

牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)在细胞内的 DNA 合成动态与形态发生过程

王河 丁明孝 翟中和

(北京大学生物系,北京)

对 IBRV 感染牛肾细胞的 DNA 合成动态以及该病毒在细胞内的形态发生过程进行了研究。病毒 DNA 合成的速度在接种病毒后 6 小时出现一个峰值,随后减慢,并在病毒感染 24 小时前停止。核壳体的出现是在病毒感染后 8 小时细胞的细胞核内,而在这一时期细胞中还可见到极少量的成熟病毒。细胞核内的病毒核壳体装配在接种病毒后 24 小时左右停止,而病毒核壳体的成熟与释放过程则在这一时期达到高潮。

关键词 牛传染性鼻气管炎病毒; DNA 合成; 形态发生

IBRV (Infectious bovine rhinotracheitis virus) 最初发现于 1956 年^[1],属于疱疹病毒科^[2,3]。对 IBRV 的早期研究多出于应用上的需要,随着病毒学研究的深入,才开始将它作为疱疹病毒研究的理想材料,并应用病毒学与细胞学手段对该病毒做了一系列研究工作,包括对病毒在不同细胞内繁殖的研究^[4-7],有关形态发生方面的研究^[8-10],还有涉及病毒的生化特点^[11-12]及用细胞化学方法研究病毒在细胞内复制^[16-18]等方面的工作。我们实验室也对 IBRV 进行了研究^[19]。但缺乏一个 IBRV 在宿主细胞内的 DNA 合成动态和病毒在群体水平上的形态发生过程系统的比较研究工作,而这样的研究将为从理论上进一步研究该病毒及其与细胞间的相互关系等问题提供非常重要的基础。为此我们采用了 IBRV 敏感, DNA 合成处于接触抑制期的致密单层的原代牛肾细胞作材料,在病毒感染后的不同阶段对其 DNA 合成动态及形态发生过程进行了分析。

材料与方 法

(一) 细胞、病毒的培养与繁殖

原代牛肾细胞的培养: 新鲜牛肾取自 2—3 日龄的犊牛,将皮质部分剪成碎块, 37℃ 下,用胰酶(0.25%)—Hanks 溶液消化 2—3 次(共约 90 分钟),将离心收集得到的游离细胞,用 10% 犊牛血清的乳汁液(0.5% 水解乳白蛋白的 Hanks 液,其中含青、链霉素分别为 100 单位/ml、100 μg/ml,下同)悬浮成密度为 $5-10 \times 10^5$ 细胞/ml 的细胞悬液, 37℃ 培养 4—8 天,可长成细胞单层。

原代细胞的传代方法与常规传代方法相同,但是培养液与原代不同 [10% 犊牛血清的 MEM-乳汁液 (MEM 与乳汁液各半)], 一般 4—6 天长成致密单层。原代牛肾细胞一般可顺利传 5—10 代。

病毒的繁殖: 实验所用 IBRV 为匈牙利弱毒株,由中国兽医药品监察所提供,种毒的滴度一般为 $10^{6.5}-10^{7.0}$ TCID₅₀/0.1 ml,在本实验室适应于牛肾细胞传 10—20 代。每个细胞以 20—50 TCID₅₀ 感染单位的病毒溶液接种到长成单层细胞的培养瓶中, 37℃ 吸附 60 分钟后,加入无血清的培养液 (pH7.4 左右), 37℃ 培养, 一般 24—

本文于 1985 年 4 月 4 日收到。

36 小时细胞病变 (CPE) 可达 75% 以上。冻融三次后, 低温下保存待用。

(二) 病毒感染细胞后 DNA 合成动态的测定

将预先在指形培养管中长成致密单层细胞, 在实验前 12 小时换无血清的培养液培养, 12 小时后, 每瓶接入 1ml 新鲜病毒液 (感染单位 ≥ 100 TCID₅₀/细胞), 吸附 60 分钟后换成无血清的培养液, 立即放置 37°C, 一组实验是在接种病毒后 1.5、2.5、6、10、16、24 小时——即在整個病毒感染与细胞病变过程的不同时间点, 另一组实验的时间点的选取是根据上述实验后的 DNA 合成高峰所在时间区域的初步结果, 分别在接种病毒后 4、6、8、10 小时点, 向培养瓶中加入含 ³H-TdR (胸腺嘧啶核苷) 的标记培养液 (³H-TdR 终浓度为 4μCi/ml), 37°C 脉冲标记 30 分钟, 将溶液吸出, 加入预冷的磷酸缓冲液清洗细胞表面后, 加入胰酶消化液, 37°C 消化 5 分钟, 将细胞在消化液中悬浮均匀, 分取 4 等份, 立即加入等体积预冷的 10% 三氯醋酸 (TCA) 溶液, 4°C 保存 1 小时后, 将二份样品, 用 G-49 型滤膜抽滤, 并用 5—10ml 5% 的 TCA (0.1 M 焦磷酸钠), 进一步清洗, 随后用 5ml 乙醇 (100%) 固定。滤膜干燥后, 即可作为非均相液闪测定的样品, 另二份样品则参照改进的 lowry 法^[10]测定蛋白质含量。

液闪测定采用 TPP 4^[12] 非均相测定的闪烁液溶剂系统, Beckman 9800 液闪仪中测定 (测定误差一般低于 10%), 测定结果 (每分钟计数, cpm) 按上述测定样品中的单位蛋白量所代表的细胞数目中的液闪计数进行数据统计。

(三) IBRV 在牛肾细胞内的形态发生过程的电镜及电镜自显影样品制备

将新鲜病毒液接种到致密单层细胞上 (接种量 ≥ 50 TCID₅₀/细胞), 37°C 吸附 1 小时后换成无血清培养液, 37°C 培养, 其中电镜自显影的样品在感染后 2 小时加入 ³H-TdR (终浓度为 1μCi/ml), 分别在接种病毒后 5、8、12、16、24 小时, 按常规方法取材制备电镜及电镜自显影样品^[12]。

结 果

(一) 病毒感染细胞后 DNA 合成的动态

从接种病毒后 1.5、2.5、6、10、16、24 小时时间点取样测定的一组实验中, 得到的初步结果说明, 病毒 DNA 合成的高峰出现在病毒感染后 6 小时左右, 随后 DNA 合成速度明显下降, 并在感染后 24 小时停止。

病毒感染后 1.5—2.5 小时之间, 细胞中 DNA 的合成速度有一不大的下降趋势, 可能是细胞本身 DNA 合成在病毒感染最早期引起的变化。DNA 合成高峰值的出现是在病毒感染 6 小时, 而 10 小时的测定值有了明显的减少, 16 小时点的测定值则下降到了相当于 6 小时点的 45% 左

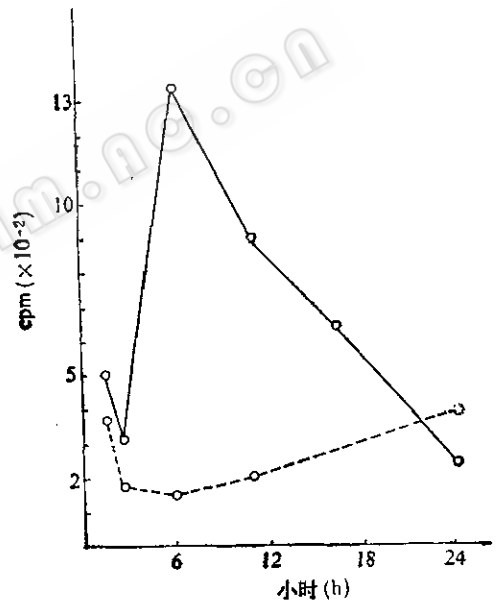


图 1 IBRV 在牛肾细胞内的 DNA 合成动态
接种病毒和未接种病毒的对照细胞在接种病毒后不同时间点, 用 ³H-TdR 标记, 代表 DNA 合成的放射剂量的测定系采用酸沉淀法并进行液闪计数得到。

Fig. 1 Dynamics of IBRV DNA synthesis in bovine kidney (BK) cells

The virus infected and noninfected cells were incubated in the medium which contained ³H-TdR at varies time after infection. Then the radioactivity which represent DNA synthesis in cells was determined by acid precipitation and liquid scintillation counting.

右, 24 小时点的测定数值已低于不接种病毒的对照组。与此同时的不接种病毒对照组的 DNA 合成则始终维持在一比较平稳的低水平。具体的测定数据的变化趋势见图 1。

为了进一步确定 DNA 合成的峰值所在的更精确的时间动态, 我们在上面结果的基础上, 对接种病毒后 4、6、8、10 小时几个时间点又分别进行了测定(图 2)。结果表明, 接种病毒后 6 小时点的 DNA 合成测定值最高, 这是与上面实验的初步结果吻合的。还可明显看到: 4 小时点的 DNA 合成活性已相当高, 而 8 与 10 小时点的测定值则迅速下降。

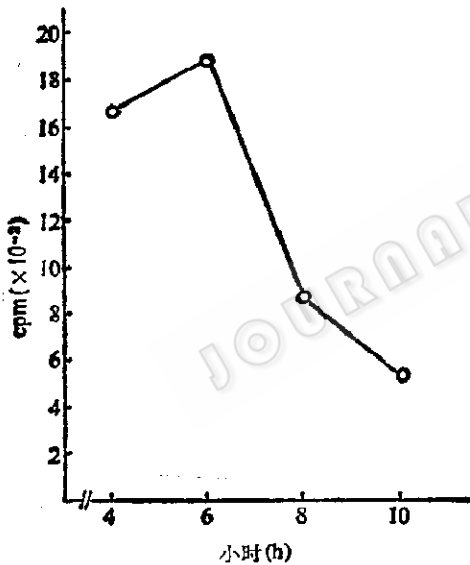


图 2 IBRV DNA 合成高峰值具体时间的测定 (实验条件同图 1)

Fig. 2 Determination of the exact peak time of IBRV DNA synthesis

(Experiments were performed as given in Fig. 1)

上述实验结果表明, 病毒感染 6 小时 DNA 的合成最活跃, 此后 DNA 合成速度虽明显下降, 但不是立即停止, 而是在较低水平上维持一段时间(10 小时以上), 病毒感染 24 小时的 DNA 合成已经停止。

(二) IBRV 在群体水平上的形态发生过程

我们在研究病毒 DNA 合成动态的基础上, 又对病毒的形态发生动态进行了研究, 因为这两者是病毒在宿主细胞内复制过程中的紧密相关又相互衔接的问题, 前者用放射性同位素前体标记的方法进行研究, 而后者则需借助电镜的超微形态学方法来解决。

在病毒感染 5 小时的细胞中(图版 I-1), 不论是细胞核内还是细胞质内都看不到病毒形态发生的迹象, 然而在病毒感染了 8 小时, 也就是病毒 DNA 合成高峰之后 1—2 小时, 在少数细胞(图版 I-2)的细胞核中, 出现了病毒核壳体的结构, 其形态是多样的, 有深染核心的核壳体, 也有浅染, 甚至是空心的核壳体, 它们是分散分布的。上述观察说明, 在病毒感染 8 小时前, 开始了病毒核壳体的装配过程。特别是在极个别的细胞的细胞质内可看到 1—2 个有囊膜的成熟病毒粒子, 尽管是很少见到, 但它标志着病毒核壳体成熟过程的开始。因此, 伴随病毒 DNA 合成高峰的到来后较短的一段时间内(1—2 小时), 病毒核壳体的装配与成熟这两个形态发生的物质基础已经具备。

从病毒感染 16 小时细胞的电镜照片(图版 I-3)可看到, 细胞核内仍有很多病毒核壳体, 一个明显的变化是细胞质内也有很多病毒核壳体, 说明了尽管病毒 DNA 合成已大量减少, 细胞核内病毒核壳体的装配仍在大量进行。另一方面, 伴随这一时期细胞质空泡化的增加和核壳体的存在, 可以在细胞质内见到很多病毒获囊膜(出芽)成熟过程及已经成熟的病毒粒子。从另一张同一时期细胞的电镜自显影照片(图版 II-1)中也能看到类似的情况, 同时可清楚地看到细胞内外的病毒核壳体及成

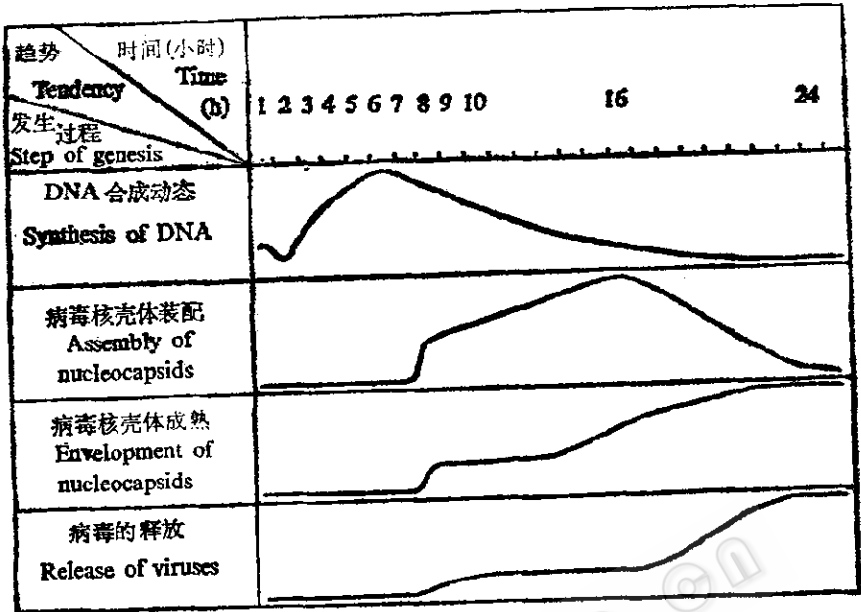


图 3 IBRV 在牛肾细胞中各发生过程的变化趋势
Fig. 3 The tendency of genesis of IBRV in BK cells

成熟病毒可被 $^3\text{H-TdR}$ 标记上。另一个显著的变化是细胞表面出现了成熟病毒颗粒, 标志着病毒释放过程在病毒感染 16 小时前就已开始了。

在病毒感染晚期 (24 小时) 的细胞中 (图版 II-2), 可见细胞核内的病毒核壳体大大减少, 然而不少细胞的细胞质 (图版 II-3) 中仍可看到大量的核壳体和正在成熟及已经成熟的病毒粒子, 细胞外则可见大量的成熟病毒。这些说明, 在病毒 DNA 合成已基本停止 (或已经停止一段时间) 的细胞病变晚期, 细胞核内的核壳体装配已经停止, 而细胞质内病毒的成熟与释放仍在大量进行。

综上所述, 我们对 IBRV 在原代牛肾细胞中的发生有了比较清晰的认识: 即该病毒在细胞内的 DNA 合成动态与形态发生过程有着严格的时间顺序, 首先 DNA 合成在病毒感染 4 小时就已经很活跃, 病毒感染 6 小时时 DNA 合成达到高潮, 随

后很快下降, 并延续到 24 小时前停止。而核壳体的装配则是在病毒感染 8 小时前后开始, 16 小时左右仍很活跃, 但到病毒感染 24 小时左右, 细胞核中的核壳体装配就基本上停止。核壳体的获得囊膜 (成熟) 是出现在装配阶段开始后不久, 但只是在病毒感染 16 小时直至 24 小时前后才是这一阶段的高潮时期。病毒的释放过程则随上述装配与成熟阶段的开始而出现, 在病毒感染 24 小时左右, 即细胞病变的晚期达到高潮 (图 3)。

讨 论

1. 病毒 DNA 合成动态的测定系采用生长良好单层 2—3 天以后的原代细胞。由于是整个细胞样品中 $^3\text{H-TdR}$ 的测定, 为排除存在有细胞自身 DNA 合成对结果的影响, 我们实验选择的细胞是处于接触抑制状态的, 细胞自身的 DNA 合成量是极低的, 如用 $^3\text{H-TdR}$ 对此细胞进行 $^3\text{H-}$

TdR 的标记,光学显微自显影的细胞平均标记率低于5%,总标记量从图1中在接种病毒与对照组最初一段时间(1.5与2.5小时)的测定值看也是相当低的,且该阶段DNA合成的测定值中还有少量是由于酸沉淀方法本身造成的本底值^[23]。可见,此时细胞自身的DNA合成水平是很低的。

对造成宿主细胞裂解的DNA病毒,特别是疱疹病毒,感染细胞几小时内,就可完全抑制宿主细胞的DNA合成^[24]。因此,结合大量病毒在细胞内形成的形态学观察,可以说本实验的测定结果,特别是病毒感染3—4小时后细胞内的DNA合成的动态变化基本上代表了病毒DNA合成的动态变化。

2. 疱疹病毒(包括IBRV)的形态发生的研究是很多的^[8-10,24],但前人工作的特点是偏重对病毒核壳体的装配,成熟与释放过程的具体形态、方式及其在细胞内定位的详细描述,如Jasty和Chang^[9]研究IBRV的工作专门讨论了囊膜的形成及来源,以及核壳体出芽成熟的方式和细胞内的定位等。Zee和Talens^[10]的工作也是类似的。本文则更多地讨论了,病毒在细胞内发生的生化变化之一——DNA合成与形态发生各主要阶段在时间上变化的相互联系,为进一步研究病毒在细胞内的DNA合成及其调节,以及病毒在群体水平上的形态发生的每一具体阶段提供了实验依据。

3. 放射性同位素前体掺入到细胞内的酸不溶成份(蛋白质与核酸大分子均在其中)作为测定DNA合成状况的方法是比较成熟的^[25,26],本实验在具体步骤上有所改变,但所测得的数值比较平行,说明方法可靠。

4. 对细胞进行统计(作为液闪测定的比较标准)的误差是比较大的(特别对于原

代细胞),故本实验采用测定蛋白质含量,并以相同的蛋白含量近似的代替相同的细胞数量作为放射性同位素测定的比较标准。

5. 在形态发生过程的观察中,我们看到细胞病变晚期(病毒感染24小时)的细胞质中仍有大量裸露的核壳体及大量病毒核壳体获囊膜过程,这与前人报道的IBRV形态发生过程^[9,10]有所不同,有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Mardin, S. H. et al.: *Science*, **124**: 721, 1965.
- [2] Armstrong, J. A. et al.: *Virology*, **14**: 276, 1961.
- [3] Cruickshank, J. G. and D. M. Berry: *Virology*, **25**: 481, 1965.
- [4] York, C. J. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **94**: 740, 1957.
- [5] Cabasso, V. J. et al.: *ibid.*, **95**: 471, 1957.
- [6] Orsi, E. V. and V. J. Cabasso: *ibid.*, **98**: 637, 1958.
- [7] Rouhandeh, H.: *Nature*, **200**: 386, 1963.
- [8] Gronyer, I. et al.: *Canad. J. Microbiol.*, **8**: 373, 1962.
- [9] Jasty, V. and P. W. Chang: *Am. J. Vet. Res.*, **32**: 1945, 1970.
- [10] Zee, Y. C. and L. Talens: *J. Gen. Virol.*, **17**: 333, 1972.
- [11] Russell, Wm. C. and L. V. Crawford: *Virology*, **22**: 288, 1964.
- [12] Stevens, J. G.: *Virology*, **29**: 570, 1966.
- [13] Stevens, J. G. and N. B. Groman: *J. Bacteriol.*, **87**: 446, 1964.
- [14] Zuffa, J. et al.: *Acta. Virology*, **14**: 495, 1970.
- [15] Plummer, G. et al.: *ibid.*, **39**: 134, 1969.
- [16] Sabina, L. R.: *Can. J. Microbiol.*, **11**: 887, 1965.
- [17] Jasty, V. and P. W. Chang: *Am. J. Vet. Res.*, **33**: 1945, 1970.
- [18] Jasty, V. and P. W. Chang: *ibid.*, **31**: 1943, 1970.
- [19] 翟中和等: *微生物学报*, **23**: 275, 1983.
- [20] Schleif, R. F. and P. C. Wensink: in "Practical Method in Molecular Biology", Springer-Verlag Press, New York, pp. 75—76, 1981.
- [21] Fox, B. W.: in "Techniques of Sample

Preparation for Liquid Scintillation Counting", Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1976.

- [22] 翟中和、丁明孝: 中国科学, 2: 121, 1982.
[23] Morley, C. G. D. and H. S. Kingdon: *Anal. Biochem.*, 45: 298, 1972.
[24] Roizman, B. and D. Furlong: in "Compre-

hensive Virology", Fraenkel-Cohrat and R. R. Wagner (eds), Plenum Press, New York, Vol. 3, pp. 335—342, 1974.

- [25] Ball, C. R. et al.: in "Method in Cell Biology", Academic Press, New York, Vol. 7, pp. 349—360, 1973.
[26] Painter, R. B.: *Nature*, 265: 650, 1977.

DYNAMICS OF DNA SYNTHESIS IN IBRV(INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS VIRUS) INFECTED CELLS AND THE MORPHOGENESIS OF THE VIRUSES

Wang He Ding Mingxiao Zhai Zhonghe
(Department of Biology, Peking University, Beijing)

The dynamics of DNA synthesis in IBRV infected cells and the morphogenesis of the viruses in bovine kidney cells were investigated.

Six hours after infection with IBRV, the rate of DNA synthesis in cells reached a peak and then decreased gradually and finally stopped within 24 hours. Nucleocapsids were initially seen in the nuclei 8 hours after infection with IBRV. A few enveloped mature viruses were seen at the

same time. Twenty-four hours after infection, few nucleocapsids could be seen in the nuclei, however, the envelopment of nucleocapsids in the cytoplasm and viral release from cell surface took place at high speed at the same time.

Key words

Infectious bovine rhinotracheitis virus; DNA synthesis; Morphogenesis

图 版 说 明

图 版 I

1. IBRV 感染 5 小时的牛肾细胞。看不到任何病毒形态发生的迹象($\times 26,000$)。2. IBRV 感染 8 小时的牛肾细胞。细胞核内出现核壳体结构,并可见细胞质内很少量的已获囊膜的病毒粒子($\times 25,100$)。3. IBRV 感染 16 小时的牛肾细胞。细胞核质内均有许多病毒核壳体,细胞质内可见到已经成熟的和正在获囊膜过程中的病毒,同时可见表面已出现成熟的病毒粒子 ($\times 18,000$)。

1. BK cell 5 hours after infection with IBRV. No evidence of viral morphogenesis can be seen. 2. BK cell 8 hours after infection with IBRV. Nucleocapsids (nc) emerge in the cell nucleus, a few enveloped viral particles can be also seen in the cytoplasm. 3. BK cell 16 hours after infection with IBRV. Many nucleocapsids (nc) are both in the nucleus and cytoplasm. Envelopment of nucleocapsids and enveloped viral particles in cytoplasm, mature viruses on the cell surface can be seen.

图 版 II

1. IBRV 感染 16 小时的牛肾细胞。病毒发生过程各阶段的各种不同形式均可被 $^3\text{H-TdR}$ 标记上 ($\times 9,750$)。2. IBRV 感染 24 小时的牛肾细胞。可见细胞质囊泡中的大量核壳体获囊膜,同时可见细胞表面很多病毒粒子($\times 14,400$)。3. IBRV 感染 24 小时的牛肾细胞。在病毒感染晚期的细胞质中,仍可见大量裸露的核壳体,而细胞核内则很少($\times 19,800$)。

1. BK cell 16 hours after infection with IBRV. Viruses at different developmental stages are labeled with $^3\text{H-TdR}$ by EM-ARG. 2. BK cell 24 hours after infection with IBRV. Viruses at different envelopment stages in the cytoplasmic vacuoles, and many mature viruses on the cell surface can be easily seen. 3. BK cell 24 hours after infection with IBRV. Many naked nucleocapsids still remain in the cytoplasm at late stage of infection, but few are seen in the nucleus.