

流行性乙型脑炎病毒的电⼦显微镜研究*

龐其方 張礼璧

(中国医学科学院病毒学研究所,北京)

流行性乙型脑炎病毒的形态学研究的文献见到很少,日本研究者寺田正中等^[1],吉田清三等^[2],泉仙助等^[3]的简短文字叙述,既无图片查考,也非系统研究,而且上述工作均以提纯病毒作为依据,不能了解此病毒在细胞中的动态及其形态特点。我国自1950年^[4]首次分离得此病毒后曾做了大量生物学工作和少量理化特点的研究,仍缺乏形态学资料,这方面不利于进一步探讨此病毒和细胞间的相互关系。本文报道利用电子显微镜方法研究京卫研₁株流行性乙型脑炎病毒在细胞中的繁殖动态、形态特点以及其所引起的细胞超微病理变化。

材料和方⼩法

病毒 流行性乙型脑炎京卫研₁株第41—45代,用鼠脑传代的新鲜病毒悬液稀释100倍接种组织培养单层细胞。

细胞 (1)鸡胚纤维母细胞,以10%小牛血清的水解乳蛋白液作为培养液,待长成单层后用0.5%水解乳蛋白液作为维持液。

(2)地鼠肾细胞,以20%小牛血清的水解乳蛋白液作为培养液,以0.5%水解乳蛋白液作为维持液。两种细胞均在50毫升小方瓶中长成和接种病毒。受感染细胞经48及72小时培养后制成标本块切片。

标本制备和切片方法 按武忠弼等^[5]所著“电子显微镜在医学及生物学上的应用”一书中所载操作方法进行,在包埋方法上稍作变更如下。

(1)包埋方法 正常或受染细胞用0.125%胰酶在37℃水浴中消化10分钟,然后低速离心沉淀5分钟,收集细胞于试管底部,弃去上清液后作如下固定及包埋:

- 1—2% OSO_4 固定 1 小时
- 50% 酒精脱水 10 分钟
- 70% 酒精脱水 10 分钟
- 90% 酒精脱水 10 分钟
- 100% 酒精脱水 10 分钟
- 100% 酒精脱水 10 分钟
- 1:1 (丁酯:100% 酒精) 浸 30 分钟
- 6:4 (丁酯:甲酯) 浸 30 分钟

每次脱水和浸透之后都需离心弃去原上清液。包埋剂采用甲基丙烯酸丁酯和甲酯,以6:4的比例(加2%过氧化苯甲酰在60℃半聚成蜂蜜样胶体)包埋细胞于细玻璃管(内径0.5厘米)底部,经70℃4小

* 周静仪同志参加部分技术工作,特此致謝。
本文1963年10月12日收到。

时后聚合变硬。为修整方便起见，将上述組織块切成 1 毫米³ 小块再用半聚合的丁、甲酯包埋于 2 号胶囊内，經 18 小时制成組織块。

(2)超薄切片机 民主德国 Jung-Mai 型。

(3)电子显微镜 民主德国 WF 厂 SEM-3 型，物鏡光栏 50—60 微米，观察和照相均用 60 KV 加速电压，放大倍数以 0.77 微米碳膜光栅校正。

(4)电子感光板 国产红旗电子感光板 026 号。

实 驗 結 果

1. 正常地鼠腎細胞和鸡胚纖維母細胞

这二种細胞和其他不同动物或組織来源的細胞相类似，具有完整的細胞器体系：核、核仁、染色质、核膜。細胞核的外形基本上保持圓或橢圓形。在不同机能状态下的細胞核尚可見其分瓣、核膜和核浆突入胞浆等情形。

細胞浆内的各种細胞器随着切片角度不同，在某些細胞内可以清楚地分辨高氏区，平滑型和粗糙型的动质结构。綫粒体具有較固定的形态，内部嵴突及其双层膜清楚可辨。細胞外膜和其微褶 (Microvilli) 随着細胞的机能活动性强弱而增減。細胞基質和微粒体的多寡与細胞所处的机能状态有着密切的关系。

地鼠腎細胞和鸡胚纖維母細胞从超微结构方面不能給予区别，但二种細胞都能因机能活动性的不同而分別表现为：(1)电子束穿透率強，内部结构稀少的“白細胞”；(2)电子束散射強，内部结构致密的“黑細胞”^[10]。在白細胞和黑細胞之間还存在各种不同的过渡阶段。白細胞是反映細胞功能的相对靜止状态，黑細胞則是細胞处于活动状态的表现[图 1(1)及(2)]。

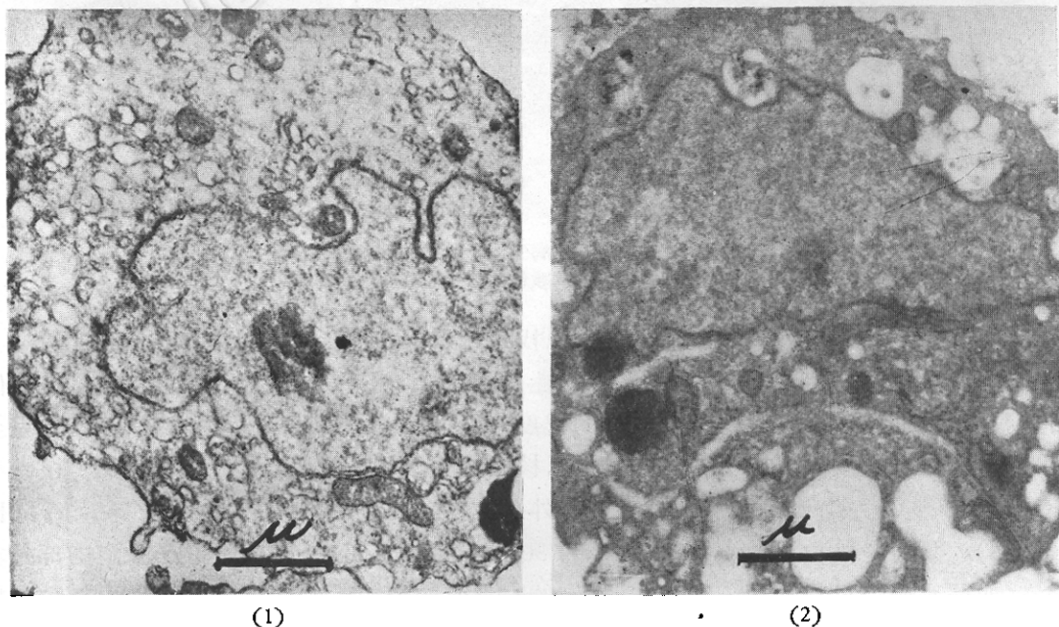


图 1 正常細胞培养中所見(2)电子束散射強而内部结构致密的“黑細胞”与(1)电子束穿透強的内部结构稀少而疏松的“白細胞” 14700×，鸡胚纖維母細胞。

2. 病毒感染后的细胞病变

流行性乙型脑炎病毒京卫研₁株感染地鼠肾及鸡胚纤维母细胞后,并非每个细胞都表现病变。少部分细胞没有病变。凡是有病变的细胞也处于不同病变阶段中——由早期的病变到晚期的严重变性。

早期病变的特点是细胞活动性增强,呈“黑细胞”型,而且比正常细胞群中的“黑细胞”稍稍更黑,其表现为:细胞膜上的微褶出现得多而且频繁,浆内的线粒体和动质结构增加,线粒体内的嵴突伸长而曲折褶皱迭,胞浆内基质十分浓厚,电子散射度增大。细胞核常呈不规则形,大多有分瓣的情况,最明显的一点是在此等活动性增强的细胞中往往存在大量脂蛋白巨颗粒(Proteid yolk),少的4—5颗,多的10余颗,此等脂蛋白巨颗粒在正常“黑细胞”中虽然亦能见到,但为数及颗粒大小均少于或小于早期受染“黑细胞”(图2)。

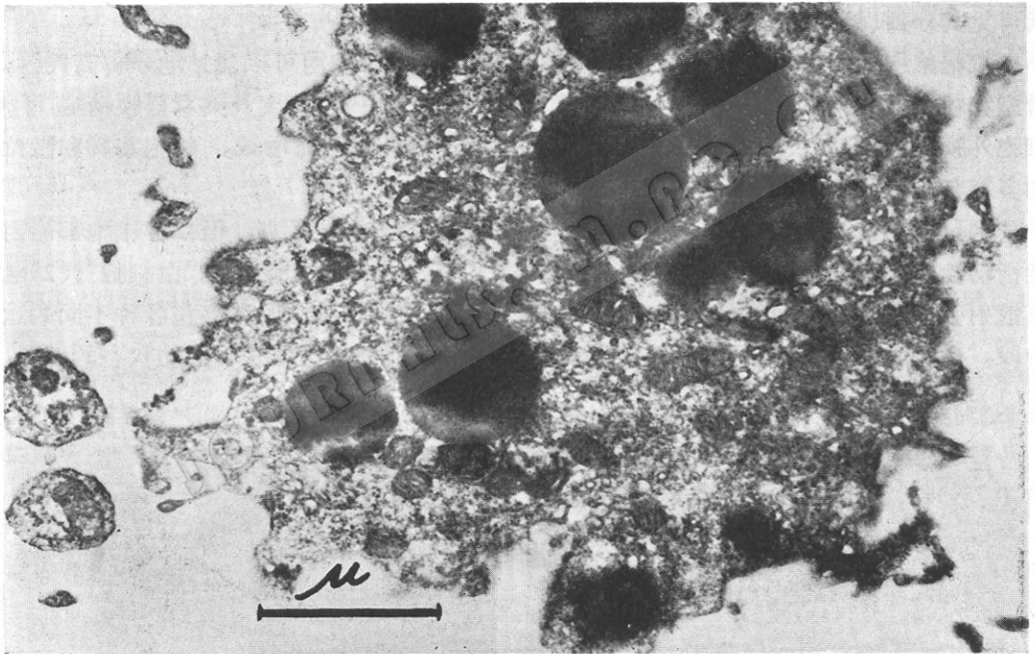


图2 受病毒感染后的细胞早期病变——细胞的机能活动性增强,呈“黑细胞”型细胞脂蛋白巨颗粒(黑色)在细胞中大量存在。

在此种早期病变的黑细胞中,一般难以找到病毒颗粒。

晚期的细胞病变表现为细胞退行性变性:胞膜断续残存,浆内出现大量空泡,线粒体由肿胀到破裂或形成空泡,嵴突呈现不同程度的断损,动质或高氏区结构断续存在或完全消失,胞浆基质团聚而渐趋消失,核膜增厚,核浆基质减少,团集成云状小片散布于核内各处。此时病变最为突出的一点是在空泡内外出现为数极多的微泡(Multiple Vesicles)(图3,4,5)。微泡一般总是成堆存在,大小为30—60毫微米不等,成椭圆形。微泡内部并非全空,而是有细胞浆基质存在。在这些微泡的附近或微泡内部往往可以发现病毒颗粒。细胞核内部虽然病变也很明显,但在本实验中未曾发现有病毒颗粒的存在。此外,必须指出早期病变的细胞中偶尔亦可见微泡的产生。

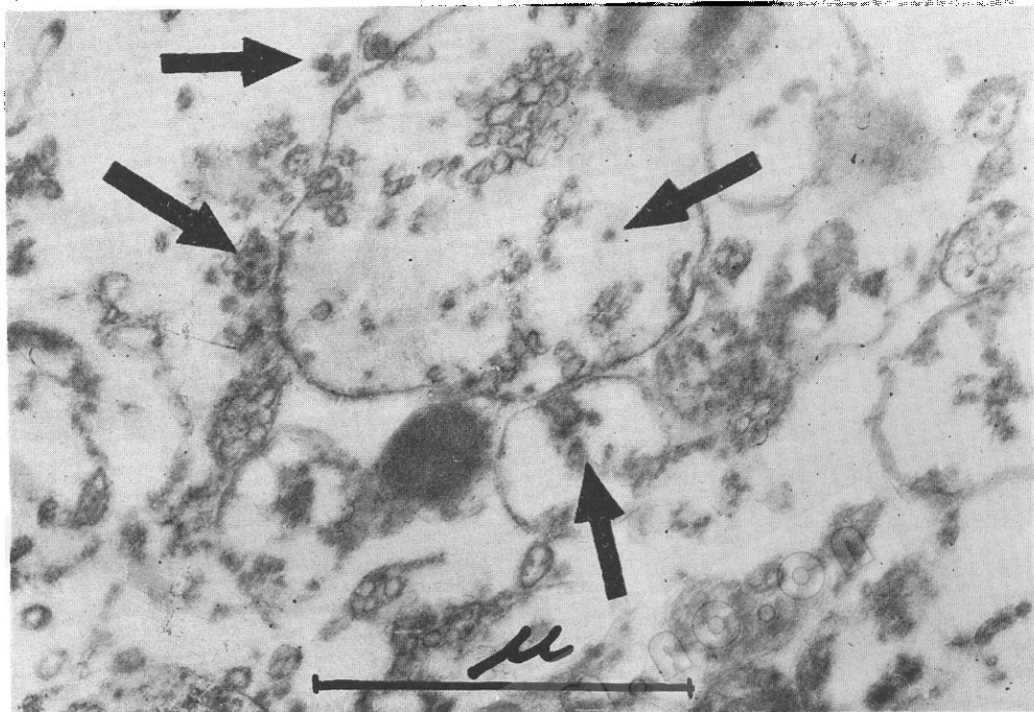


图 3 在晚期病变时细胞浆内形成的病毒颗粒，(↑)所指病毒具有致密的内部结构及隐约可辨的外膜样结构 48000×，感染后 72 小时的病变地鼠肾细胞。

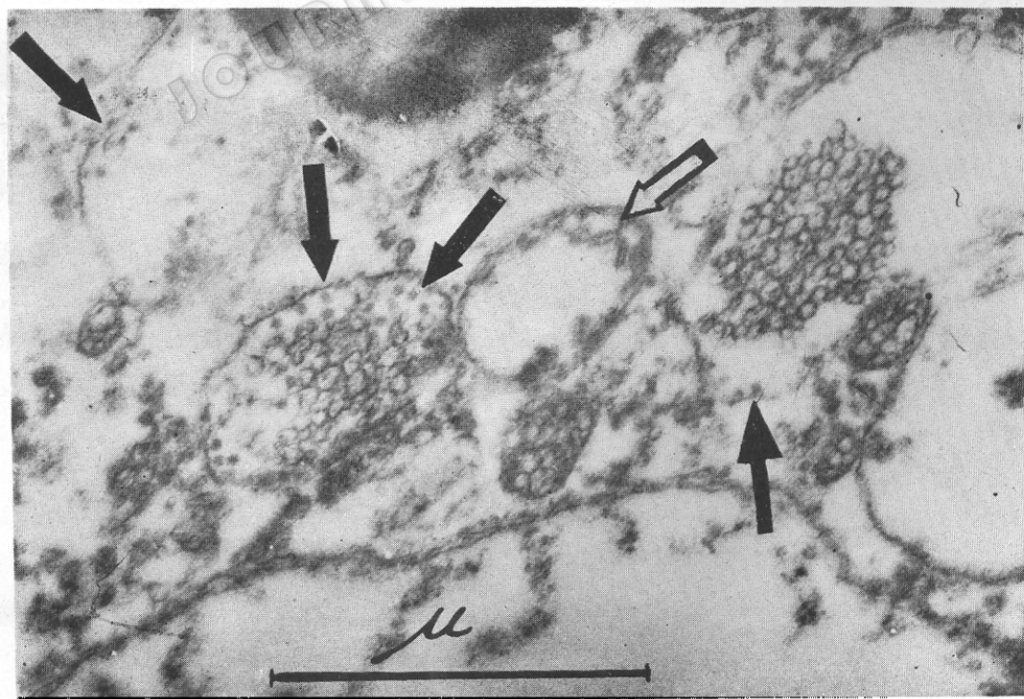


图 4 空泡内微泡附近的病毒颗粒形成过程(↑)以及病毒的核糖体(↗)中残存的嗜突 48000×，感染后 72 小时的病变地鼠肾细胞。

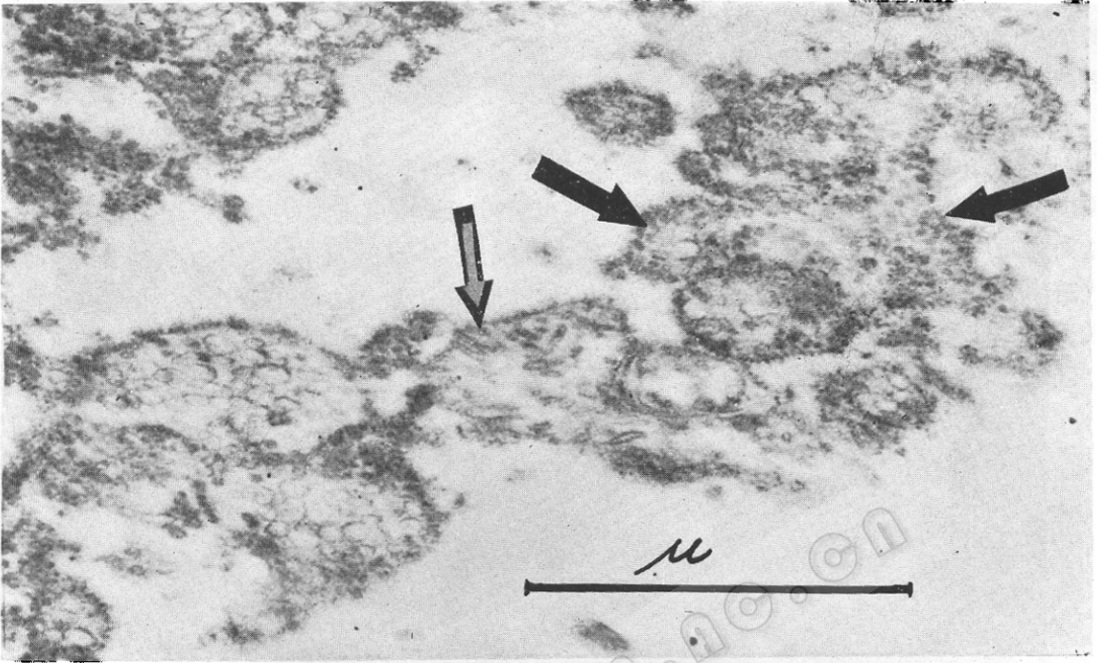


图5 成羣的病毒在空泡內形成，凡是为数众多的輪廓清楚的病毒出現处，微泡明显減少，微泡的泡膜也不复可見。图片中部可見病变的綫粒体及其残存的嵴突（空心箭头所指） 49000 \times ，感染后 72 小时的較晚期病变鸡胚纖維母細胞。

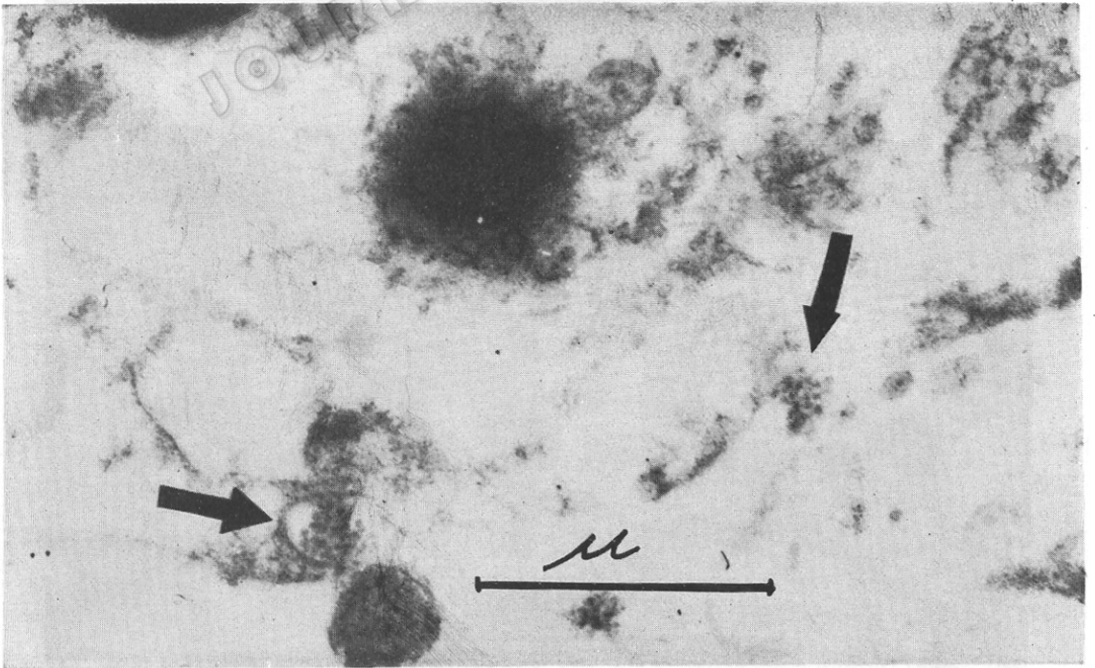


图6 成羣的病毒通过空泡被細胞释放出来
38460 \times ，感染后 96 小时的病变地鼠腎細胞。

3. 流行性乙型脑炎病毒的繁殖和释放

京卫研₁株脑炎病毒分别在地鼠肾及鸡胚细胞中各以 10 颗粒病毒测其大小，结果如下：

一般病毒的直径平均为 26.4—26.8 毫微米。

较大的病毒颗粒直径平均为 31.2—31.6 毫微米，其内部有偏向于一面的致密部分（直径 18.8 毫微米）（图 3, 4, 5）。不同大小的病毒均呈圆形。平均波动范围为 26—32 毫微米。部分病毒因切片上所受压力和观察时支持膜收缩的牵引力关系而呈椭圆形。

明显的病毒颗粒在多数情况下存在于空泡内的微泡附近，并同时亦出现于浆内基质浓缩区。在微泡内部有时亦能见到从隐约可辨到轮廓比较清楚的病毒颗粒，凡是轮廓十分清晰的病毒，周围微泡的泡膜也不复可见（图 5）。

在同一个细胞中可以在不同部位找到病毒集落，此点尤其以病变严重的细胞为甚，早期病变细胞中则往往只能见到某一处有少量病毒存在。

在晚期病变细胞的边缘部分，时常可以见到成群的病毒颗粒被释放出去，这些病毒的周围可看到原先被包着的空泡膜，而且此空泡膜正处在打开的过程（图 6）。

讨 论

1. 日本研究者吉田清三等^[3]报道用鼠脑繁殖的日本乙型脑炎病毒，经提纯后电子显微镜测定为 20—40 毫微米，平均为 35 毫微米，由组织培养细胞提纯的病毒为 15—35 毫微米，平均 28 毫微米。寺田正中等^[2]也用提纯病毒观察，测定为 20—30 毫微米。泉仙助等^[4]报道日本乙型脑炎病毒中山株和 GE 株的鼠脑及组织培养繁殖后提纯的病毒，其大小为 20—40 毫微米，病毒为球形。但有关该病毒在细胞内形态特点未曾见到有文献报道。本文利用超薄切片方法所观察的病毒为 26—32 毫微米，相当接近于吉田清三等以及泉仙助等所获结果。至于日本研究者测得的病毒大小波动范围较大的原因，作者认为可能因提纯方法本身的缺陷所引起，一些组织成分和经化学处理后的破碎病毒亚单位恐怕难以去除。

从切片标本所见，某些病毒颗粒中心部分有直径为 18.8 毫微米左右的致密地区一点看来，乙型脑炎病毒可能有亚单位的存在（图 3 左方及下面箭头所指病毒颗粒）。

病毒颗粒的出现率在二种细胞中不尽相同，如表 1 所示，地鼠肾细胞中似更容易找到病毒，而培养的温度（从 34—37℃）的变化也未使病毒在细胞内形成晶体排列。

表 1 鸡胚纤维母细胞和地鼠肾细胞的病毒颗粒出现率

细胞种类	培养温度(°C)	实验批数	发现病毒批数	阳性率
鸡胚纤维母细胞	34	2	0	3:14
	35	1	0	
	37	11	3	
地鼠肾细胞	37	6	6	6:6

由于流行性乙型脑炎病毒在上述条件下不形成组织内的晶体排列（有如小儿麻痹病毒所见），也不存在于空泡周围形成整齐的次序排列（如西方马脑炎病毒所见），并且在蚕

光屏上不能区别其他组织成分,故欲发现病毒颗粒存在着很大的困难,这也可能成为文献资料缺如的原因之一。

2. 病毒的繁殖部位主要是在细胞浆各部位的空泡内,部分病毒繁殖于细胞基质浓缩区。并不象春夏脑炎那样仅繁殖于高氏区 (Kovac *et al.*)^[7]。

委内瑞拉脑炎 (Mussgay *et al.*)^[8] 和西方马脑炎 (Morgan *et al.*)^[9] 都繁殖于细胞浆各部位,但均有其特殊的排列形式。流行性乙型脑炎病毒和上述其他脑炎病毒相似,均未在细胞核内发现有病毒颗粒。

3. 病毒的释放方式按本实验材料观察最大的可能性是空泡释放,成堆的病毒在空泡内成熟后立即由细胞主动将整个空泡排向胞浆周缘地区,然后打开细胞膜将其排除于细胞体外(图6),但单个病毒颗粒由胞膜释放出来的可能性还是存在的,由于难于区别单独存在的病毒和细胞本身排出的代谢物,故目前不能肯定此释放方式。西方马脑炎和委内瑞拉脑炎病毒都是由空泡释放和单个病毒释放的情况,看来与流行性乙型脑炎病毒相似。

4. 病毒的繁殖过程,从所获资料分析也很可能与中型甚至某些大型病毒相仿,即由基质浓缩区首先形成体积较大、具有膜样结构的疏松的未成熟病毒,发展到体积较小、致密和难以辨别的病毒膜的成熟病毒。

1962年为 Kovac 首先描述的微泡 (Kovac 称此为 *dicht gelagertes Bläschen*) 在本实验中也出现了。但这类微泡是否是病毒感染后特殊的病理变化 (特别是小型嗜神经性病毒),现在还难以定论。

图5空心箭头所指均为变性的线粒体,既有成熟和不成熟病毒的存在,也可见残存的嵴突,因此病毒也可能在线粒体内繁殖。

5. 早期受染细胞的活动性增强和脂蛋白代谢产物的增多,以及其所以能变成“黑细胞”(即嗜 OSO_4 性增强)^[10]与细胞内核酸代谢增加有关等情况似也符合于生物化学资料^[9]。

由于受染细胞活动性增强的时期很短,因此这些“黑细胞”的出现率大大低于有较重病变的“白细胞”。从其形态的表现和存在的暂短性看来,作者认为这是一种在某些病毒感染细胞后的非特异性的,抗拒外来有害因子的细胞反应。

结 论

1. 用电子显微镜及超薄切片方法,在组织培养的鸡胚及小鼠肾细胞中观察了流行性乙型脑炎病毒 (JEV),大小为26—32毫微米。有致密的内部结构。

2. JEV 繁殖于细胞浆内各部,伴随着病毒的出现,胞浆内有大量微泡形成,核内未发现病毒颗粒存在。

3. JEV 主要以空泡释放方式被细胞排出,一部分病毒亦可能在线粒体内繁殖。

4. 早期受染细胞的机能活动性增强,晚期才引起细胞严重病变。

5. 本文讨论了 JEV 成熟过程,微泡和病毒颗粒的关系等。

参 考 文 献

[1] 黄祯祥、王逸民: 中华医学杂志, 37: 280, 1951。

[2] 寺田正中、大黑勇、富井武宽、星野孝、加藤德夫、口羽二郎: 日新医学, 38 (5): 325, 1951。

- [3] 吉田清三、高野昭夫、蓮井正亮：十全医学会杂志，57：2065，1955。
[4] 泉仙助、吉田清三、横井卫、高野昭夫、蓮井正亮：日本細菌学杂志，11：618，1956。
[5] 武忠弼、庞其方、孙纪申：电子显微镜在医学及生物学上的应用，人民卫生出版社，1961。
[6] Kovac, W., Kung, Ch. und Stockinger, L.: Arch. gesamt. Virusforsch. Bd. 9 Heft 4, 544 (1962).
[7] Mussgay, M. and Weibel, J.: *Virology*, 16: 52 (1962).
[8] Morgan, C., Howe, C. and Rose, H. M.: J. exp. med. V. 113: 219 (1961).
[9] Koppelman, R. and Evans, E. H.: Progr. in med. *Virology*, 2: 73 (1959).
[10] Gansler, H.: 5th inter. cong. Electron microscopy Vol. 2, N5. (1962).

ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES ON JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS (JEV) IN TISSUE CULTURE CELLS

PANG CHI-FANG CHANG LEE-PEE

(*Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

The present work details electron microscopic observations concerning the development of JEV in chick embryo fibroblasts and hamster kidney cells. In the early stage of the infection, "dark cells"—cells with marked metabolic activities, appeared among the "bright cells"—cells with less metabolic activities. One of the most distinct changes of the infected cells in the moderate and advanced stages was the formation of "multiple vesicles" in all parts of the cytoplasm, accompanied by the appearance of JEV. The development of JEV could be seen almost in all parts, especially in the vacuoles and matrix substance of the cytoplasm, but not in the nucleus.

JEV measured approximately 26—32 μ in diameter and appeared round in shape. No intracellular crystal formation could be found in our studies. The release of JEV from the cells was found to be mainly through the vacuoles, which usually contained large number of virus particles. The relationship between JEV and the vesicles is discussed.