

棉铃虫核多角体病毒成纤维细胞生长因子受体的获得及初步分析

李祥 金爱慧 张欢 吕建新*

(温州医学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)是一类非常重要的调节因子,它主要通过激活其受体再激活信号转导途径来调节细胞的生长、发育和迁移。昆虫杆状病毒如棉铃虫单核衣壳多角体病毒(*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HearNPV)编码 FGF 并具有趋化宿主细胞的功能。为了深入研究其作用的分子机制,本文根据家蚕的 FGF 受体 Bmbtl 和草地贪夜蛾的 FGF 受体 Sfbtl 基因序列设计引物,通过 RT-PCR 从 HearNPV 的敏感细胞中获得了 FGF 受体 Habtl 的部分序列并对其进行了初步研究。序列分析结果显示获得的 Habtl 序列与 Bmbtl 和 Sfbtl 有很高的同源性;通过 siRNA 抑制试验,发现 Habtl 在 HearNPV FGF 趋化和病毒感染过程中发挥着重要作用。

关键词 棉铃虫单核衣壳多角体病毒;成纤维细胞生长因子;受体;趋化;感染

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)是广泛存在于多细胞生物中的一类多肽生长因子,上世纪 70 年代中期首次从牛脑垂体中分离提纯,由于它对成纤维细胞具有很强的促增殖作用,故命名为成纤维细胞生长因子。FGF 在多细胞生物发育过程中起着重要作用,如有丝分裂、细胞增生、细胞分化和迁移。在信号传递过程中,FGF 首先与肝素或肝素硫酸盐糖蛋白结合形成寡聚物,然后再与 FGF 受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)结合使受体形成二聚体而自动磷酸化,这样受体被激活,激活的受体再激活下游的信号转导途径^[1]。

FGF 和 FGFR 广泛表达于从线虫到人类的各种多细胞动物的组织中,在单细胞生物中还没有发现相应基因存在^[2]。因为大量不同的 FGF 配体以及它们的受体的存在,所以了解脊椎动物的 FGF/FGFR 的信号传导机制比较困难。而一些非脊椎动物如果蝇等,由于它们的信号转导相对简单,成为很好的研究模型。目前从果蝇体内发现了 2 种编码 FGFR 的基因,即 *breathless (btl)*。它们的主要作用是控制果蝇气管系统的形态发生以及中枢神经胶质细胞的迁移^[3,4]。Katsuma 等^[5]克隆了家蚕 *Bombyx mori* 及草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的 *btl* 的同源基因,它们的结构和序列与 FGFR 家族有很高的同源性,并证明这些基因编码的蛋白是 FGFR,分别命名为 Bmbtl 和 Sfbtl。而且杆状病毒编码的 FGF 能够利用这些受体发挥趋化的功能。

我们已有的研究表明棉铃虫核多角体病毒 (*Helicoverpa armigera* NPV, HearNPV) FGF 对肝素有很强的亲和力,是一种分泌蛋白而且对 Hz-AM1 细胞具有特异的趋化能力,同时还发现 HearNPV FGF 是出芽病毒粒子(budded virion, BV)的结构蛋白并可能在 BV 感染中起一定的作用^[6]。本研究中,根据 Bmbtl 和 Sfbtl 的结构和序列与 FGFR 家族有很高的同源性为出发点,设计引物从 HearNPV 的敏感细胞中获得了 Habtl 并对其进行初步的鉴定,为研究 FGF 的功能及 FGF 家族信号转导途径打下基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系和病毒

棉铃虫野生病毒 HearNPV (G4)^[7,8]、重组病毒 HaCXW1^[9]由本实验室保存。实验所使用的昆虫细胞系为 Hz-AM1。Hz-AM1 来源于美洲棉铃虫(*H. zea*)^[10],由中国科学院武汉病毒研究所中国典型培养物保藏中心(CCTCC, 武汉)。

1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶、核酸分子量 marker, T4 DNA 连接酶等及其配套缓冲溶液均购自 TaKaRa 公司。Trizol 购自 Invitrogen 公司。PCR 产物回收试

收稿日期: 2009-11-14 接受日期: 2010-03-12

温州医学院人才引进项目(No.89207005)和温州科技局医疗卫生项目(No.Y20080011)资助

* 通讯作者。Tel: 0577-86689776, E-mail: jxlu313@163.com

剂盒和质粒纯化试剂盒购自 V-GENE 公司。

1.3 细胞培养

H_z-AM1 传代培养采用 25 cm² 的培养瓶以单层细胞的形式多次传代, 培养基为含 10% 胎牛血清的 Grace 培养基(Gibco-BRL 公司), 培养温度为 27 °C。

1.4 Habt1 片段的获取

收集传代培养 3 天的 H_z-AM1 细胞, 利用 Trizol 试剂提取总的 RNA, 方法参照产品说明书。总 RNA 充分溶解于 8 μl 无 RNA 酶的去离子水, 之后进行 DNA 消化处理, 方法参照无 RNA 酶的 DNA 酶使用说明书。然后加入 Oligo (dT) 15 和 M-MLV 反转录酶等进行反转录, 具体步骤及体系参照产品说明书。

根据已发表的家蚕和果蝇的 FGFR 序列, 经过序列比对选取 P1 (上游: 5' ACG CAT TGG ACG AAG AAG GTG 3'; 下游: 5' TGG CCC TCT TTC AAC ATC TTA 3')和 P2 (上游: 5' TAA GAT GTT GAA AGA GGG CCA 3'; 下游: 5' CTG CCT TCT GTC TTC TTC CTG 3')作为 PCR 的引物序列。取反转录产物取 6 μl, 分别加入 Habt1 片段的两对引物 P1 和 P2、dNTP 和 TaqDNA 聚合酶, 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 循环 25 次, 再在 72 °C 延伸 5 min。经琼脂糖电泳、回收, 连接到 pMD18 载体上进行测序。

1.5 siRNA 的设计制备

根据测序的结果, 按照 siRNA 设计原则, 利用 Ambion 公司网站上的在线设计软件设计了 3 对 siRNA 序列: siRNAF1 (5' GGAUGACGAAGGAUGG UAU 3')、siRNAF2 (5' AGCUAUCGCAAGUCCAG AA 3')、以及阴性对照 siRNAF0 (5' GACACACAC AGAACCUC 3')。经 BLAST 对比确定其特异性后由上海吉玛制药技术有限公司化学合成, HPLC 纯化。同时合成 siRNAF0 5' 端标记荧光素 FAM, 即 siRNAF0-FAM 评价 siRNA 转染的效率。

1.6 细胞转染

转染前 1 天将处于对数生长期的细胞按照 2×10⁵ 个/孔的细胞密度接种于 6 孔培养板中, 将 siRNAF1、siRNAF2 以及阴性对照 siRNAF0 按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒说明书进行转染。

1.7 趋化活性测定

细胞趋化实验在带有聚碳膜的 Costar transwell 中进行^[11,12]。将不同浓度纯化的蛋白加入下层孔中, 再将聚碳膜从一侧轻轻覆盖在下层板上, 避免膜与液体之间形成气泡。加上上层板并拧紧。将 5×10⁴ 个的 H_z-AM1 加入上层孔中。在 27 °C 温箱中温浴 2 h。卸下上层板夹住聚碳膜两端, 在洗片上迅速清洗

“非细胞面”3 次; 然后用 100% 甲醇中固定 2 min。充分晾干后在染液中染色 5 min, 自来水轻柔冲洗干净, 显微镜下计数(20× 目镜), 每孔随机计 5 个视野细胞总数。计算趋化指数(chemotactic index, CI), CI = 实验组迁移细胞均数 / 对照组迁移细胞均数。趋化指数大于 2 为具有统计学意义。

1.8 病毒滴度的测定

利用终点稀释法(end point dilution assay, EPDA)测定病毒的滴度^[13]。

2 结果

2.1 Habt1 部分序列的获得

Katsuma 等^[5]克隆了 *B. mori* 及 *S. frugiperda* 中与果蝇 *breathless (btl)* 基因同源的基因, 并证明这些基因编码的蛋白是其 FGFR; 分别命名为 Bmbtl 和 Sfbtl。由于它们的结构和序列与 FGFR 家族有很高的同源性, 所以我们比对了 Bmbtl 和 Sfbtl 序列, 并利用高度保守区域设计引物从棉铃虫细胞 H_z-AM1 获取 Habt1。

用 Trizol 试剂提取 H_z-AM1 细胞的总 RNA 进行反转录, 用根据保守区设计的两对引物 P1 和 P2 进行 PCR 分别获得 323 bp 和 444 bp 的片段(如图 1、图 2 所示)。将 PCR 获得的片段进行回收、连接和测序, 结果获得了 746 bp 序列, 可编码 248 个氨基酸, 是 Habt1 的酪氨酸蛋白激酶结构域的一部分; 其氨基酸序列与 Bmbtl 和 Sfbtl 具有高度同源性(图 3), 相似性均达到 98%。

2.2 siRNA 对细胞趋化活性的分析

HearNPV FGF 具有典型 FGF 的生物活性, 为了研究趋化的分子机制, 通过原核表达了 MBP-FGF 融合蛋白, 利用 Amylose-resin 亲和层析柱对含 MBP 标签的蛋白进行纯化, 纯化好的重组 FGF 融合蛋白(0.5 μg/ml) 分别对正常的昆虫细胞 H_z-AM1 和转染了 siRNAF1、siRNAF2 以及阴性对照序列 siRNAF0 48 h 后的 H_z-AM1 细胞进行趋化实验(每次实验重复 3 次)。结果表明, 重组蛋白对正常的和转染了阴性对照序列 siRNAF0 的 H_z-AM1 具有趋化活性, 趋化指数分别为 4.25 和 4.04; 而重组蛋白对转染了 siRNAF1 和 siRNAF2 的 H_z-AM1 细胞趋化能力急剧下降, 趋化指数只有 1.55 和 1.13, 即不具有趋化能力(图 4)。结果表明 HearNPV FGF 是通过敏感细胞表面的 Habt1 发挥其功能的。据预测, 由于这段 Habt1 序列编码了酪氨酸蛋白激酶的一部分, 而酪氨酸蛋白激酶是 FGF 发生作用的一个重要的受体, 当 Habt1 受到 siRNA 干扰而发生降解, FGF 的趋化活性会因此受到影响。

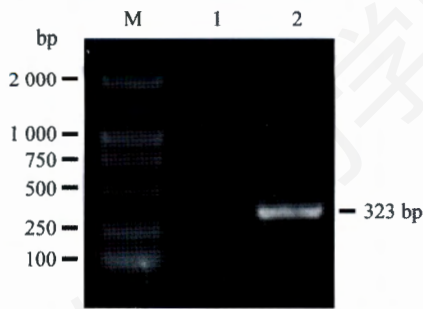


Fig.1 PCR results of Habtl with primer P1
M: DL2000; 1: negative control; 2: Habtl fragment.

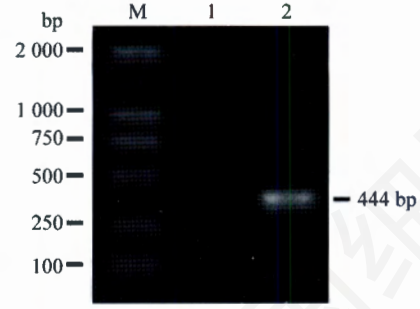


Fig.2 PCR results of Habtl with primer P2
M: DL2000; 1: negative control; 2: Habtl fragment.

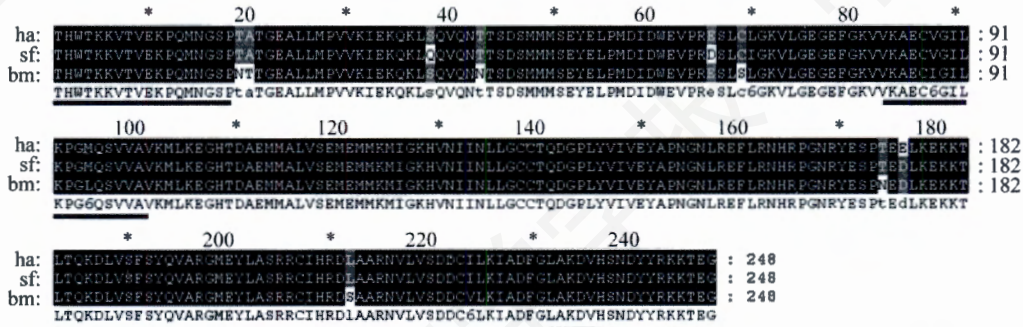


Fig.3 Alignment of Habtl, Bmbtl and Sfblt (the sequences of primers P1 and P2 are in black)

2.3 siRNA 对病毒感染性的分析

为了研究 siRNA 对 Habtl 表达下调后是否影响 HearNPV 对 Hz-AM1 的感染, siRNAF1、siRNAF2 及 siRNAF0 分别转染 Hz-AM1 细胞, 转染 2 h 后用 10 MOI 的 HaCXW1 感染 Hz-AM1 细胞。分别收集感染后 72 h 的上清液, 用终点稀释法测定其滴度, 每个样品重复 3 次。实验结果如图 5 所示, siRNAF1 和 siRNAF2 明显影响了细胞上清液中病毒滴度, 分别下降了 28.6% 和 28.3%, 而阴性对照 siRNAF0 对细胞上清液的病毒滴度没有明显的影响, 说明通过 siRNA 干扰下调细胞 Habtl 的表达对 HaCXW1 的感染能力有一定的影响。

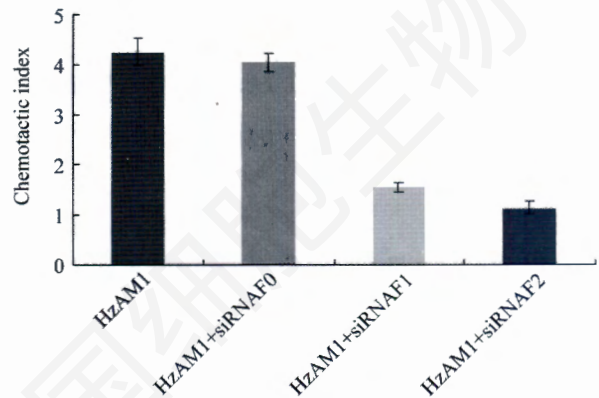


Fig.4 HearSNPV FGF (0.5 μg/ml) chemotactic activity assay

3 讨论

HearSNPV FGF 具有典型的 FGF 生物活性, 研究表明 HearNPV FGF 对细胞的趋化性具有高度的专一性, 只能趋化 HearNPV 敏感的细胞 Hz-AM1 和棉铃虫的血球细胞^[6]。为了证实在趋化过程中 Habtl 是否参与了这个过程, Habtl 特异 siRNA 转染细胞后再用重组蛋白进行趋化, 发现重组蛋白对转染了 siRNAF1 和 siRNAF2 的细胞并不表现趋化的能力, 说明 Habtl 在 HearNPV FGF 趋化 Hz-AM1 细胞中起着重要作用, 这个结果也与 Katsuma 等^[9]对 Sfblt 的研究结果一致。同时我们也进行了 siRNA 对病毒 HaCXW1 感染性分

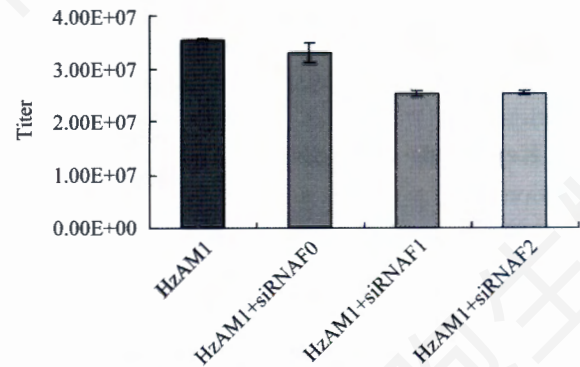


Fig.5 siRNA affect HaCXW1 infection assay

析,实验结果表明转染了 siRNAF1 和 siRNAF2 后,病毒的滴度分别下降了 28.6% 和 28.3%,说明 siRNAF1 和 siRNAF2 下调了 Habt1 表达而影响病毒的感染。

所测得的 Habt1 部分序列与其他 FGFR 序列高度保守提示该基因在昆虫生长发育过程中起着非常重要的作用。由于病毒趋化细胞表现出细胞的特异性^[6],预示着 FGFR 序列的其他部分可能存在差异。

本研究获取了部分 Habt1 的序列,从初步的研究中我们发现 Habt1 在 Hz-AM1 细胞的趋化中起到重要作用,而且对病毒的感染有一定的影响;关于 Habt1 的全长及其它方面的功能尚待进一步研究。

参考文献(References)

- 1 Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7(3): 165-97.
- 2 Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 2004; 20(11): 563-9.
- 3 Glazer L, Shilo BZ. The *Drosophila* FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension. *Genes Dev* 1991; 5(4): 697-705.
- 4 Klambt C, Glazer L, Shilo BZ. Breathless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells. *Genes Dev* 1992; 6(9): 1668-78.
- 5 Katsuma S, Daimon T, Mita K. Lepidopteran ortholog of *Drosophila* breathless is a receptor for the baculovirus fibroblast growth factor. *J Virol* 2006; 80(11): 5474-81.
- 6 Li X, Song J, Jiang T, Liang C, Chen X. The ORF113 of *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus encodes a functional Fibroblast growth factor. *Virolog Sin* 2008; 23(5): 1851-8.
- 7 Chen X, IJkel WF, Tarchini R, Sun X, Sandbrink H, Wang H, et al. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol* 2001; 82(Pt 1): 241-57.
- 8 Chen X, Li M, Sun X, Arif BM, Hu Z, Vlak JM. Genomic organization of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Arch Virol* 2000; 145(12): 2539-55.
- 9 Chen X, Sun X, Hu Z, Li M, O'Reilly DR, Vlak JM. Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus as an improved pesticide. *J Invertebr Pathol* 2000; 76(2): 140-6.
- 10 McIntosh AH, Ignoffo CM. Replication and infectivity of the single-embedded nuclear polyhedrosis virus, *Baculovirus heliothis*, in homologous cell line. *J Invertebr Pathol* 1981; 37(3): 258-64.
- 11 Detvisitsakun C, Berretta MF, Leahy C. Stimulation of cell motility by a viral fibroblast growth factor homolog: proposal for a role in viral pathogenesis. *Virology* 2005; 336(2): 308-17.
- 12 Chen X, Zhang WJ, Wong J, Chun G, Lu A, McCutchen BF, et al. Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *J Gen Virol* 2002; 83(Pt 3): 673-84.
- 13 曾宪东, 南方, 梁昌镛, 宋建华, 王倩, JM Vlak, 等. 苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 iap1 和 iap2 基因功能分析. *中国科学* 2008; 39(2): 193-201.

Isolation and Preliminary Analysis of the Receptor of *Helicoverpa armigera* NPV Fibroblast Growth Factor

Xiang Li, Ai-Hui Jin, Huan Zhang, Jian-Xin Lu*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract Fibroblast growth factor (FGF) is a key regulator of developmental processes affecting the growth, differentiation, and migration of many cell types by activating the receptor and the signal pathway. Baculoviruses such as *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV) also encode a FGF homolog showing chemotactic activity. Here we cloned and analyzed the partial sequence of a fgf receptor (Habt1) from *Helicoverpa zea* cell line, which is permissive for HearNPV infection, by RT-PCR with the primers designed based on the sequences of the FGF receptor of *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda* (Bmbt1 and Sfbt1, respectively). Sequence analysis showed that Habt1 had a high identity to Bmbt1 and Sfbt1. Knock-down of Habt1 expression with special siRNA showed that Habt1 played an essential role for HearNPV FGF mediated chemotaxis and in virus infection.

Key words *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus; fibroblast growth factor; receptor; chemotaxis; infection

Received: November 14, 2009 Accepted: March 12, 2010

This work was supported by Talent Introduction Project of Wenzhou Medical College (No.89207005); Health Project of the Science and Technology Department of Wenzhou (No.Y20080011)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689776, E-mail: jxlu313@163.com