

辛德毕斯病毒在 BHK-21 细胞中繁殖过程的研究

梁凤霞 谢建新 张 琼 丁明孝 翟中和

(北京大学生物学系, 北京 100871)

辛德毕斯病毒 (Sindbis virus) 在 BHK-21 细胞中繁殖的一步生长曲线表明, 病毒感染后 2 小时便可产生大量的子代病毒; 感染后 6 小时, 病毒滴度达到最高峰, 为 10^9 TCID₅₀/ml。电镜技术显示了病毒粒子的形态结构与形态发生过程。本文还对 SbV 的代谢合成动态及对宿主细胞的影响进行了研究和讨论。

关键词 辛德毕斯病毒; 病毒的繁殖; BHK-21 细胞

辛德毕斯病毒 (Sindbis virus, 以下简称 SbV) 是一种正链 RNA 病毒, 属披盖病毒科, 甲病毒属。SbV 增殖快, 宿主细胞范围广, 且子代病毒的繁殖量高, 因而不仅成为分子生物学的理想材料^[1], 而且可望成为遗传工程的新的载体^[2]。我们拟以 SbV 感染的 BHK-21 细胞为模式, 进一步探索病毒如何有效地利用宿主细胞代谢机器来完成自身复制这一重要课题。为此, 有必要对 SbV 的繁殖过程有个基本的了解。鉴于 SbV 在我国尚未见报道, 因此, 本项研究运用多种实验技术, 从不同方面较系统地研究了 SbV 在 BHK-21 细胞中繁殖的基本特征。

材 料 与 方 法

(一) 病毒与细胞

SbV 由美国华盛顿大学医学院 Schlesinger 教授提供, 培养病毒所用细胞为 BHK-21 传代细胞系。按 TCID₅₀ 法测量病毒的滴度^[3]。

(二) 电镜样品的制备

将 SbV 接种于长成良好单层的 BHK-21 传代细胞, 当病毒感染 1、3、5、7 小时后, 分别按常规方法制备超薄切片、冰冻蚀刻与扫描电镜样品, 并纯化病毒制备负染色样品。

(三) 免疫荧光与免疫电镜样品制备

为了研究病毒囊膜蛋白在细胞表面与细胞内部的分布, 在病毒感染 4 和 6 小时后, 按常规方法用抗 SbV 囊膜蛋白 E2 的抗体 (由 Schlesinger 教授惠赠) 对细胞表面和细胞内部进行免疫荧光标记^[4], 进而应用免疫胶体金技术, 对病毒感染 6 小时的细胞表面进行免疫冰冻蚀刻的研究^[5]。

(四) 显微与电镜放射自显影

本文于 1992 年 5 月 13 日收到。

本课题得到高等学校博士学科点专项科研基金资助。

在病毒感染 0、1、3、5 和 7 小时后, 分别用 ^3H -尿嘧啶核苷 (^3H -U) 脉冲标记 10 分钟, 样品经洗涤、固定后, 按常规程序制备显微与电镜放射自显影样品^[6], 显微放射自显影的标记液中 ^3H -U 的浓度为 $4\mu\text{Ci/ml}$, 曝光时间为 5—6 天, 电镜放射自显影的标记液中 ^3H -U 的浓度为 $50\mu\text{Ci/ml}$, 曝光时间为 45 天。

(五) 细胞内蛋白质合成

在病毒感染 2 小时和 6 小时后, 分别用 ^{35}S -甲硫氨酸 (终浓度为 $20\mu\text{Ci/ml}$, 比强 $600\mu\text{Ci/mmol}$, Amersham) 脉冲标记 30 分钟, 追踪 30 分钟后, 裂解细胞并进行 SDS-PAGE^[7] 与放射自显影分析。

(六) 细胞松弛素 B 与秋水仙素处理对病毒成熟释放的影响

BHK-21 细胞长成良好单层后, 用含细胞松弛素 B (终浓度分别为 $10\mu\text{g/ml}$, $20\mu\text{g/ml}$, $30\mu\text{g/ml}$, Sigma 公司) 或秋水仙素 (终浓度分别为 $10\mu\text{mol/L}$, $20\mu\text{mol/L}$, $30\mu\text{mol/L}$, $50\mu\text{mol/L}$ 及 $100\mu\text{mol/L}$, Fluka 公司) 的培养液分别处理细胞 2 小时, 然后接种 SbV, 接毒量为 $200\text{TCID}_{50}/\text{细胞}$, 37°C 感染 1 小时, 继续培养 6 小时后取样, 按常规方法测定毒价^[3]。

结 果

(一) SbV 繁殖的一步生长曲线

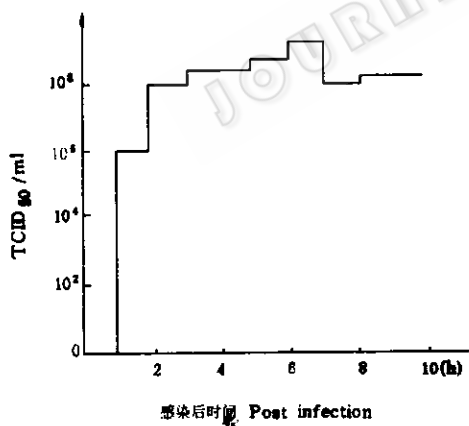


图 1 SbV 复制的一步生长曲线

Fig. 1 One step growth curve of SbV in BHK-21 cells

(二) 病毒的形态结构与大小

在 SbV 感染 2 小时的细胞表面即可观察到正在释放的病毒。在感染 6 小时的细胞表面常常可观察到较多的病毒粒子。成熟的病毒粒子呈球形, 超薄切片中可清楚地显示出它是由电子致密的核心和囊膜组成, 核心直径约 36nm (图版 I-E 箭头), 元素分析电镜证明其中含有大量的磷元素, 冰冻蚀刻技术可进一步显示出病毒囊膜的精细结构。SbV 囊膜的 EF

根据病毒感染后不同时间所测得的子代病毒的滴度绘制 SbV 在 BHK-21 细胞中繁殖的一步生长曲线 (图 1)。病毒感染后 2 小时病毒滴度达 $10^8\text{TCID}_{50}/\text{ml}$, 增加约 1000 倍, 说明从病毒侵染直至子代病毒产生在 2 小时内即可完成。根据被感染的细胞数可以推算出, 在以后的几小时中, 病毒在每个细胞内以每小时 400TCID_{50} 的速率向外释放。至感染后 6 小时, 病毒滴度达到最高峰为 $10^9\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。随后滴度略有下降, 在这个过程中平均每个细胞的产毒量为 2000TCID_{50} 以上。显微形态学观察表明病毒感染 6 小时, 病变细胞开始出现, 7 小时左右 50% 的细胞出现 CPE, 感染 8 小时后部分细胞已开始脱落。

与 PF 面上很少观察到直径 4—9nm 的膜内微粒, 但无论在 EF 或 PF 面的某些区域, 均可分辨出来一些大小 8—10nm, 多角形的中空亚单位结构 (图版 I-C 箭号)。它们常常呈类晶格状排列, 这在以前的电镜研究中尚未见报道。偶尔也可观察到从中部断裂的病毒粒子, 可以清楚地显示出中央 36nm 的病毒核心与周围直径约 11nm 的囊膜蛋白 (图版 I-D 箭头), 显然这些蛋白是以多聚体的形式存在。

我们比较了在超薄切片、负染色、冰冻蚀刻、整装细胞及扫描电镜等样品中 SbV 的形态与大小, 其形态均近似球形, 但大小有所差异。超薄切片中的病毒粒子较小, 直径约 50—60nm, 冰冻蚀刻中的病毒粒子较大, 约 70—80nm, 这在很大程度上反映出不同制样方法对所观察的病毒大小的影响^[8]。

(三) SbV 的代谢合成与形态发生

电镜放射自显影结果显示, 在病毒感染后 1 小时, 细胞质中已可观察到标记银粒, 说明已有病毒 RNA 的合成, 感染 3—5 小时, 细胞质中标记银粒明显增加。感染 6 小时后, 标记银颗粒逐渐减少。为了研究病毒蛋白质合成, 在病毒感染后 2 小时与 6 小时分别用 ³⁵S-蛋氨酸脉冲标记 SbV 感染的细胞。凝胶电泳结果表明, 在 SbV 感染 2 小时后, 病毒的衣壳蛋白和二种囊膜蛋白已开始大量合成, 感染 6 小时细胞中合成的蛋白质几乎都是 SbV 的结构蛋白。

在 SbV 形态发生中的一个很有趣的现象是, 在病毒感染 2 小时后就观察到细胞质膜上出芽释放的子代病毒, 但却很难观察到装配好的核衣壳。很可能核衣壳运送到细胞质膜上的速度大大超过病毒出芽释放的速度。免疫荧光结果表明, 囊膜蛋白在细胞表面呈不均匀分布 (图版 I-A、B), 免疫冰冻蚀刻技术进一步显示在细胞质膜上囊膜蛋白分布的区域性 (图版 I-F)。病毒出芽的动力主要靠囊膜蛋白与衣壳蛋白之间的作用力。因此, 囊膜蛋白分布的区域性显然与病毒粒子出芽释放的区域性有关。

囊膜蛋白转运到细胞质膜上与核衣壳转运到质膜下的机制尚不清楚, 我们用浓度为 10—30 μ g/ml 的细胞松弛素 B 和 10—100 μ mol/L 秋水仙素分别作用于感染的细胞, 结果病毒的滴度无明显的改变 (图 2)。

SbV 感染的细胞中未曾观察到明显的病毒工厂结构。在电镜放射自显影的样品中银颗粒标记部分与周围的细胞质也未见明显的区别, 只是在病毒感染晚期的细胞中有时可观察到较多的核衣壳围绕在细胞质囊泡周围, 偶尔还可见到向细胞质空泡中出芽释放的现象。

(四) 对宿主细胞的影响

SbV 感染 2 小时后, 细胞中蛋白合成大大减少, 6 小时后几乎完全被抑制, 但对细胞 RNA 合成却表现出选择性的抑制作用。即在病毒感染 3 小时后, RNA 的合成仅为对照组

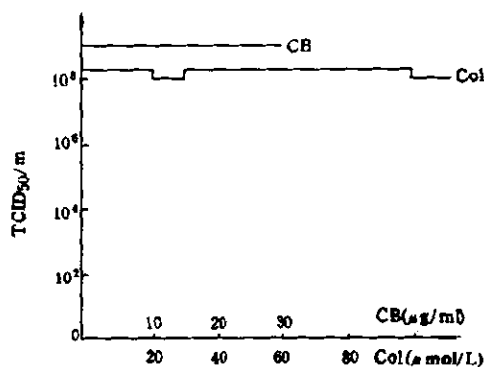


图 2 病毒滴度与细胞松弛素 B(CB) 及秋水仙素 (Col) 的浓度关系曲线

Fig. 2 The relationship between viral titers and concentration of cytochalasin B or colchicine

的 17%, 但 rRNA 合成却与对照组细胞几乎维持在同一水平上 (图 3), 甚至在病毒感染 8 小时的细胞中, 核仁仍在活跃地合成 rRNA (图版 I-G)。

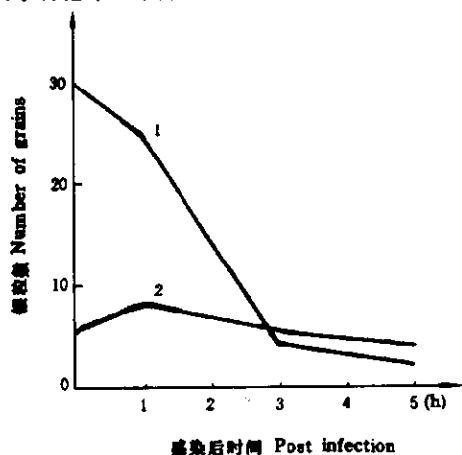


图 3 SbV 的复制对宿主细胞 RNA 合成的影响

Fig. 3 The effect of SbV replication on RNA synthesis of BHK-21 cells

1、2 分别代表 SbV 感染 0、1、3 和 5 小时后显微放射自显影样品中宿主细胞的核质 (1) 及核仁 (2) 内分布的银颗粒平均数
0.1, 3 and 5 hours postinfection, the cells were subjected to microscopic autoradiography. The average number of grains in nucleus (1) or nucleolus (2) of 50 host cells were counted

一步生长曲线与前人报道的在鸡胚细胞中的生长曲线有所区别^[9], 子代病毒大量释放比在鸡胚中提前 1 小时左右, 病毒滴度高峰出现在感染后 6 小时, 比鸡胚细胞早 2 小时左右, 这可能反映 SbV 在不同细胞中或不同的实验条件下繁殖的差异。

2. 早期的形态学工作认为 SbV 囊膜的 EF 和 PF 面上均比较光滑^[10], 我们的工作显示了病毒囊膜上囊膜蛋白的“亚单位”结构的存在。这一结果与近年来高分辨电镜和分子生物学的研究结果相吻合^[11]。

3. 本实验用免疫荧光进而用免疫冰冻蚀刻技术显示了囊膜蛋白在细胞质膜上的分布, 这种斑块状的区域性的分布显然有利于病毒的迅速成熟与释放, 其分布形成的原因尚有待于进一步的研究。

4. 细胞松弛素 B 处理的实验结果与前人工作类似^[12], 但秋水仙素作用 SbV 感染的宿主细胞尚未见报道。目前已发现数种与微管微丝结合的动力蛋白, 它们在细胞中囊泡与颗粒物质转运中起重要的作用。既然在 100 μmol/L 高浓度的秋水仙素和 30 μg/ml 的细胞松弛素 B 存在的条件下, SbV 仍能正常地出芽释放, 意味着 SbV 蛋白的核衣壳与囊膜蛋白的定向转运可能依靠微管微丝以外的另一种转运机制。

5. SbV 对宿主细胞 RNA 合成选择性的抑制作用也是一个非常有趣的问题。我们发现 SbV 的非结构蛋白 nsp2 进入细胞核, 并在核仁处富集。这是否与宿主细胞 rRNA 的持续转录有关, 也是一个尚待进一步探讨的问题。

讨 论

作者综合多种实验技术, 对提出的问题从不同的侧面进行了探讨。实验结果不仅对 SbV 在 BHK-21 细胞中的繁殖过程有一个基本的较全面的了解, 同时也对前人的工作做了某些新的补充。

1. SbV 在 BHK-21 细胞中繁殖的一

参 考 文 献

- [1] Schlesinger, S. et al.: The Togaviridae and Flaviviridae, pp.35—90, Plenum, New York, 1986.
- [2] Levis, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 4811—4815, 1987.
- [3] Kuchler, R. J.: *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, p.144, Hutchinson & Ross, Inc., Bowden, 1977.
- [4] 许 屏: 荧光和免疫荧光染色技术, 第 92—93 页, 人民卫生出版社, 北京, 1983 年.
- [5] Liang, F. X. et al.: *Proc. of Int. 4th Beijing Conf. and Exhib. on Instrum. Analysis*, A145, 1991.
- [6] Ding, M. X. et al.: *Scientia Sinica(B)*, **26**: 365, 1983.
- [7] Laemmli, U. K.: *Nature (London)*, **277**: 680, 1970.
- [8] Ding, M. X. et al.: *Pro. of the XII ICEM*, p.580, 1990.
- [9] Schlesinger, S. et al.: The Togaviridae and Flaviviridae, p.53, Plenum, New York, 1986.
- [10] Dennis, T. B. et al.: *J. of Virol.*, **10**(3): 524—536, 1972.
- [11] Richard, P. A. et al.: *ibid.*, **65**(3): 1187—1194, 1991.
- [12] Griffin, J. et al.: *J. Exp. Med.*, **150**: 379, 1979.

THE MULTIPLICATION OF SINDBIS VIRUS IN BHK-21 CELL

Liang Fengxia Xie Jianxin Zhang Qiong Ding Mingxiao Zhai Zhonghe
(Department of Biology, Peking University, Beijing 100871)

One step growth curve of Sindbis virus (SbV) in BHK-21 cells showed that a lot of progeny viruses could be observed at 2 hr. after infection. The titer of virus reached the highest about 10^9 TCID₅₀/ml at 6hr. post infection. The viral morphological characters and morphogenetic process in BHK-21 cells were examined by electron microscopic techniques. The dynamics of viral proteins synthesis and the effect on host cell were studied and discussed in this paper.

Key words Sindbis virus; Multiplication; BHK-21 cell

图 版 说 明

Explanation of plate

A、B. 免疫荧光染色显示 SbV 的 E₂ 蛋白在宿主细胞质膜上的分布。A: 感染后 4 小时, B: 感染后 6 小时 (×200)。C、D. SbV 感染 BHK-21 细胞的冰冻蚀刻图片。C. 在某些区域可分辨出 SbV 的囊膜上大小 8—10nm 多角形的中空亚单位 (箭头), 它们有时呈类晶格状排列 (×230000)。D. 从中部断裂的病毒粒子可以清楚地显示出中央的病毒核心 (箭头) 与周围直径约 11nm 的囊膜蛋白 (箭头)(×220000)。E. SbV 感染 BHK-21 细胞的超薄切片图片显示球形的病毒粒子 (箭头) 及电子致密的病毒核心结构 (箭头)(×200000)。F. 免疫冰冻蚀刻技术显示 SbV 囊膜蛋白 (标记胶体金直径 20nm) 在宿主细胞质膜上的分布 (箭头)(×91000)。G. SbV 感染 8 小时后 ³H-U 脉冲标记的电镜放射自显影图片。核仁丝状区依然标记有银颗粒, 说明 rRNA 仍在转录 (×26000)。

A,B. Immunofluorescent staining of SbV-infected BHK-21 cells with anti-E₂ antibody showing the distribution of viral envelope protein on cytoplasm membrane(A:4 h p. i., B:6 h p. i.). C, D. Freeze-fracture replica of BHK-21 cells infected with SbV. C. Polygon hallow subunits with 8—10nm in diameter could be distinguished in some region of SbV envelope(arrow). D. Freeze-fracture replica showing the nucleocapsid(arrow head) and the surrounding envelope protein complex about 11nm in diameter(arrow). E. Thin sectioning of SbV-infected BHK-21 cells. F. Immuno-freeze fracture replica of BHK-21 cells infected with SbV showing the distribution of viral envelope protein on cytoplasm membrane (20nm gold particles). G. Electron microscopic autoradiography of SbV-infected BHK-21 cells. Late infection(8 h p. i.), the nucleolus was obviously marked by silver grains, showing that an active synthesis of rRNA was proceeding in the nucleolus.