

猪瘟病毒的形态结构与形态发生*

王 镇 闵光伟 李明义 藤俊琳 丁明孝

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘 要 建立了猪瘟病毒(CSFV)弱毒疫苗 Thiverval 株(T 株)与中国免化弱毒疫苗 C 株在 MPK 细胞中的感染模式。使用 MPK 细胞增殖 CSFV,其病毒滴度明显提高,从而为应用电镜超薄切片技术研究猪瘟病毒的形态结构与形态发生提供了可能性。猪瘟病毒呈圆形颗粒,直径约为 70nm。其内部是电子致密的核心,直径约为 40nm,有时呈六角形,外有包膜包裹。在 CSFV 感染的 MPK 细胞质中,可观察到处于不同发育阶段的子代病毒粒子。此外,猪瘟病毒的感染能够引起某些宿主细胞超微结构上的变化。

关键词 猪瘟病毒(CSFV),超微结构,形态发生,电子显微镜技术

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2000)03-0237-42

猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)属瘟病毒属(Pestivirus)黄病毒科(Flaviviridae)^[1],是一种严重危害养猪业的正链 RNA 病毒,被《国际动物卫生法典》列为 A 类 16 种法定传染病之一^[2]。长期以来,猪瘟病毒一直被列为我国家畜病害研究及兽病检测与防治的一个重点项目。近些年来,虽然已测出几株 CSFV 基因组全序列,并且对其表达的蛋白功能也有了不同程度的了解。但由于 CSFV 在体外细胞中增殖力弱,其形态学研究依然非常困难。至今在国内外对 CSFV 的形态结构及其在宿主细胞内成熟和释放过程仍知之甚少^[3-4],甚至对病毒粒子的大小的报导也各不相同,幅度在 30~80nm 之间^[5-9]。

以 CSFV 法国弱毒疫苗 Thiverval 株(T 株)和中国免化弱毒疫苗 C 株感染的 MPK 细胞及野毒株(F 株)感染的 PK15 为实验材料,较为系统地对 CSFV 的形态结构及其宿主细胞的超微病变进行了观察,在此基础上侧重研究了猪瘟病毒 T 株在 MPK 细胞中的增殖过程。由于我们建立的猪瘟病毒 T 株与 C 株在 MPK 细胞中的感染模式,病毒滴度明显提高^[10],从而有可能在电镜下清晰地观察到 CSFV 的形态结构,并为今后深入研究其形态发生过程的细节提供了可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

CSFV 毒株由中国兽药监察所提供;PK15 细胞购于美国典型培养物中心(ATCC);MPK 细胞由意大利 Ferrari 教授惠赠,在本室培养至第 5 代。

* 国家攀登计划(85-44-02-05)和国家重点基础研究发展规划项目资助

作者简介:王 镇(1969-),女,山东人,北京大学生命科学学院讲师,博士,现为美国纽约大学博士后,主要从事细胞生物学和病毒学研究

收稿日期:1998-12-30,修回日期:1999-04-23

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及病毒感染:用 DMEM 培养液加 20% 胎牛血清作为 MPK 细胞的培养液 (pH7.2)。维持液加 5% 胎牛血清。用 DMEM 培养液加 10% 胎牛血清作为 PK15 细胞的培养液 (pH7.2)。维持液加 2% 胎牛血清。待细胞接近长满单层时接毒,于 37℃ 感作 1h 后,用 Hanks 洗涤,加维持液培养,CSFV T 株、F 株培养 48h,CSFV C 株培养 96h。

1.2.2 电镜样品制备:对照细胞及 CSFV T 株、C 株感染的 MPK 细胞及 F 株感染的 PK15 细胞用 0.1mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液洗涤,从细胞培养瓶中刮取,离心沉淀的细胞用 2.5% 戊二醛预固定,再用 1% 锇酸固定。常规梯度脱水后包埋于 Epon-812 树脂中。超薄切片用 2% 醋酸双氧铀、0.2% 柠檬酸铅染色后,于 CM120 Biotwin 电镜下观察。

1.2.3 免疫荧光技术:将细胞培养在 10mm×10mm 的盖片上,接近长满单层时,用一定稀释度的 CSFV C 株、T 株于 37℃ 分别感作 1h, Hanks 液洗涤后,加维持液培养。T 株培养 2d, C 株培养 4d。用 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液 (含 0.85% NaCl) 冲洗盖片,自然干燥后在固定剂中固定 15min,干燥备用。未接毒的细胞按同样方法处理作为对照组。

用 0.01mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液冲洗细胞后,加入抗 CSFV 多抗或单抗,37℃ 温育 1h;PBS 缓冲液冲洗,1% BSA 封闭后,加 FITC 标记的二抗温育。0.01mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液反复冲洗,甘油封片后于 Olympus 荧光显微镜下 495nm 激发波长观察,或于激光共聚焦显微镜 Leica DMRBE 下观察。

2 实验结果

2.1 猪瘟病毒增殖的一步生长曲线

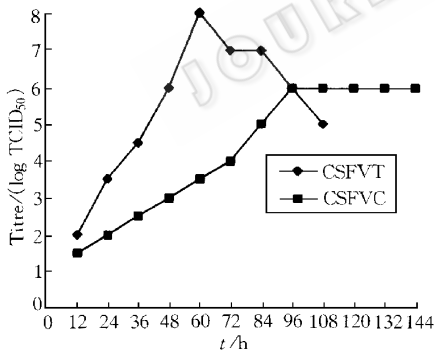


图 1 CSFV T 株、C 株在 MPK 细胞中
的一步生长曲线

Fig. 1 The one step growth curve of
CSFV T, C strains in MPK cells

猪瘟病毒感染后每隔 12h 取样,测定培养液中子代病毒的滴度,绘制出 CSFV T 株和 C 株在 MPK 细胞中的增殖曲线(图 1)。CSFV T 株在 MPK 细胞中增殖的速率较快。到接毒 60h,释放到培养液中有活性病毒粒子的量达到峰值,为 10^8 TCID₅₀/mL,比使用 PK15 细胞培养提高一个滴度^[17]。并且,在随后的 24h 内,有感染能力的病毒粒子的量仍稳定在 10^7 TCID₅₀/mL 左右。与 T 株相比,CSFV C 株在 MPK 细胞中的增殖速率较慢,释放到培养液中的病毒滴度也较低。接毒 4d,培养液中病毒的滴度才能达到 10^6 TCID₅₀/mL。继续培养,释放到培养液中病毒的滴度基本维持不变。根据 CSFV 不同毒株成熟时间的不同,选择合适的取材时间,对 CSFV 感染细胞样品进行固定,

以观察 CSFV 的形态结构及其在宿主细胞中的形态发生过程。

2.2 病毒在细胞中增殖的部位

使用 4% 多聚甲醛固定液固定细胞,经免疫荧光染色,感染 CSFV 的细胞质膜上只有微弱荧光,而使用丙酮固定,细胞内荧光明显,说明 CSFV 抗原在细胞质膜上较少,而主

要存在于细胞内,特别是在核周的某些区域荧光更强,可清楚地勾画出细胞核的轮廓。在细胞质中,CSFV 抗原也并非均匀分布,在某些区域中荧光很强(图版 I 1A,1B)。使用抗 CSFV 包膜蛋白 E2 和抗 CSFV 非结构蛋白 p120 的单克隆抗体进行免疫荧光检测,也得到了类似的结果(图版 I 1C,1D)。与 p120 相比,CSFV 的 E2 蛋白在感染细胞中的分布更不均质,免疫荧光染色后,其特异性的荧光呈明显的斑状分布。根据免疫荧光技术检测到的 CSFV 结构及非结构蛋白在其宿主细胞中的部位,为进一步在电镜下观察病毒的形态发生奠定了基础。

2.3 猪瘟病毒的形态结构与形态发生

2.3.1 猪瘟病毒的形态与大小:在病毒感染晚期的细胞表面与细胞内均可观察到成熟的病毒样粒子。病毒粒子呈球形,直径较为均一,多在 70nm 左右,有包膜(图版 I 2,图版 II 1 箭头),内含 40nm 的电子致密的核衣壳,某些核衣壳呈清晰的六角形。CSFV 疫苗株 T 株与 C 株及野毒 F 株形态相似,大小无明显差异(图版 I 2,图版 II)。

2.3.2 病毒的形态发生:在 CSFV 感染的细胞中,粗面内质网与高尔基体周围常常可见各种囊泡。根据其形态与大小可清楚地辨认出它们多属于 COP(coat protein)包被的运输小泡(图版 III 1 箭号),并非病毒粒子。在胞质中也可观察到直径与病毒核衣壳直径(约 40nm)类似的电子致密球形颗粒,它们很可能代表处于不同装配阶段的病毒核衣壳。有时可观察到上述颗粒结构聚集在一起(图版 III 1 箭头)。偶而在一些囊泡中可观察到病毒样粒子,但无法确认囊泡是属内质网还是高尔基体膜泡。细胞质中的病毒常常分散存在于较大的膜囊结构中,其中充满了无定型基质(图版 I 2,图版 II 2)。有时可观察到这种膜结构开口于细胞外,因而细胞表面的病毒也多包囊在絮状无定型基质中(图版 III 2)。偶尔可见吸附在细胞表面的病毒样粒子(图版 II 1 箭号),尚不知它们是正侵入细胞还是正在出芽释放的病毒。值得注意的是,细胞外分散存在于无定型絮状基质中的某些病毒粒子的包膜不完整,似乎是受到某种水解作用的结果(图版 III 2 箭号)。

2.4 宿主细胞的超微病变

虽然 CSFV 感染的细胞在光镜下检测不到病理变化(cytopathic effect, CPE),但在电镜下却可以观察到某些细胞在超微结构水平上发生的一些明显病理变化。如细胞的核膜发生皱褶,以至某些细胞核呈多形性。有时可见细胞内质网池扩张(图版 III 1),以及线粒体肿胀(图版 I 2)等现象。此外,胞质中也常常可见大量纤维结构(图版 I 2,图版 III 2)。这些显然都与病毒的感染有关。

3 讨论

虽然人们对 CSFV 的超微结构进行了一些研究,但对其形态发生过程至今尚不清楚,只是推测猪瘟病毒的核衣壳是在细胞中装配,并通过内质网或高尔基体以出芽的方式披上包膜,发育成为成熟的病毒。成熟病毒以何种方式向外释放也未见报导。其主要原因可能有两个方面:一是 CSFV 滴度低,从而加大了对其形态学研究的难度。二是需要适时取材,即在 CSFV 形态发生过程高峰时固定样品。由于我们建立了 CSFV-MPK 细胞的感染模式,子代病毒滴度明显提高¹⁰¹。同时对 CSFV 感染的一步生长曲线及细胞中病毒抗原的变化时相的分析,也为 CSFV 的超微形态学研究打下了基础。

本实验首先使用免疫荧光法对 CSFV 抗原在宿主细胞内的存在部位进行检测。使用抗 CSFV 的多克隆抗体检测 CSFV T 株及 C 株感染的 PK15 细胞,结果表明 CSFV 抗原主要存在于感染细胞质中,尤其是细胞核周围的区域。进一步使用抗 CSFV 包膜蛋白 E2 及非结构蛋白 p120 的单克隆抗体进行检测。E2 是 CSFV 的结构蛋白,它存在的部位在一定程度上反应出 CSFV 的成熟与在细胞内聚集的部位。p120 在病毒复制过程中起重要的作用^[11-14],它存在的部位在一定程度上反映了病毒在胞内的复制部位。实验结果表明有丰富内膜系统的细胞核周围是 CSFV 在胞内增殖的主要部位。

我们所观察到的 CSFV 三株病毒(T 株、C 株和 F 株),大小较均一,为 70nm 左右。偶尔也可观察到直径大于 70nm 的病毒样颗粒。对瘟病毒属病毒粒子大小的报导一直有很大的差异。其中包括形态学研究最多的该属代表种——牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhoea virus, BVDV)。早期报导 BVDV 的大小为 20~100nm^[15-17],后来倾向于 40~60nm^[18,19],但仍有人认为 BVDV 的大小随宿主细胞的种类不同而异^[20]。

CSFV T 株的超微结构研究尚未见报导。1989 年龚人雄等首次报导纯化的 C 株,病毒大小为 30~70nm^[7]。1997 年丘惠深等从得猪瘟的病猪体内分离并加以纯化的四种 CSFV 田间野毒的电镜观察结果也在同一范围之内^[9]。然而这些观察基于病毒纯化并经负染色制样,由于 CSFV 病毒包膜脆弱,纯化过程可能造成病毒粒子有不同程度的损伤。相比之下,超薄切片可能更为真实地反映病毒的形态与大小。当然,应用不同的电镜制样技术所观察到的病毒形态与大小也有所差异^[21]。

细胞质中成熟的病毒粒子多见于充满无定型基质的膜囊中。有时可观察到膜囊在质膜处的开口以及周围的无定型基质和其中的成熟病毒。提示 CSFV 可能是通过这一特殊结构向外释放,且多数释放的病毒依然吸附在无定型基质中。这与前人关于释放的病毒主要是吸附或结合在细胞质膜上的推测不同^[2]。

目前尚未观察到瘟病毒出芽成熟的过程,包括该属的代表种 BVDV^[15,18]。其可能的原因是胞质中病毒核衣壳数量很少,且出芽过程较为迅速。我们曾在辛德毕斯病毒(Sindbis virus, Sbv)的 6K 突变株感染的细胞中,观察到大量正在出芽成熟的子代病毒^[22,23]。显然,构建与之相似的 CSFV 突变株,或以某种方式阻断病毒出芽成熟的过程,将有助于对这一过程及其作用机制的深入了解。此外,释放到细胞外的某些病毒粒子,其形态结构已不完整,这也可能是对其大小报道不一且病毒滴度较低的原因之一。

光镜下 CSFV 感染的细胞虽不产生明显的 CPE,但电镜下,某些细胞却表现出明显的病变现象,如:内质网池扩张,线粒体肿胀,胞质小泡数量明显增加等,尤其是细胞核形态发生了改变以及胞质中出现的大量纤维结构,此外,宿主细胞的细胞核也发生形变,产生了指状突起,严重的呈多叶状。我们使用 DAPI 染色在荧光显微镜下也观察到了 CSFV 感染细胞核的形变或裂解成“凋亡小体”样结构^[10]。这些都反映了 CSFV 增殖对宿主细胞不同程度的影响。研究 CSFV 的形态发生过程及其对宿主细胞的影响有助于深入了解 CSFV 的复制过程及其致病机理。

参 考 文 献

[1] Wengler G. Family Flaviviridae. In: *Fields Virology* (M Fields, ed.), Classification and

Nomenclature of Viruses, Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer Verlag, Berlin. 1991, 223~233.

- [2] 殷 震,刘景华. 动物病毒学(第二版). 北京: 科学出版社, 1997, 652~664.
- [3] Meyers G, Rumenapf T, Thiel H-J. *Virology*, 1989, **171**: 555~567.
- [4] Moormann R J M, van Gennip H G P, Miedema G K W, et al. *J Virology*, 1996, **70**: 763~770.
- [5] Enzmann P J, Weiland F. *Arch Virology*, 1978, **57**: 339~348.
- [6] Laude H. *Arch Virology*, 1977, **54**: 41~51.
- [7] 龚人雄, 陈太平, 张晓琴, 等. 兽医药品通讯, 1989, **7**: 4~7.
- [8] 李 成, 赫桂玉, 谷守林, 等. 中国兽医科技, 1989, **7**: 24~25.
- [9] 丘惠深, 郎洪武, 王在时. 猪瘟野毒的分离鉴定及猪瘟野毒疫苗与猪瘟野毒株免疫相关性研究. 见: 畜禽重大疫病免疫防控研究. 北京: 中国农业科技出版社, 1997, 100~104.
- [10] 王 镇, 陆 宇, 周鹏程, 等. 微生物学报, 1999, **39**(3): 189~195.
- [11] Wiskerchen M, Collett M S. *Virology*, 1991, **184**: 341~350.
- [12] Tamura J K, Warrener P, Collett M S. *Virology*, 1993, **193**: 1~10.
- [13] Warrener P, Collett M S. *J Virology*, 1995, **69**: 1720~1726.
- [14] Tautz N, Meyers G, Thiel H-J. *Virology*, 1993, **197**: 74~85.
- [15] Ohmann B H, Bloch B. *Arch Virology*, 1982, **71**: 57~74.
- [16] Chasey D, Roeder P L. *Arch Virology*, 1981, **67**: 325~332.
- [17] Ward A C S, Kaeberle M L. *Am J Vet Res*, 1984, **45**: 165~170.
- [18] Gray E W, Nettleton P F. *J Gen Virology*, 1987, **68**: 2339~2346.
- [19] 张荣兴, 王新华, 葛锡锐. 中国病毒学, 1995, **10**: 86~91.
- [20] Chu H-J, Zee Y C. *Am J Vet Res*, 1984, **45**: 845~850.
- [21] 丁明孝, 焦仁杰, 梁风霞, 等. 电子显微学报, 1991, **10**: 106~111.
- [22] Ggedigk-Nitschko K, Ding M X, Aachlevy M, et al. *Virology*, 1990, **175**: 282~291.
- [23] 梁风霞, 丁明孝. 中国病毒学, 1993, **8**: 226~234.

STUDY ON THE MORPHOLOGICAL PROCESSING OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS IN CULTURED CELLS*

Wang Zhen Min Guangwei Li Mingyi Teng Junlin Ding Mingxiao
(College of life sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract: An infected mode between the Thiverval strain and Chinese strain of CSFV and MPK cells are established. The morphological structure and processing of different strains (T strain, C strain and F strain) of CSFV were studied by ultra-thin section electron microscopy. The virions of CSFV are roughly round and approximately 70nm in diameter with a 40nm core, and are wrapped by membrane. The distinctive pathway of the maturation and release of CSFV are observed. Virions on different developing state and the pathologic changes of host cells have also been reported in this paper.

Key words: Classical Swine Fever Virus (CSFV), Ultra-structure, Morphological processing, Electron microscopy

图版说明

Explanation of plates

图版 I

1. 猪瘟病毒抗原在 PK15 细胞中的定位(免疫荧光技术检测),示激光共聚焦荧光显微镜下 CSFV T 株(A)和 C 株(B)感染细胞中病毒抗原的定位(700×);以及 CSFV 结构蛋白 E₂(C)和非结构蛋白 p12(D)在胞内的分布(400×)。
2. 猪瘟病毒 T 株感染的 MPK 细胞中成熟的病毒粒子(a, b)。成熟的病毒(箭头)散在于胞质中含有无定型基质(*)的囊泡中。细胞的线粒体肿胀(M),胞质中出现大量纤维(F)。a 示六角形的病毒核衣壳(箭号) 标尺 = 250nm 插图标尺 = 100nm)

图版 II

1. 猪瘟病毒 T 株感染的 MPK 细胞中存在于胞质囊泡中(大箭头)和释放在细胞外的成熟病毒粒子(小箭头)。偶尔可见存在于细胞表面的病毒粒子(箭号) 标尺 = 300nm)
2. 猪瘟病毒 C 株感染的 MPK 细胞中散在于含有无定型基质的胞质囊泡(箭号)中的成熟病毒粒子(标尺 = 200nm)

图版 III

1. 猪瘟病毒感染的 MPK 细胞中 COP 包被的运输小泡(箭号)及聚集的直径 40nm 左右的病毒核衣壳样颗粒(箭头) 标尺 = 400nm)
2. 释放到细胞外的 CSFV 病毒粒子(箭头)示无定型絮状基质(*)和可能部分降解的病毒粒子(箭号) 标尺 = 300nm)

Plate I

1. The localization of CSFV antigen in PK 15 cells (detected by immunofluorescence technique), showing Cells infected by CSFV T strain (A) and C strain (B) (under confocal microscope, 700×) and the localization of structural protein E₂ (C) and non-structural protein p12 (D) of CSFV (400×)
2. The mature viral particles in MPK cells infected by CSFV T strain (a, b). Viral particles (arrowhead) are surrounded by amorphous floccular material (*) in the cytoplasmic vesicle, the mitochondria looks swelling and there are a large amount of fibrils (F) in the cytoplasm. Arrows show the hexagonal nucleocapsids of CSFV (Bar = 250nm) (Bar of inset = 100nm)

Plate II

1. The mature viral particles in MPK cells infected by CSFV T strain. Viral particles are in cytoplasmic vesicle (large arrowhead) or outside cell (small arrowhead), and sometimes on cell membrane (arrow) (Bar = 300nm)
2. The mature viral particles in MPK cells infected by CSFV C strain. Arrowheads show the viral particles surrounded by amorphous floccular material in vesicles (arrow) (Bar = 200nm)

Plate III

1. The COP-coated vesicles (arrow) and the nucleocapsid-like particles with 40nm in diameter (arrowhead) in the cytoplasm of CSFV-infected MPK cell (Bar = 400nm)
2. The released viral particle (arrowhead) showing the amorphous floccular material (*) outside cells and possibly partly degraded viral particles (arrow) (Bar = 300nm)