

赠。正常 Raji 细胞用含 10% 新生小牛血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 10 mmol/L HEPES (Sigma), 50 mmol/L 2-ME (Bio-Rad), 100 u/mL 青、链霉素的 RPMI-1640 (Gibco) 培养基, 于 37 °C 5% CO₂ 条件下培养。当培养的正常 Raji 细胞刚进入对数生长期时, 加入 SRV-1 病毒悬液(病毒感染复数为 0.02)以感染细胞, 继续培养。

1.2 细胞的分级抽提 基本按 Zhai 等的方法^[6]。SRV-1 感染后不同时期的 Raji 细胞与未接毒的对数生长期细胞, 均按下列步骤在 4 °C 进行处理: 细胞经 PBS 离心洗涤后, 先经含 0.5% Triton X-100 的 CSK 液(10 mmol/L PIPES, pH6.8, 100 mmol/L KCl, 300 mmol/L 蔗糖, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 1.2 mmol/L PMSF)处理 3 min, 再经 RSB-Magik 液(42.5 mmol/L Tris-HCl pH8.3, 8.5 mmol/L NaCl, 2.6 mmol/L MgCl₂, 1.2 mmol/L PMSF, 1% Tween 40, 0.5% 脱氧胆酸钠)处理 5 min, 再经含 300 u/mL DNase 1 (RNase free, 宝灵曼公司)的消化液(CSK 液中减去 50 mmol/L KCl 增加 50 mmol/L NaCl)室温(23 °C)处理 30 min, 最后加入 0.5 mol/L (NH₄)₂SO₄ 使其终浓度达 0.25 mol/L, 处理 5 min, 即制得中间纤维-核纤层-核骨架结构体系。

1.3 常规电镜制样和 DGD 包埋-去包埋剂电镜制样 未经抽提的细胞和以上经抽提的材料都取样, 进行以下两种电镜制样: (1)常规环氧树脂 Epon 812 包埋, 切片, 双染; (2)材料经 2.5% 戊二醛和 1% OsO₄ 先后固定, 系列乙醇脱水后转入正丁醇, 用 DGD 浸透和包埋, 超薄切片厚度为 80-120 nm, 然后用正丁醇溶去切片的 DGD 包埋剂, 只剩下裸露的材料于铜网上, 经无水乙醇过渡到醋酸异戊酯, CO₂ 临界点干燥。于 H-300 电镜下观察。

2 结果

1 常规电镜下的观察结果

Raji 细胞被感染后第三天即开始形成合胞体。不论是感染的单细胞还是形成的合胞体, 其细胞质内出现越来越多的空泡, 但此时胞质还很致密。后来在细胞质内出现了致密的病毒核壳体, 且后者常常在核附近的某区域成团出现, 但细胞核内始终未见有病毒核壳体(图 1a)。随着时间的推移这些核壳体在细胞表面的质膜处形成出芽而释放。但我们观察到更多的核壳体是在胞质内上述空泡处, 包裹上一层空泡的膜, 向空泡内腔出芽而成为完整的病毒颗粒。观察了许多细胞后可感觉到这种空泡不断向细胞表面移近, 空泡膜与质膜融合, 病毒颗粒被释放出胞外(图 1b)。

2 DGD 包埋-去包埋剂电镜制样观察的结果

材料不经抽提直接固定制样, 可观察到感染后形成的合胞体初期较为致密(图 2a), 渐渐细胞质内出现病毒核壳体, 有的还伴随有致密的圆球形粗颗粒(直径约 0.35~0.55 μm)出现, 后者可能是细胞对病毒感染反应的产物。如上所述, 核壳体有的在细胞表面出芽; 而更多的是在细胞质的空泡上向空泡内腔出芽, 然后移至胞质边缘释放(图 2b)。随着细胞质内病毒的不断产生和释放, 细胞或合胞体越来越空疏, 最后核十分空洞, 只在外周剩下一些残破的核膜, 胞质内也是只剩少数残破结构和一些病毒颗粒。

材料经分级抽提, 即依次经 CSK 液、RSB-Magik 液和 DNase 1 作用液处理后, 细胞内的大量可溶性蛋白、膜系统、细胞器、微管微丝和染色质等结构成分均被抽去。经此处理的未感染的 Raji 细胞, 在许多结构成分被除去后; 可清晰地观察到细胞内只剩下一个由中间纤维(IF)、核纤层(L)和核内骨架纤维(NM)组成的结构体系(图 3a)。感染后的材料经同样的分级抽提后, 也获得了这样一个结构体系, 但胞质中的中间纤维似有些凌乱, 不如前者排列有序, 且结合有病毒核壳体, 这些病毒核壳体有的还是成团出现的, 而核内骨架纤维上和核纤层上未见到这种颗粒(图 3b)。但经过 DNase 1 处理的材料, 其病毒颗粒往往不易观察, 因此我们在经

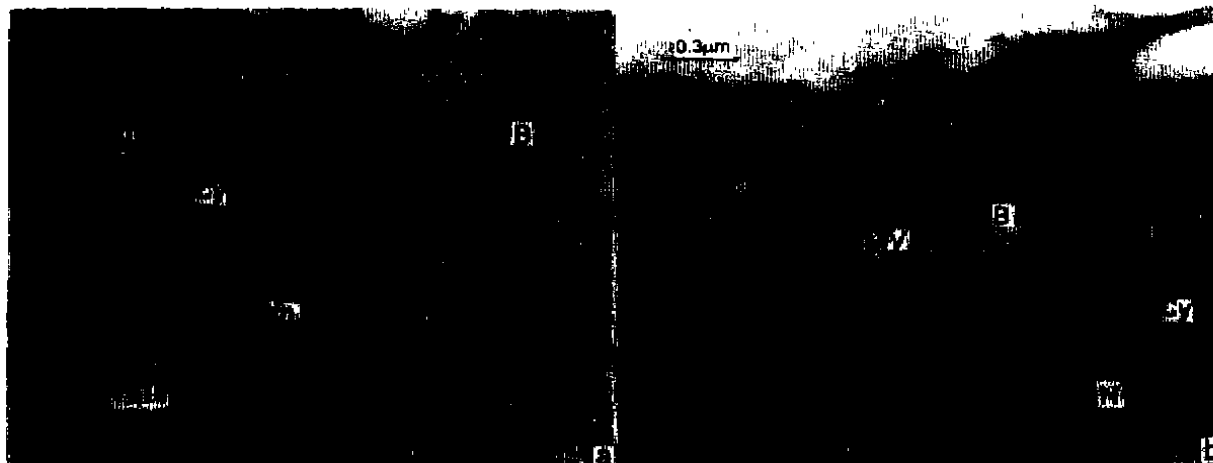


图1 SRV-1感染后的Raji细胞常规电镜照片

N. 细胞核; Cy. 胞质区。a: 胞质内出现许多空泡结构(B), 核附近的胞质内出现成团的病毒核壳体颗粒(箭头所示 Vn), 此处可能是病毒核壳体的“装配中心”。b: 病毒核壳体在胞质内的空泡(B)上向空泡内腔出芽成成熟病毒颗粒(箭头所示 V)(可看到圆柱形核心), 有的在胞质边缘释放出胞外。

Fig. 1 Conventional EM micrographs of SRV-1 infected Raji cells

N. Nucleus; Cy. Cytoplasm; B. Bubble a: There are many bubbles (B) in cytoplasm. A crowd of viral nucleocapsids (Vn) appear in cytoplasm near nucleus. b: Virions bud at the bubbles which gradually move to the edge to release the viruses.

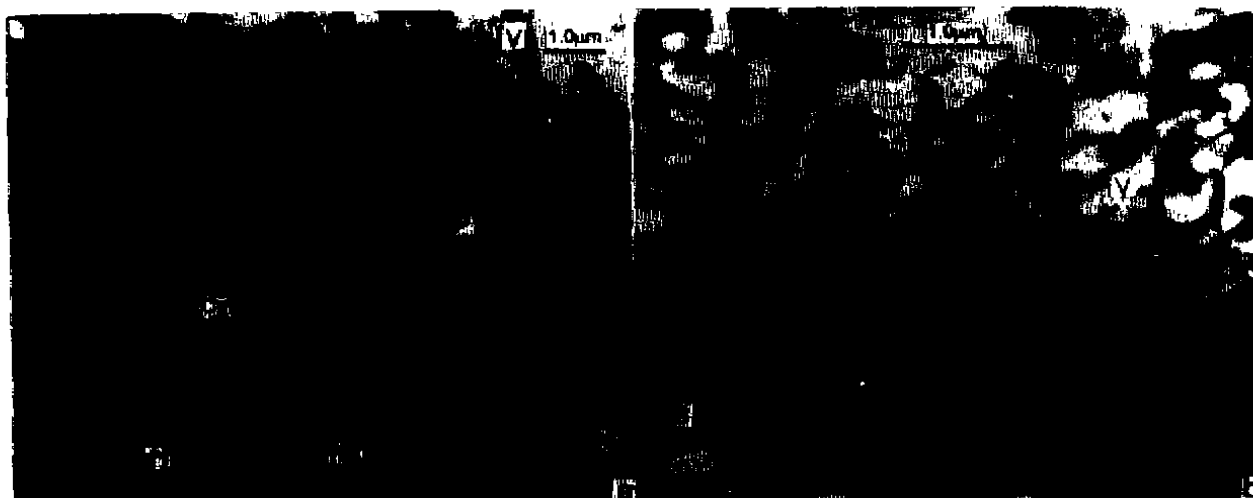


图2 SRV-1感染后的Raji细胞形成合胞体的DGD包埋-去包埋剂电镜照片

a: 整个合胞体较致密, 含有多个核(N₁、N₂、N₃), 胞质内产生有许多粗的致密圆颗粒(P), 边缘有许多正在向外出芽释放或已释放的病毒粒子(V)。b: 病毒核壳体在胞质内的空泡上向空泡内腔出芽成成熟病毒颗粒, 有的在胞质边缘释放出胞外。

Fig. 2 DGD embedding-free EM micrographs of infected Raji cells

a: One part of a syncytial cell formed at early infection stage shows three nuclei (N₁, N₂, N₃), and large dense particles (P) in the cytoplasm. There are a lot of virions (V) budding at the cell membrane. b: Virions bud at the bubbles in cytoplasm which move to the edge to release the viruses.

RSB-Magik 液处理后也取材观察。此时核内虽由于染色质未除去显得致密些,可胞质内也主要剩下中间纤维结构,可清楚地观察到病毒颗粒和以上述粗的致密圆颗粒都是紧密结合在中间纤维上的。前面常规电镜下所看到的核附近成团出现的病毒核壳体,此时可观察到它们是成团结合在核附近的中间纤维上,其中有的较大且致密,而有的偏小疏松,它们可能是处于不同装配阶段的病毒核壳体,此区域则极可能就是病毒核壳体的装配中心(图 3c)。

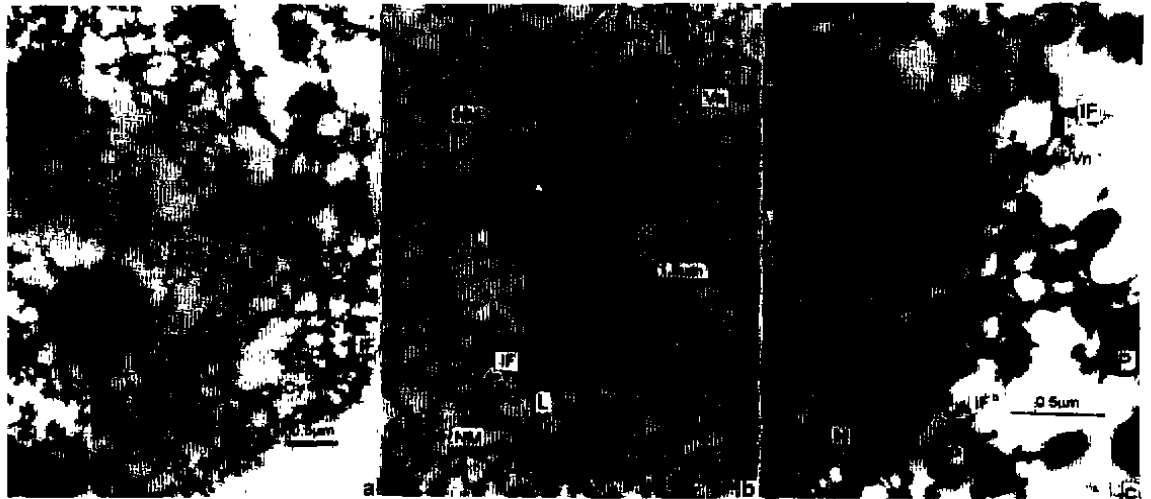


图 3 未感染和感染的 Raji 细胞 DGD 包埋-去包埋剂电镜照片

a 和 b 细胞均依次经 CSK 液、RSB-Magik 液和 DNase 处理。a: 未感染细胞。显示出一个由胞质中的中间纤维(IF)、核纤层(L)和核内骨架纤维(NM)组成的结构体系。b: 感染细胞。也可看到图 a 中的结构体系,但在中间纤维上结合有致密的病毒核壳体颗粒(Vn)。有的成团出现,且大小不一,可能是处于不同装配阶段的病毒核壳体,此区可能是病毒的“装配中心”。c: 感染的细胞,依次经 CSK 液、RSB-Magik 液处理。可清晰看到成团的、大小不一的病毒核壳体(Vn)出现大核附近的中间纤维(IF)上,此区可能是病毒核壳体的一个“装配中心”。另外还有粗的致密圆颗粒(P)结合在中间纤维上。

Fig. 3 DGD embedment-free EM micrographs of uninfected and infected Raji cells

a: A uninfected Raji cell, extracted by CSK, RSB-Magik and DNase, shows the intermediate filaments (IF)-lamina (L)-nuclear matrix (NM) system. b: A syncytial cell formed after SRV-1 infection, extracted as a, shows viral nucleocapsids associate firmly with the IFs. c: A syncytial cell extracted by CSK and RSB-Magik, shows more clearly the association of viral nucleocapsids with IF. The particles of different sizes and densities (pointed by arrows) may be viral nucleocapsids at different assembling periods. The area where these particles gather may be an "assembling center" and here SRV-1 assembly depends on the IFs as support.

3 讨论

国内外对 SRV 在宿主细胞中的形态发生研究甚少,只是推测它作为逆转录病毒应与 HIV 等其它逆转录病毒的生活史类似^[9]。我们在常规电镜下和未经抽提的材料的 DGD 包埋-去包埋剂制样电镜下,都可看到病毒颗粒是出现在胞质内的,且往往是成团出现在细胞核附近的胞质内,核内未见病毒颗粒,这说明病毒颗粒是在胞质内装配的。另外还观察到病毒颗粒不仅在质膜上,更多的是在胞浆膜形成的空泡上出芽,这些现象确相似于 HIV 和其它逆转录病

毒。

细胞的分级抽提能将其它结构成分除去,使细胞内只剩下中间纤维-核纤层-核骨架这一贯穿核、质的结构体系。DGD 包埋-去包埋剂电镜技术能很好地将这一结构体系显示出来。应用这两项技术本文进一步观察到病毒核壳体是结合在胞质骨架的中间纤维上的,虽经多步抽提也未脱落,这说明这种结合是很特异和很紧密的。更有意义的是还观察到成团的、处于不同装配阶段的病毒核壳体和装配好的核壳体都是紧密结合在中间纤维上的,这说明此处即为病毒的“装配中心”,而此“中心”的装配活动就是以中间纤维为支架的。另外还观察到感染后的细胞其胞质内的中间纤维排列不如未感染者有序,变得凌乱不均一,这可能是病毒感染后将其作了重排用于自己的组装。Shoeman 等^[10]和 Honer 等^[11]分别报道,从人艾滋病病毒 HIV-1 提取出的病毒蛋白酶在体外实验 (*in vitro*) 和微注射进细胞,都引起中间纤维的变化,并提出组成中间纤维的蛋白可能参与了此病毒的感染或修饰过程。这与本实验结果有相同之处。因此我们认为,作为逆转录病毒的 SRV 其装配和成熟释放过程很可能是病毒产物事先将宿主细胞中的中间纤维改组重排,以适用于自己的组装,然后,细胞核内转录出的核心 RNA 和胞质内合成的病毒结构蛋白等组装成分,都集中在核附近改组过的中间纤维上,此区域即成为病毒核壳体的“装配中心”,以中间纤维为支架进行装配活动,装配好的核壳体仍结合在中间纤维上,并沿着后者被运送至胞浆膜形成的空泡或质膜上而出芽释放。

致谢 北京大学翟中和院士对部分实验结果给予过分析指导,中科院昆明动物所贾昆龙研究员也对本工作给予了指导,中科院昆明动物所许金菊和刘德胜老师分别参与了部分细胞培养工作和电镜工作,特致谢意!

参 考 文 献

- 1 吴冬兰,徐婉婷,熊仁杰等. 辛德毕斯病毒装配及 6K 蛋白与中间纤维的关系. 微生物学报, 1990, 30:417~421
- 2 Chatterjee UK, Cerver M M, Penman S. Formation of vesicular stomatitis virus nucleocapsid from cytoskeletal framework-bound N protein: possible model for structure assembly. Mol Cell Biol, 1984, 4:2331~2334
- 3 Weed H G, Krochmalnic G, Penman S. Poliovirus metabolism and cytoskeleton framework: detergent extraction and resinless section electron microscopy. J Virol, 1985, 56:549~557
- 4 翟中和, Krochmalnic G, Penman S. 痘苗病毒的装配与中间纤维的关系. 中国科学(B辑) 1987, 10:1076~1084
- 5 王文斗,于勤,丁明孝等. 痘苗病毒的复制与中间纤维的关系. 实验生物学报, 1993, 26:239~247
- 6 Zhai Z H, Nickerson J A, Krochmalnic G *et al*. Alteration in nuclear matrix structure after adenovirus infection. J Virol, 1987, 61:1007~1018
- 7 Bibor-Hardy V, Pouchalet M, Pierre B *et al*. The nuclear matrix is involved in herpes simplex virulence. Virology, 1982, 121:296~306
- 8 Bin-Zur'ev A, Abulafia R, Bratosin S. Herpes simplex virus and protein transport are associated with the cytoskeletal framework and the nuclear matrix in infected BSC-1 cells. Virology, 1983, 129:501~507
- 9 陈志斌. 猴艾滋病 D 型逆转录病毒的血清学检测与病毒分离 [硕士学位论文], 中国科学院昆明动物研究所, 1991
- 10 Shoeman R L, Honer B, Stoller J J *et al*. Human immunodeficiency virus type 1 protease cleaves the intermediate filament proteins vimentin, desmin and glial fibrillary acidic protein. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87:8336~8340
- 11 Honer B, Shoeman R L, Traub P. Human immunodeficiency virus type 1 protease unconnected into cultured human skin fibroblasts cleaves vimentin and affects cytoskeletal and nuclear architecture. J Cell Sci, 1991, 100:799~807

The Assembly and Release of Simian AIDS Type D Retrovirus (SRV): Involvement of Intermediate Filaments

Wen Jianfang Huang Shengman Zheng Yongtang

(Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223)

Abstract By conventional EM technique and DLD embedment-free section EM technique together with the procedure of gentle extraction, the assembly and release of simian AIDS type D retrovirus (SRV) in infected Raji cells were studied. The results showed that SRV nucleocapsids were assembled in some cytoplasm areas near nuclei, and these areas or "virus assembly centers" were suspended in the intermediate filament network; and the assembling and assembled virus nucleocapsids were associated firmly with intermediate filaments. It is suggested that the assembly of SRV nucleocapsids depends on intermediate filaments as support, and the assembled nucleocapsids may move along the intermediated filaments to cytoplasm membrane where they bud and are released.

Key words Simian AIDS type D retrovirus (SRV-1), Virus assembly, Intermediate filament