

## 脊髓灰质炎病毒进入细胞过程的初步分析

李琦涵 姜莉 Marie Chow\*

(中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650107)

\*(Dept. Microbiology &amp; Immunology, UAMS, USA)

R373, 22

**A** 摘要 利用经典技术, 着重分析了脊髓灰质炎病毒穿越细胞膜时的结构变化, 探讨了脊灰病毒的结构变化与其进入细胞的关系, 并研究了脊灰病毒壳蛋白 VP4 在病毒穿膜过程中的作用功能。提出了关于脊灰病毒穿越细胞膜的理论模型。

关键词 脊髓灰质炎病毒, 进入细胞, 结构, 受体

脊髓灰质炎病毒(Poliovirus, 简称脊灰病毒)属于小核糖核酸类病毒<sup>[1]</sup>, 长期以来对它的分子生物学研究已明确了它的结构特征和细胞内感染过程的分子机理<sup>[2]</sup>。目前尚不清楚的问题是该病毒在感染细胞的过程中, 病毒颗粒进入细胞的机理, 特别是病毒的结构变化与它穿越细胞膜过程之间的特定关系。已有的实验结果表明<sup>[3]</sup>: 脊灰病毒在进入细胞时, 有一个结构上的变化, 其物理表征是病毒颗粒的浮力密度由 160 s 变为 135 s, 此变化是由其结构上丧失了壳蛋白之一的 VP4 后导致的<sup>[4]</sup>。该脱下的 VP4 的功能及其去向亦尚无结论。尽管已经知道脊灰病毒吸附细胞的过程事实上是病毒与细胞表面的相应受体结合的过程<sup>[5]</sup>, 但此过程与病毒颗粒由 160 s → 135 s 变化的关系, 与脱落的 VP4 的关系等, 都还没有充分的探讨。因此, 根据所认识到的脊灰病毒严格而饶有趣味的结构知识可以想见: 该病毒进入细胞的过程牵涉到其构象变化和其蛋白与受体相互作用的复杂过程, 并极有可能遵循一定的规律。毫无疑问, 这方面的研究是极有意义的, 因为这直接与抗病毒药物的设计研制相关。本研究就是对此问题所作的探讨。

## 材料与amp;方法

- 1 细胞与病毒** HeLa 细胞: 悬浮培养于含 6% 牛血清的 MEM 培养液中, 100 u/mL 青霉素, 20 μg/mL 链霉素, 37℃; 单层细胞生长于含 6% 牛血清的 DMEM 培养液中, 100 u/mL 青霉素, 20 μg/mL 链霉素, 37℃。病毒: Polio I 型, Mahoney 株。滴度测定: 使用单层 HeLa 细胞, 按常规蚀斑方法测定<sup>[6]</sup>。
- 2 <sup>35</sup>S-甲硫氨酸标记病毒** 病毒以 1 pfu/细胞量接种经 PBS 洗过的 HeLa 细胞, 室温吸附 30 min, 加入无甲硫氨酸的 MEM 无血清培养液, 37℃ 悬浮培养, 感染后 15 min, 加放线菌素 D, 100 μg/mL; 感染后 3 h 标记<sup>35</sup>S-甲硫氨酸(NEN 公司产品), 50 μCi/mL, 感染后 6 h, 收集细胞, 悬浮于 10 mL 含 1% NP-40 的 RSB 缓冲液(Tris·HCl 10 mmol/L, pH 7.3; MgCl 10 mmol/L), 4℃ 10 min, 2 000 r/min 10 min, 去除细胞核, 上清 45 000 r/min 1 h(Beckman, Ty65 转头), 收集沉淀, CsCl 密度梯度离心<sup>[7]</sup>, 38 000r/min 17 h(Beckman, Ty65 转头), 收集纯化病毒带, PBS 中透析 24 h, 测定滴度, -20℃ 储存备用。

- 3 病毒吸附、感染细胞样品的收集与处理 悬浮培养的 Hela 细胞,离心沉淀, PBS 洗两次,取总量  $2.4 \times 10^8$  细胞,感染已标记病毒, 10 pfu/细胞, 4 ℃ 吸附 1 h, PBS 洗去未吸附病毒,加入 6 mL 无血清 MEM 培养液, 37 ℃ 悬浮培养自 2、10、20、30、45 和 60 min 各收集 1 mL 样品(约  $6 \times 10^7$  细胞),沉淀细胞,收集培养液上清, 4 ℃ 储存,细胞加 B 缓冲液 4 mL(Tris·HCl 50 mmol/L, pH 7.2, KCl 10 mmol/L, PMSF 10 μg/mL)悬浮,置玻璃匀浆器磨碎细胞, 2 000 r/min, 10 min 去除细胞核, 45 000r/min 20 min (Beckman SW51 转头)沉淀细胞膜成分,上清为细胞质成分,将沉淀的细胞膜成分悬浮于 0.5 mL 含 1% NP-40 的 B 缓冲液,超声波处理,低速离心,去除沉淀,储存 4 ℃。
- 4 蔗糖密度梯度离心 使用梯度混合仪(Beckman)制备 15~30% 蔗糖梯度管,管容量 12 mL,分别加培养液,细胞膜和细胞质样品于梯度顶端,并制备病毒对照, 38 000 r/min, 2.5 h(Beckman, SW40 转头), 4 ℃。从梯度顶端取样 300 μL/样品,按比例取检测样品,液闪仪检测 cpm 值。
- 5 SDS-PAGE 按标准<sup>[6]</sup>方法制备 12% SDS-PAGE 凝胶,培养液和细胞膜样品按比例定量后上样电泳, 90 V, 2 h,干胶后于 X-负片(柯达)曝光过夜。

## 结 果

### 1 病毒感染细胞后,病毒颗粒群体的分布

在脊灰病毒感染的初期,参加感染的病毒均吸附于细胞膜上,随着感染时间的推移,细胞膜上的病毒量逐渐减少,减少的幅度在 10 min 内最明显;同时,细胞外的病毒量逐渐增加,其幅度在 10 min 内最为明显;进入细胞内的病毒则始终占极小比例(3%左右)。根据以往的认识,这个差距较大的比例是由于具有感染性的毒粒与病毒颗粒总数之间的比例所决定的。一般认为这是因为在病毒颗粒群体中,大多数病毒颗粒是具有缺陷性结构所致,但此观点并未得到实验的证实。结果见图 1。

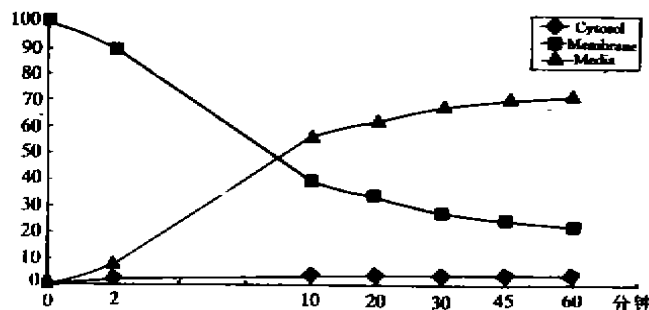


图 1 病毒感染细胞后其群体分布

Fig 1 Distribution of poliovirus population as it infected cells

### 2 不同分布的病毒颗粒构象在不同时相的变化

2.1 细胞外 结果见图 2a。结合图 1 从各个时相的密度梯度离心分析结果可以发现,细胞外的病毒群体均来自吸附于细胞膜上的群体,病毒的数量随着时间的推移而逐渐增加。同时绝大多数来自膜的病毒颗粒已变为 135 s,极少数 160 s 颗粒估计来自悬浮培养时的搅拌对吸附于细胞的病毒颗粒的机械作用。

2.2 细胞膜 结果如图 2b 所示,可看出有三个特点:首先是感染开始之前,膜上所吸附的颗

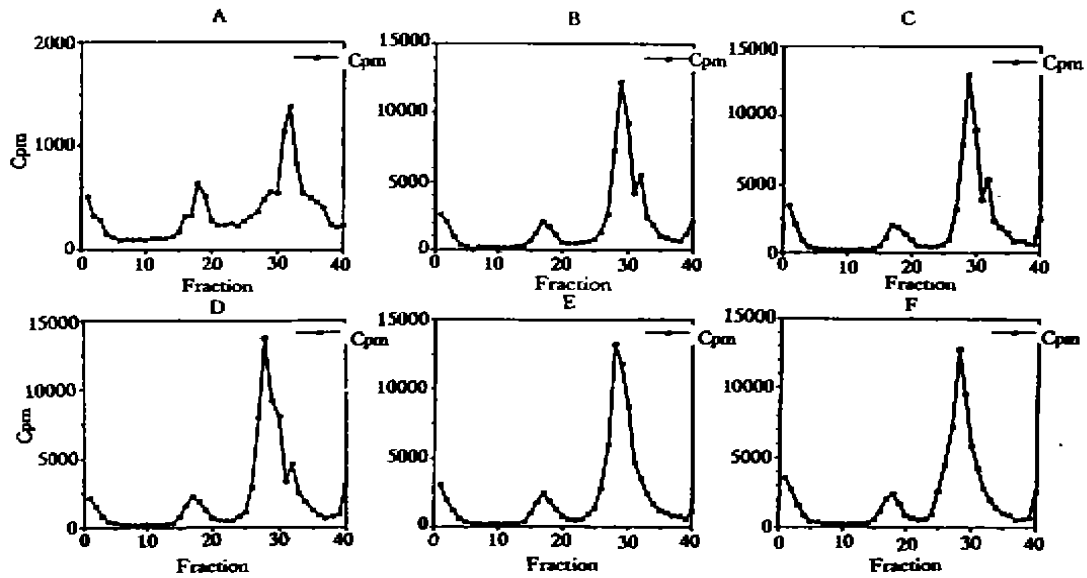


图 2a 病毒颗粒在不同感染时相上的变化(细胞外)

A、B、C、D、E、F 分别为病毒感染细胞后 2、10、20、30、45、60 min 的样品

Fig 2a The configuration change of poliovirus at different infection stages(outside of cells)

A, B, C, D, E, F respectively, is the sample of 2, 10, 20, 30, 45, 60 min p. i.

粒均为 160 s;其次为随着感染过程的推移,膜上的病毒数量逐渐减少;再就是这个减少过程实质上就是 160 s 向 135 s 颗粒转变并脱离细胞膜的过程。从这个结果至少可以明确,单纯的病毒与受体的结合并不意味着可以导致病毒结构的变化,它需要 37 ℃ 的温度条件,根据我们关于 VP4 的研究报道<sup>[9]</sup>,37 ℃ 时在生理平衡缓冲液中的病毒构象有一个有趣的变化,特点就是位于壳体结构内部的 VP4 暴露到毒粒的表面,这两个结果意味着:病毒在膜上的结构改变是壳蛋白 VP4 暴露于毒粒表面之后再与受体作用而导致的,是为其穿越细胞膜进入细胞创造的一个特殊条件。

2.3 细胞内 结果如图 2c 所示,清楚地表明最终进入细胞内的病毒是 135 s 颗粒,然后 135 s 颗粒逐渐完全转变为 80 s 颗粒,这显然是 135s 颗粒在细胞内释放出病毒 RNA 以便进行复制和翻译过程,而 80 s 的病毒空壳最终被降解。

### 3 细胞外和细胞膜上病毒颗粒的壳蛋白组成

3.1 细胞外病毒的壳蛋白组成 结果如图 3a 所示,这里的 SDS-PAGE 胶分析显示,其 VP1、VP2 和 VP3 组成无异常,但相对 VP4 的比例减少,尤其是在后期。

3.2 细胞膜上病毒的壳蛋白组成 结果如图 3b 所示,进一步证实了图 3a 的结果,尽管随着感染时间的推移,膜上的病毒量在减少,但 VP4 的量仍呈增加的状况,即大量的病毒吸附于膜上,160s 转变为 135s 再脱落的过程是将 VP4 留在细胞膜上。

## 讨 论

现有关于脊灰病毒穿膜过程的模型认为<sup>[3]</sup>:当病毒与相应受体结合后,启动某种机制,细

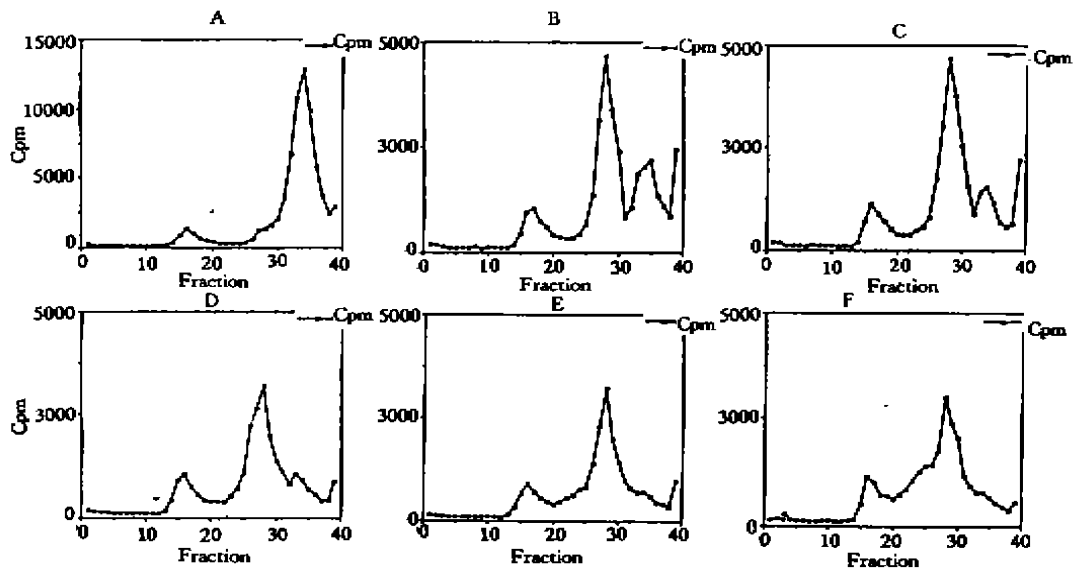


图 2b 病毒颗粒在不同感染时相上的变化(细胞膜)

A, B, C, D, E, F 分别为病毒感染细胞后 2, 10, 20, 30, 45, 60 min 的样品

Fig 2b The configuration change of poliovirus at different infection stages (membrane of cells)

A, B, C, D, E, F, respectively, is the sample of 2, 10, 20, 30, 45, 60 min p. i.

胞以一种内吞的方式将病毒饮入细胞内。这显然是不完全的, 首先这不能解释病毒穿膜过程中的结构变化; 亦无法说明其感染颗粒的数量比例关系等。本文尽管尚不能提供完全的证据, 但现有的实验结果已可以从两个方面的分析完善这个模型。

以往的实验认为: 在病毒颗粒的群体中, 具有感染性的毒粒仅占颗粒总量的  $1/25 \sim 1/200$ , 其根据是感染细胞的颗粒数量与其感染滴度之间的比例数而确定的。但事实上, 并没有任何直接的资料肯定这  $1/25 \sim 1/200$  以外的病毒颗粒是否为自身结构或功能的缺陷而不具有感染性。本研究也再次证实了最终进入细胞的病毒数量仅为所用病毒的 3% 以下, 但同时引起我们注意的几个现象却并未否定其余病毒的正常结构与功能: 首先, 所有病毒在感染过程开始以前均吸附到细胞膜上(图-1), 感染开始后, 逐渐脱离细胞膜; 第二, 这些病毒在脱离细胞膜之前, 均发生了结构上一致的变化, 即变为 135 s 颗粒, 丢失了 VP4(图-2a, b); 再者, 最终进入细胞的病毒亦为 135 s 颗粒形式(图-2c)。这些现象提示: 进入细胞与未进入细胞的病毒颗粒, 在结构上的变化并没有什么差异。根据我们目前所具备的对脊灰病毒结构的认识, 未进入细胞的病毒颗粒并不象是结构上有缺陷。迄今亦没有任何证据认为两个结构相同的脊灰病毒毒粒具有明显不同的生物学活性。据此可以认为在脊灰病毒的感染过程中, 导致仅有  $1/25 \sim 1/200$  病毒进入细胞的原因很可能不是其余病毒的结构缺陷, 而是一种其它机制。

根据对脊灰病毒三维立体结构构象的详细分析<sup>[10]</sup>, 发现该病毒的壳体结构是十分严格有序的, 并处于一种热力学的动态变化中<sup>[9]</sup>。当环境温度上升至  $37^{\circ}\text{C}$  (生理温度) 时, 其热动力学所致的构象变化使位于毒粒壳体内部的 VP4 暴露于毒粒表面, 这时用抗 VP4 的特异性抗

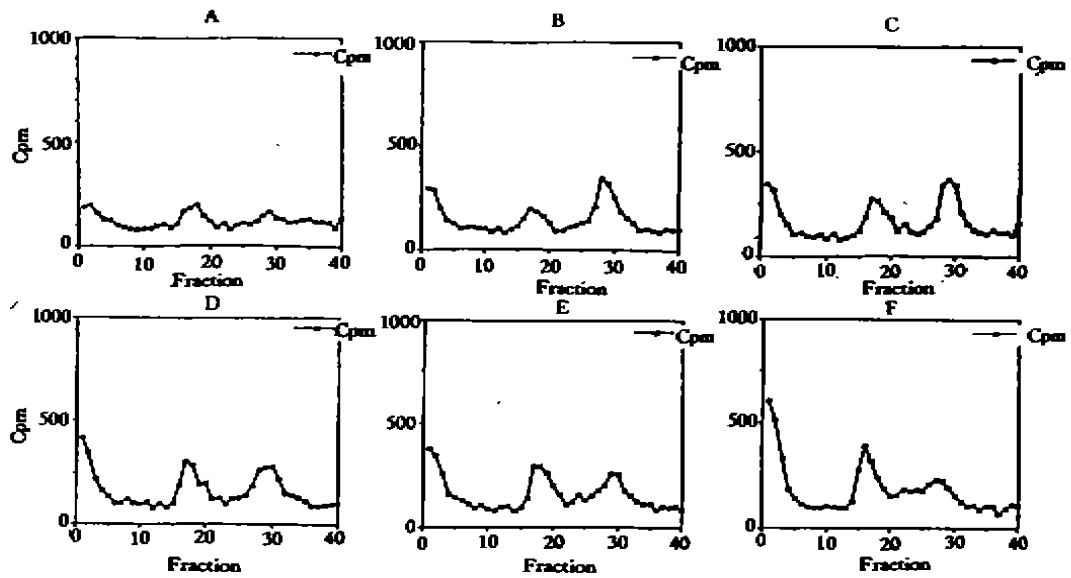


图 2c 病毒颗粒在不同感染时相上的变化(细胞内)

A, B, C, D, E, F 分别为病毒感染细胞后 2, 10, 30, 45, 60 min 的样品

Fig 2c The configuration change of poliovirus at different infection stages (inside of cells)

A, B, C, D, E, F, respectively, is the sample of 2, 10, 20, 30, 45, 60 min p. i.

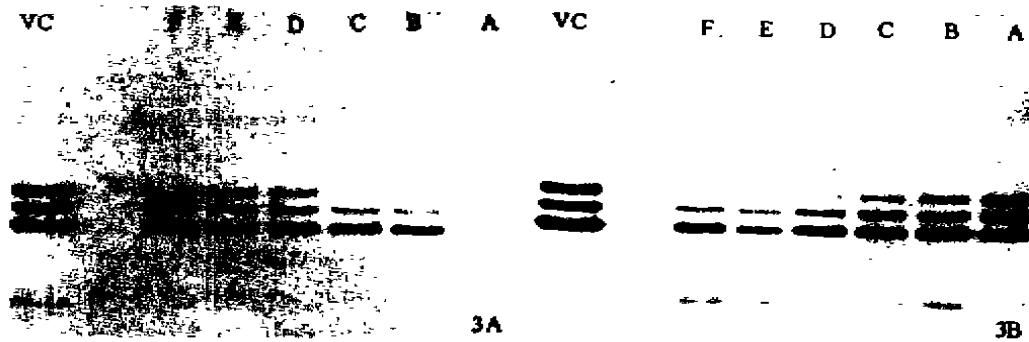


图 3 细胞外和细胞膜上病毒颗粒的壳蛋白组成

a: 细胞外病毒颗粒的壳蛋白组成, A, B, C, D, E, F 分别为感染后 2, 10, 20, 30, 45, 60 min 的样品, VC 为病毒对照。

b: 细胞膜上病毒颗粒的壳蛋白组成, A, B, C, D, E, F 分别为感染后 2, 10, 20, 30, 45, 60 min 的样品, VC 为病毒对照。

Fig 3 The capsid protein components of virus outside and membrane of cells

a: The capsid protein components of virus outside cells A, B, C, D, E, F, respectively, is the sample of 2, 10, 20, 30, 45, 60 min p. i. VC is the virus control. b: The capsid protein components of virus membrane of cells A, B, C, D, E, F, respectively, is the sample of 2, 10, 20, 30, 45, 60 min p. i. VC is the virus control.

体即可中和病毒对细胞的感染性,证实了 VP4 是一个在病毒感染过程中具有重要意义的成分。从本研究看出:参与感染的所有病毒颗粒在发生 160 s→135 s 结构变化过程中(图-2a. b. c),均失去了 VP4;更重要的是绝大多数的 VP4 都聚集于细胞膜上(图-3a. b),提示了 VP4 和病毒穿越细胞膜的过程有着直接的联系。根据受体结合理论,脊灰病毒是与相应的受体结合后并借助其进入细胞的。因此病毒和受体结合后脱去 VP4 就意味着有一个中间过程。形成这个中间过程的第一种可能是:因病毒需要形成一种激活状态(135 s 结构)以使其进入细胞后释放病毒 RNA;但是,既然所有的病毒在与受体结合后都能变为 135 s 状态(激活状态),而仅极少量病毒进入细胞,那么这个中间过程就必然还有第二个可能因素,即病毒受体与 VP4 结合亦形成一种活化状态以利于病毒穿膜的运输,因本实验还不能完全反映自然感染的过程,故是否这个结合可能有一个数量上的比例关系,亦即若干个 VP4 和受体结合,才能促成它们的活化,最终转运一个或几个病毒颗粒进入细胞尚不能肯定。

综上所述,可以将脊灰病毒穿越细胞膜进入细胞过程的模型假说完善如下:病毒结合受体后在生理温度条件下失去 VP4,变为 135 s 结构状态,这是病毒感染的激活状态;同时脱落的 VP4 与受体结合后亦活化了受体,使其可以转运病毒激活状态颗粒进入细胞。该 VP4 活化受体的过程是否有一个数量的问题仍需进一步探讨。然后以激活的 135 s 状态进入细胞的病毒即可释放 RNA,变为 80 s 空壳并降解,而 RNA 则开始胞内的复制过程。

### 参 考 文 献

- 1 Hunneler K, A Ketler. Dissociation of poliomyelitis virus from neutralizing antibody. *Virology*, 1958, 6: 297
- 2 Rueckert RR. Picornaviruses and their replication. In: Field, BN, ed. *Virology*, New York: Raven Press, 1985. 705
- 3 Caligiuri, L. A., J. J. Mesharry, G. W. Lawrence. Effect of aridon on modification of poliovirus *in vitro*. *Virology*, 1980, 105: 56
- 4 Minor, P. D. Antigenic structure of picornavirus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990, 61: 121
- 5 Much DH, Zajac I. Homology of surface receptors for poliovirus on mammalian cell lines. *J Gen Virol*, 1973, 21: 385
- 6 Van Wezel AL, Hazendonk AG. Intratypic serodifferentiation of poliomyelitis virus strains by strain-specific antisera. *Intervirology*, 1979, 11: 2
- 7 Moscufo, N, Gomez Yatal A, Rogove A, *et al*. A Mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. *J Virol*, 1993, 65: 5075
- 8 Johnston MD, Martin SJ. Capsid and procapsid proteins of a bovine enterovirus. *J Gen Virol*, 1971, 11: 71
- 9 Li Q, Gomez Yafal A, Young M. L., *et al*. Poliovirus neutralization by antibodies to internal epitopes of VP4 and VP1 result from reversible exposure of these sequences at physiological temperature. *J Virol*, 1994, 68: 3965
- 10 Hogle JM, Marie C, Filman DJ, *et al*. The three dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 1985, 229: 1358

## Initial Analysis of the Process of Poliovirus Entry into Cells

Li Qihan Jiang Li Marie Chow\*

(*Institute of Medical Biology, CAMS, Kunming 650107*)

(\**Dept. Microbiology & Immunology, UAMS, USA*)

This study analyzed the configurational changes of poliovirus as it crossed the membrane of cells, and investigated the relationship between the configuration changes of this virus and its entry into cells. The function of VP4 in the process of poliovirus entry into cells was studied also. A model about poliovirus entry into cells was suggested.

**Key words** Poliovirus, Cell entry, Configuration, Receptor

欢迎订阅 欢迎投稿

《应用与环境生物学报》(季刊)

刊号  $\frac{\text{ISSN1006-687X}}{\text{CN51-1482/Q}}$

邮发代号:62-15

《应用与环境生物学报》是由国家科委批准,中国科学院主管,中国科学院成都生物研究所主办并由科学出版社出版的全国性学术性科技期刊(学报级)。主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果,包括研究论文、研究简报和本刊特约的综述。

《应用与环境生物学报》是我国科学研究院、研究所,各大专院校以及各科技情报所、图书馆必备的科技刊物,是我国科学工作者、大专院校师生以及有关科技工作者进行科学交流的良好园地。

《应用与环境生物学报》为季刊,季末月25日出版,每期96页,每期定价11.00元。全国各地邮局(所)均可订阅。