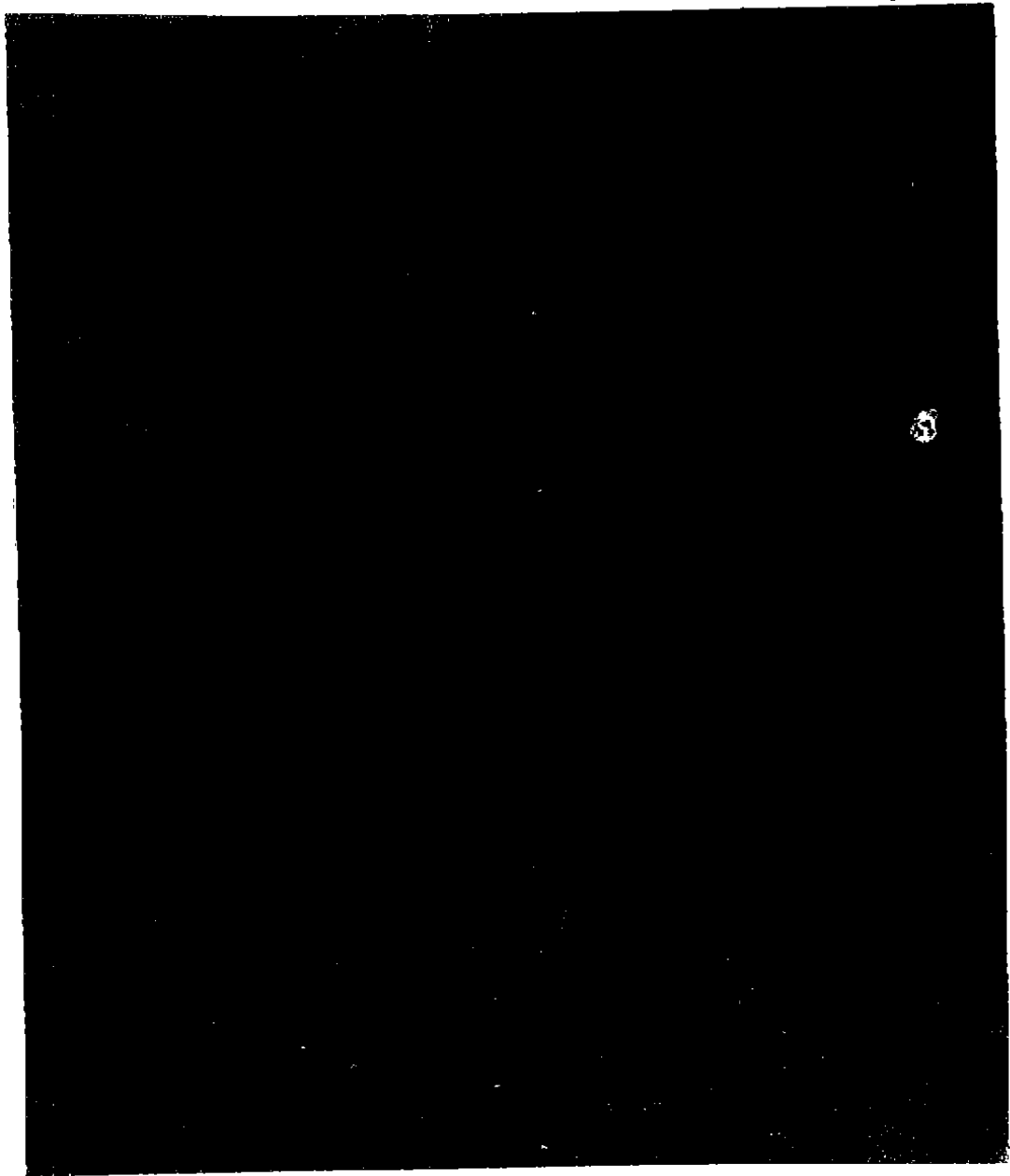


图 4 细胞生长及抑制照片

A、B;Hela 细胞, C、D;HLAMP 细胞, E、F;HICAM 细胞

试验组 A、C、E;在肿瘤细胞对数生长期加入 32kD 蛋白 72 小时后,可见细胞膜部分瓦解,细胞质内颗粒增加,细胞生长受到抑制;对照组 B、D、F;同时加入等量的 PBS 在 72 小时后,细胞生长正常;

G;人胚肺二倍体细胞在其对数生长期加入 32kD 蛋白 72 小时后,细胞的生长状态与同时加入 PBS 的对照组没有明显区别.

Fig. 4 Photograph of growth and inhibition of Cells

A、B;Hela cell,C、D;HLAMP cell,E、F;HICAM cell

Test A,C,E; destroy of the cell membrane, increase of grain in the cytoplasm and inhibition of cell growth after 72hr treated with 32kD protein in cell growth logarithmic phase.

Control B,D,F; normal cell after 72hr treated with PBS of equal quantity. O; diploid cell of human embryo lung

Test cell treated with 32kD protein is not different from control with PBS after 72hr in cell growth logarithmic phase.

我们选用的三种肿瘤细胞均具有较典型的恶性肿瘤细胞属性,细胞分裂生长迅速,在1传3传代后24小时细胞即可进入对数生长期,形成约50%的单层,细胞呈多边形或圆形,胞膜轮廓清晰,胞质透明,若有细胞毒性作用,观察是比较明确的。我们向Hela细胞中加入包涵体蛋白混合物和层析纯化的32kD蛋白,得到了细胞破坏和生长抑制的一致结果,证实不是由于提取物中残留的蛋白酶的影响,初步说明了多角体蛋白主要是32kD的活性作用。用HLAMP和HICAM细胞进行同样试验,进一步证实了本研究的结论。将包涵体蛋白提取物加入人胚肺二倍体细胞没有出现上述细胞破坏和生长抑制现象。在Hela细胞上以³H-TdR标记细胞的DNA合成代谢,确证了多角体蛋白的32kD蛋白对该肿瘤细胞生长的影响。

关于昆虫包涵体蛋白作为一种具有特殊功能的生物活性多肽,曾有过讨论^[3],而对其抗肿瘤活性只有少量的研究报道^[4]。昆虫病毒ocu基因是一个极晚期基因,包涵体蛋白的表达预示着NPV的最后装配和宿主细胞的消亡。我们认为,多角体蛋白的32kD蛋白结构中存在的较多的疏水氨基酸使其可以容易地进入细胞,可能给生长旺盛的细胞提供了一个进入生命晚期的信号,这个信号也可对生长中的肿瘤细胞起作用,从而造成肿瘤细胞生长的抑制。包涵体蛋白构成的NPV的保护性外壳结构是非常稳定的,可以抵抗多种蛋白酶和其他不利的环境因素的影响,这也说明了包涵体蛋白在结构和功能上可能存在的特殊性。本研究结果预示着多角体蛋白作为一种抗肿瘤活性物质的美好前景,并将这种性质确定在包涵体蛋白的32kD蛋白上,但其抗肿瘤机制以及这种大分子多肽拟作为抗肿瘤药物的可行性,还需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Luckow V A, Summers M D. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*, 1988, 6: 47~55
- 2 Rohrmann G F. Polyhedrin structure. *J Gen Virol*, 1986, 67: 1499~1513
- 3 Doeffler W, Bohm P. The molecular biology of baculoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1984, 131: 121~123
- 4 Yamafuji K, Skinohara K, Yoshihara F, et al. Control of goncs in silkworms by steroid hormones, catecholamines and hexose oximes. *Enzymologia*, 1971, 41(3): 183~199
- 5 Maskos C B, Miltenburger H G. SDS-PAGE comparative studies on the polyhedral and viral polypeptides of the nuclear polyhedrosis viruses of *maimstra brassicae*, *Autographa californica*, and *lymantria dispar*. *J Invertebr Pathol*, 1981, 37: 174~180
- 6 Monroe J E, McCarthy W J. Polypeptide analysis of genotypic variants of occluded *Heliothis* spp. baculoviruses. *J Invertebr Pathol*, 1984, 43: 32~40
- 7 Summers M D, Smith G E. Baculovirus structural polypeptides. *Virology*, 1987, 84: 390~402
- 8 Tweenten K A, Bulla Jr L A, Consigli R A. Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsids. *J Virol*, 1980, 33: 866~876
- 9 Laemmli U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 1970, 227: 680~685
- 10 Bell C D, Orlob G B. Serological studies on virions and polyhedron protein of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Virology*, 1977, 78: 162~172
- 11 Rohrmann G F. Characterization of N-polyhedrin of two baculovirus strains pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. *Biochemistry*, 1977, 16(8): 1631~1634

- 12 曾灵芳,李文鑫,李杰,等.人肺腺癌转移胸水细胞系 HLAMP 的建立及其生物学特征.见:李文鑫著,无血清细胞培养研究.武汉:湖北科学技术出版社,1990,160~167
- 13 曾灵芳,沈瑞忠,李文鑫,等.人小肠癌转移腹水细胞 HICAM 的建系培养及其生物学特征.见:李文鑫著,无血清细胞培养研究.武汉:湖北科学技术出版社,1990,18~176
- 14 大星章一,菅野晴夫.人癌细胞培养.北京:科学出版社,1979:36~81
- 15 李文鑫,牛初乳替代血清对培养细胞的 DNA 合成和增殖的影响.武汉大学学报,1991,2:133~136
- 16 黄永秀,齐义鹏,魏中一.大尺蠖核型多角体病毒 DNA 和蛋白质的特性.武汉大学学报,1988,1:121~127
- 17 张文军,陈秉华,张立人,等.黄褐天幕毛虫核型多角体病毒的形态及生化特性的研究.中国病毒学,1992,7(4):417~424
- 18 Carstens E B, Krebs A, Gallerneault, C E. Identification of an amino acid essential to the normal assembly of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus polyhedra. J Virol, 1986, 58: 684~688

Properties of Polyhedron Protein from *Leucaia Separata* Nuclear Polyhedrosis Virus and Its Inhibition to Growth of Several Tumor Cells

Liu Ziye Qi Yipeng

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

SDS-PAG electrophoresis showed that the polyhedron proteins of *Leucaia separata* nuclear polyhedrosis virus(LsNPV)was consisted of several polypeptides,the major band of MW 32kD was the major structural polypeptides of polyhedra. Amino acid composition of 32kD protein was analyzed after purification by chromatography of Sephacryl S- 200 column. The cell growth of three tumor (Hela, HLAMP, HICAM)was inhibited by 32kD protein, DNA replication labeling with ³H-TdR recognized the result.

Key words LsNPV, Polyhedron proteins, 32kD protein, Tumor cell