

人巨细胞病毒在SL₇细胞中的形态发生

王雅 陆秀英 向诚 孙荣夫

(卫生部上海生物制品研究所, 上海)

陆志檬 顾龙瑛 金根娣

(上海第二医科大学附属瑞金医院, 上海)

提 要

人巨细胞病毒(HCMV)AD₁₆₉株接种SL₇细胞后三至四天,可见核衣壳在核内装配,通过核膜芽生,从核周间隙移行至胞浆的囊泡中,形成完整的病毒。感染后四天核内可见许多核衣壳与网状物紧密结合形成典型的包含体,因此包含体可能是病毒复制的场所。此时浆内出现电子密度均一的物质,称CMV致密体。免疫电镜显示致密体缺乏核衣壳,但具有病毒相同的抗原性。它可能是装配和包裹核衣壳的结构蛋白。CMV和致密体在感染细胞中以同一方式从细胞中释放。

人巨细胞病毒(HCMV)在人类中感染较普遍,多数呈潜伏感染,常因器官移植、肿瘤疾患、长期应用免疫抑制剂使病毒激活而表现广泛性全身播散。病毒可通过胎盘引起新生儿巨细胞包含体病,约有5—10%有神经损伤,并可留下永久性的智力减退^[1],某些恶性肿瘤如皮肤多发性出血性肉瘤^[2]也有关联。为开展CMV的预防、诊断和治疗,有必要对CMV的复制过程中形态发生有所了解。

1956年Smith^[3]首先分离到病毒,该病毒有严格的种属特异性,只能在人纤维母细胞中生长,并产生特征性核内大型包含体,本文报导HCMV在SL₇细胞中复制过程的形态及阐明病毒与包含体、致密体的关系。

材料与方 法

病毒: HCMV AD₁₆₉株(医学科学院病毒所提供),滴度为 10^2 TCID₅₀/0.1ml。

细胞: 人二倍体肺细胞(SL₇),第18代,营养液为Eangle's液,内含10%小牛血清及100u/ml青链霉素。

细胞感染及收样 待细胞成片后分成接种组和对照组。接种组接种上述毒种1ml/

本文于1987年3月26日收到

方瓶, 对照组不接种病毒, 置 37°C 孵育箱中培养, 分别于接种前, 接种后四小时、一天、二天、三天、四天、七天、十四天收样观察。

电镜样品制备 将瓶上细胞刮下, $2000\text{r}/\text{m}$ 离心20分钟, 用PBS缓冲液洗涤二次, 取沉淀, 用2.5%戊二醛固定二小时以上, 再用1%锇酸后固定, 酒精、丙酮脱水, 618环氧树脂浸透包埋, 瑞典LKB超薄切片机切片, 醋酸铀, 柠檬酸铅染色, 置日立H-600电镜下观察。

免疫电镜 取接种AD₁₆₉株培养二周的病毒上清液, 加HCMV患者恢复期血清(1:40), 37°C 作用一小时后, $10000\text{r}/\text{m}$ 离心40分钟, 取抗原抗体复合物沉淀, 滴于铜网上, 经2%磷钨酸负染, 电镜观察同上。

结 果

感染组可看到有CMV复制现象, 而对照组未见异常。

感染后四小时: 基本上与对照组无差别, 浆内偶而可见1—2个裸核衣壳。

感染后1—2天: 细胞变长, 核略变大, 浆内原有的裸核衣壳反而不见, 可能由于隐蔽期之故, 仅在核内染色质个别区域可见到有几个类似病毒核心致密颗粒状结构, 可能是病毒感染有关的变化^[4]。

感染后3天: 约10%病变, 核内出现少量的核衣壳, 呈三种形态: 空心衣壳, 有点滴穗状或园形致密的核心衣壳, 环形核心衣壳(同图1)。核内的核衣壳经核膜芽生至细胞浆内变成有核膜包裹的增厚的核衣壳(图2), 及囊膜包裹的病毒及少量致密体(图3)。核衣壳在核内装配, 通过核膜芽生(图4)或核膜折叠形成包膜(图5), 通过核周间隙移行至浆内的内质网和各种囊腔中。

感染后4天: 约30%细胞病变, 核内染色质呈现组网状, 大量核衣壳紧密与其结合, 核内电子密度浅区仅有少数的核衣壳, 这种区域可特征性地与核膜隔开, 形成典型的大型核内包含体(图6)。浆内出现特征性的致密体, 其具有CMV衣壳相同的形态结构, 与CMV一样由浆内囊泡膜或排出胞浆时获得包膜, 有的呈现包膜, 有的无包膜, 故与CMV有相同的膜结构, 即透明脂膜, 上面有突起(图7), 有时可见CMV与致密体同存于一个囊池中(图8), 二者均按同一方式即通过囊膜与胞膜的融合或通过芽生排出细胞外(图9), 因此细胞内(图7)、外(图9)可看到三种类型的颗粒: ①有包膜有核心的完整病毒; ②有包膜无核心的病毒; ③有包膜无核心具有病毒衣壳蛋白结构的致密体, 由于三者膜的结构相同, 故可能有相同的抗原性。

感染后7天: 约40%细胞病变, 典型的核内包含体形态已不显著, 核衣壳(图1)及浆内致密体增多, 胞外三种形式的颗粒也增多。

感染后14天: 约80%细胞病变, 核内包含体全被核衣壳所占(图10), 细胞破碎, 上述三种颗粒大量流出。

免疫电镜: 在抗原抗体复合物中可看到约175nm的病毒颗粒及约175~350nm无核心的致密体(图11)。



- 图1 各种形态的核衣壳(七天)(60,000X).
Fig 1 Various shapes of nuclear capsids (7 days) (60,000X).
- 图2 CMV核内核衣壳经过芽生至浆内成为包膜增厚衣壳。(30,000X)
Fig 2 Intranuclear CMV capsids by budding through the nuclear into cytoplasm shown thickening nucleocapsid (30,000X).
- 图3 CMV核衣壳在囊泡中包裹形成有包膜的完整病毒,囊泡中的致密体。(30,000X)
Fig 3 Envelopment of capsids in the vacuole, become an intact virus with envelope. Dense bodies in the vacuole (30,000X).
- 图4 CMV核衣壳正在通过核膜芽生进入核周间隙中。(30,000X)
Fig 4 The CMV capsids envelopment by budding into the perinuclear cisterna (30,000X).
- 图5 CMV核衣壳通过核膜折叠获得包膜。(30,000X)
Fig 5 CMV capsids envelopment by budding into a sac-like membranous invagination (30,000X)
- 图6 典型CMV的核包含体,多数核衣壳紧密结合在细网状的电子致密物质中。(15,000X)
Fig 6 The typical skein-like inclusion bodies, most of capsids were closely associated with it (15,000X).
- 图7 包装内三种形式颗粒均有脂质膜包裹。(60,000X)
Fig 7 Three types of particles in the cytoplasm are enveloped by same lipid membrane (60,000 X).
- 图8 CMV和致密体在同一囊泡中(右),囊泡中二个均是CMV(左)(22,500X)
Fig 8 CMV and dense bodies within the same vacuole (right). There are two CMV in the same vacuole (left) (22,500X).
- 图9 三种形式的颗粒从细胞释放。①有包膜,有核心,②有包膜,无核心,③有包膜的致密体。(18,000X)
Fig 9 Three types of particles, (1) enveloped capsid with core (2) enveloped capsid without core (3) enveloped dense bodies released from the cell (18,000 X).
- 图10 与图6相比典型包含体结构消失,均显示核衣壳。(15,000 X)
Fig 10 As compared with Fig 6, disappearance of the typical inclusion bodies substitute capsids for it (15,000 X).
- 图11 免疫电镜显示CMV和致密体均能与CMV抗体起反应。(40,000 X)
Fig 11 Immuno-electromicroscopy showed both CMV and dense bodies react with the antibody of CMV (40,000 X).

讨 论

一、CMV通过融合或吞噬二种方式穿入细胞,融合占大多数,这两过程在接种后即开始,5分钟后一半病毒进入浆内^[5],有人用免疫荧光抗体研究得知CMV复制过程中感染后三小时病毒只能产生非结构蛋白,6—24小时才可产生结构蛋白,故我们在4小时样品中所看到的裸核衣壳只能是感染时融合去膜进入的病毒衣壳,经过1—2天隐蔽期后,第三天才出现新合成的核衣壳,与报道^[6]相符。

二、从感染细胞核内看到的各种形态的核衣壳,有人认为是不同的切面所致^[7],根据大小形态较一致,我们认为不可能是切面的不同,可能是不同的成熟阶段。

三、CMV与包含体的关系:病毒感染后,可在浆内和核内出现包含体,但不是病毒所特有的变化。细菌、化学也可引起。不同的病毒可有不同的包含体,如狂犬病毒有内基氏体,痘苗病毒有顾氏体,CMV有核内巨大包含体。对包含体性质看法很多,有认为

是病毒的代谢产物, 也有认为是病毒晚期退行性变化, 从我们四天可看到的典型包含体即大量核衣壳聚集在电子密度深的组网物中, 而电子密度浅的区域却只有很少核衣壳, 因此我们认为CMV包含体与病毒的合成密切相关, 是病毒合成的场所。

四、CMV与致密体的关系: 电镜下致密体与CMV的衣壳有相同的形态结构, 也具有CMV相同的包膜结构, 在免疫电镜中致密体与CMV一样能与CMV抗体结合(图11), 反映了它具有CMV相同的抗原性。Mark^[7]对致密体特性进行了研究, 发现许多致密体与CMV有相同大小, 沉降系数、密度。其膜表面的糖蛋白是CMV基因所特定的。由于致密体缺乏CMV的核心成分, 推测它既不是一种感染性的病毒颗粒, 也不是缺乏核酸的缺损病毒, 而单纯是由病毒衣壳蛋白组成的无感染性的致密体, 因此我们认为CMV致密体可能是装配、包裹CMV衣壳的结构蛋白。

参 考 文 献

- [1] Frank, Fenner, et al., 1970, *Medical Virology* 240-241.
- [2] Robert, B.Belshe., 1984, *Textbook of Human Virology* 887-928.
- [3] Smith, M.G., 1956, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92: 424-430.
- [4] 洪涛, 1984, *生物医学超微结构与电子显微镜技术* 3: 310-321.
- [5] Smith, J.D. et al., 1974, *J. Virol.* 14: 945-956.
- [6] Smith, J.D. et al., 1973, *J. Virol.* 12: 919-930.
- [7] Y.Perat, F.ferchal, M-F Salles., 1971, *Colloque De Pathologie Infectieuse.*
- [8] Mark, F., 1976, *J. Virology* 19(2): 594-609.

Morphogenesis of Human Cytomegalovirus in SL₇ Cells

Wang Ya, Lu Xiu-ying, Xiang Cheng, Sun Rong-fu

(Shanghai Institute of Biological Product, Ministry of Public Health, Shanghai)

Lu Zhi-meng, Gu Long-ying, Jin Gen-di

(Rui-Jin Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai)

The human cytomegalovirus (HCMV) strain AD₁₆₉ was inoculated into SL₇ cells. Between the 3rd and 4th day postinfection, the capsids were assembled in the nucleus and budded through the nuclear membrane. From the perinuclear cisterna, the enveloped particles migrated into the cytoplasm. At this stage the virions were formed.

At the 4th day most of the capsids closely associated with a skein-like material, namely typical nuclear inclusion, were observed. It may be the site of viral synthesis.

Concurrent with capsid assembly and envelopment, a homogenous electro-dense material began to accumulate into cytoplasm referred to as dense bodies of CMV. Immuno-electromicroscopy showed that the dense bodies without core had the same antigenicity as virions, the dense body may be a protein of assembling and enveloping capsids. Both CMV and dense bodies are released from infected cells in the same manner.

富有我国特色的第一本昆虫病毒学专著 《中国昆虫病毒电子显微镜图谱》出版

A New Book "The Electron Micrographic Atlas of Insect Viruses in China" was Published

《中国昆虫病毒电子显微镜图谱》一书由中国科学院武汉病毒研究所张立人主编，世界著名的病毒学家、学部委员高尚荫教授审阅，订于1988年年初由科学出版社出版，全国各地新华书店经售。

该书是我国第一部昆虫病毒形态结构和昆虫细胞病理等方面的专著。本书以图为主、文字介绍为辅。全书主要阐明我国发现的农、林害虫和经济昆虫各类昆虫病毒的形态、超微结构、病毒侵染、形态发生、核酸蛋白和细胞病理等特征。书中图片均为我国科技工作者根据自己的材料制作的样品，应用电子计算机图像处理系统和现代电子显微镜拍摄而成。全书图片共有十个部分，包括导图、核型多角体病毒、颗粒体病毒、质型多角体病毒、昆虫痘病毒、非包涵体病毒、昆虫病毒核酸与蛋白质、昆虫病毒的形态发生、昆虫的细胞病理和其它等。此外，还根据文献记载介绍了我国已发现的昆虫病毒及其宿主名录。书后附有昆虫病毒名称中外文索引和参考文献。对于昆虫病毒标本的采集，利用病毒防治害虫和病毒电镜样品的制作方法等都有说明，它对于从事有关科研、教学、植物保护、生物防治和电镜技术的工作人员均有一定的参考价值。

参加本书编著的还有我国著名的几位昆虫病毒学教授和专家。该书出版非常及时，这本富有我国特色的图谱，在国内还是第一次出版，它将对我国昆虫病毒学和电子显微学的发展与应用产生积极的影响。

(建华)