

单纯疱疹病毒形态发生的多样化方式

I. 单纯疱疹病毒的细胞质内形态发生方式

洪涛 楚雍烈 王见南 周静仪

(中国医学科学院病毒学研究所,北京)

通过对单纯疱疹病毒 (HSV) 形态发育的电镜研究,发现了 HSV 胞质起始发育现象。HSV 细胞质形态发生方式的过程可分为:(1)胞质致密区的形成,(2)豹斑形成,(3)核心形成,(4)核壳体的装配,(5)核壳体的进一步发育。这一过程与人们熟知的核内形态发生方式同时进行,显示出 HSV 形态发生方式的多样化。

病毒形态发生学是病毒学的重要组成部分,它的任务是研究病毒在宿主细胞内复制和装配的全过程^[1]。显然,它的研究在基础理论和实际应用上都是非常重要的。

单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus HSV)是有囊膜的 DNA 病毒,它能在人群中造成广泛的感染,有产生持续感染的倾向,还与肿瘤的发生有一定关系,故受到人们的重视^[5-8]。一般认为,HSV 的核壳体在核内装配,与细胞质无关^[1-11]。Kaplan 等曾对 HSV 的形态发育做了全面的评述^[6,7]。

早在 1973 年 HSV 的分离和鉴定工作中,我们注意到新分离的 HSV 野毒株感染的细胞质中存在着不同发育阶段的病毒核壳体,以后又多次发现这些现象。为了证实这一发现,近来我们做了全面观察,获得了 HSV 在细胞质中装配核壳体的大量证据。

材料和方法

(一) 病毒

1. HSV₁₀ 株,由卫生部药品生物制品检定所提供,系从病人身上分离的野毒株。

2. HSV₁ mP 株,13 株,均由美国芝加哥大学 Roizman 教授赠送。

(二) 细胞

1. HeLa 细胞,本室传代细胞株,常规培养传代^[12]。

2. 原代乳兔肾 (BRK) 细胞、人胚肾原代细胞,均按本所常规制备、培养和维持^[13],待长成单层细胞后备用。

(三) 病毒感染细胞

1. HSV₁₀ 株感染人胚肾细胞,用 10^{-2} 高滴度病毒悬液接种,37℃ 培养,待 70% 以上细胞产生病变 (CPE⁺⁺⁺) 时,用橡皮小铲刮下细胞,低速离心 (3,000rpm) 15 分钟,用 1% 戊二醛将细胞团块在 4℃ 固定半小时,用 Palade 缓冲液漂洗,置 4℃ 备用。

2. HSVmp 株,13 株分别感染 HeLa 细胞和 BRK 细胞:分别用 10,000 TCID₅₀ 病毒量接种,37℃ 吸附 1 小时后常规培养,并分别在细胞病变出现的早、中、晚期取材,其它处理同上所述。

(四) 电镜标本制备^[13]

将上述制备好的细胞团块用 1% OsO₄ 后固定 30 分钟,以 Palade 缓冲液漂洗数次后,常规丙酮序列脱水,618 树脂包埋,经浸透、聚合后,在 LKB 超薄切片机上制片,经铀、铅双染色后,在

本文于 1980 年 9 月 19 日收到。

JEM-100B 电子显微镜下观察。

各感染系统正常细胞对照处理程序同上。

结 果

对不同感染系统的各期标本进行系统观察,除观察到 HSV 的细胞核内形态发生方式外,还发现细胞质内也存在着 HSV 核壳体的装配过程。为便于描述,依据形态学特点将这一连续过程分为以下几个阶段(附示意图):

1. 胞质致密区的形成:在早期,细胞质中的一些区域除游离的多聚核糖体外,其它细胞器明显减少。而后,形成一些簇集成堆的致密颗粒区,其内部可见少量的致密斑,没有其它细胞器存在。其周围的

细胞器形态发生改变,如粗面内质网囊腔扩张及脱粒现象。值得指出的是,此时细胞质中尚无病毒核壳体的存在,而且此种改变颇似痘苗病毒细胞质发育时“工厂区”的早期形态^[4,13]。(图版 I-1)。

2. 豹斑形成:继而细胞质内形成一些大小不等、形状不规则的致密斑片,如棉絮样散布于胞质中,颇似豹皮上的斑块。此时在细胞质中尚未发现 HSV 核壳体的形成(图版 I-2)。

3. 病毒核心样结构的形成:随感染时间的延长,豹斑中心部电子密度逐渐增高,由小点状的浓缩逐步扩大成直径 50 nm 左右的致密核心,其大小、电子密度和形态与病毒核心相似(图版 I-3)。

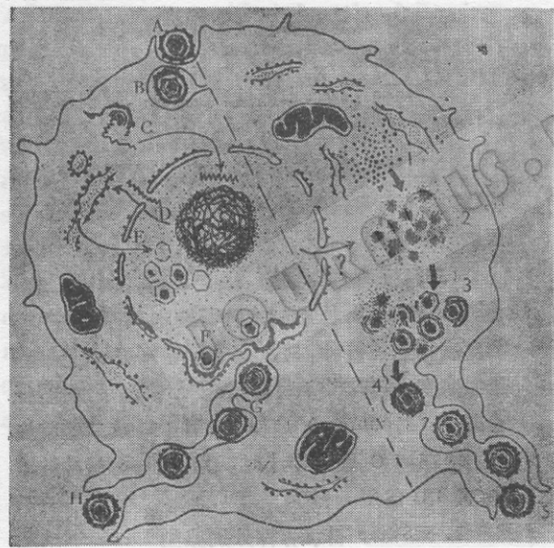
4. 核壳体的装配:在致密核心附近,常见到壳膜样结构片段,它们逐步在核心部位装配,形成弧形、新月形结构包裹核心,最后构成具有六边形 HSV 核壳体的典型形态。有时也可发现少量空心核壳体。(图版 I-4、II-5)胞质装配的核壳体与核内组装者以及胞外成熟病毒的核壳体迥同。

5. 胞质中核壳体的进一步发育:在细胞质装配的核壳体,向泡质空泡靠近,以出芽方式获得囊膜发育为成熟病毒(图版 II-5)。

HSV 细胞质内的形态发生过程参看示意图所示,并可与其核内形态发生方式进行比较。

讨 论

至今所知,除痘病毒外,所有人类的 DNA 病毒都有典型的核内形态发育过程^[7]。HSV 在感染细胞核内形成包涵体,并在核内装配自己的核壳体^[2-6]。本实验在多种感染细胞上反复观察,再次证实宿主细胞核是 HSV 复制及核壳



HSV 的形态发生方式示意图

左边:传统的形态发生方式。A—H 显示该过程的不同阶段。
右边:细胞质内形态发生方式。1.胞浆病毒基质区,2.豹斑形成,3.核壳体的装配,4和5.病毒颗粒的进一步发育和释放。

Explanation of the Illustration

The left part: The conventional morphogenesis of HSV A—H show the process of morphogenesis.

The right part: Intracytoplasmic morpho-origen of HSV

1. Formation of the cytoplasmic viral matrix,

2. Formation of the "leopard spots", 3. Assembly of viral nucleocapsids, 4 and 5. Releasing of mature virions.

体装配的主要场所。

但是本实验同时发现以下事实:(1)在 HSV 感染的细胞质中,有病毒基质样结构存在,它们似有一变化过程,并出现在 HSV 核壳体形成之前。随时间的延长,基质周围常伴有壳膜片断和不同类型的核壳体,这与核内病毒的前身物质类似^[1]。(2)在病毒基质区,可看到病毒核样物质的形成及核壳体装配的中间状态,提示它们处在装配的某一阶段。(3)胞质装配好的核壳体有其进一步发育的途径。(4)整个过程都在细胞质中完成,周围伴有细胞器,具明显的胞质性质。(5)这些现象在不同的感染系统中均存在,它可能是一种普遍现象。这很可能构成 HSV 的另一条形态发生途径,即 HSV 同时具有细胞核内和细胞质内两种形态发生方式。

Darlington 等人曾注意到 HSV 感染的细胞质中核壳体的存在^[4],但认为这是个别的偶然现象,解释为可能是感染晚期核膜破裂后核内核壳体的漏出。本实验对此现象进行了反复观察,结果确认以下事实:(1)在 HSV 感染的细胞质中,裸体核壳体普遍存在,绝非偶然现象。(2)胞质核壳体的装配是一连续动态过程,先形成基质,再形成核心、核壳体。(3)胞质装配的核壳体能进一步发育为成熟病毒。(4)在胞质核壳体形成时,核膜完整,而且从未看到核内核壳体不经出芽发育而直接进入细胞质的现象。结合这一过程的胞质形态特征,表明这些核壳体在胞质原位装配的可能性。

事实早已证明,DNA 病毒可在胞质进行装配,痘病毒即是典型的例证^[14,15],HSV 和其相比,二者形态结构均复杂,含有大量的遗传信息,能编码一些酶。HSV 众多的遗传信息可能就是其胞质形态发生方式的基础。

在人类 DNA 病毒中,HSV 在形态特点、DNA 分子量、繁殖周期等方面都介于胞质发育的痘病毒和典型核内发育的腺病毒之间^[17],从病毒分类学和从生物进化的角度看,它兼具两者的形态发生方式并不足为奇。

HSV 发育的生化过程已有详尽的研究^[6,7],已知病毒的 DNA、mRNA 及结构蛋白均可通过核膜,在病毒感染时,核膜的通透性是有变化的^[18],核内合成的大量 DNA 成分有可能被转运到胞质中。此外,细胞生物学的研究表明,细胞质中也有少量 DNA 复制、转录的酶体系^[19],病毒利用它们在胞质中进行复制也有可能。分子病毒学的研究指出,只要原料齐全,病毒的装配是自发的,胞质中结构蛋白是大量的,DNA 的来源又有以上可能,所以 HSV 在胞质装配核壳体在理论上是有可能的。铁蛋白标记免疫电镜技术结果表明,我们所发现的胞质致密区、豹斑、正在装配的核壳体附近都结合有许多铁蛋白颗粒,证明它们含有大量的 HSV 抗原成分(图版 II-6)。

本文仅从形态学的角度提出了 HSV 细胞质内形态发生方式的存在,最后的确证尚须多学科的综合研究及新技术手段对此方式进行深入研究。但通过电镜直接观察,可对许多问题做出较肯定的结论。而 HSV 细胞质内形态发生方式的发现,国内外尚未见文献报道。它的提出,不仅表明 HSV 形态发育方式的多样化,而且对病毒形态发生学及分子病毒学的研究提出了新的问题。

参 考 文 献

- [1] Joklik, W. K. and H. J. Zweerik: *Annu. Rev. Genetics*, 5: 297-360, 1971.
- [2] Morgan, C. et al.: *J. Exp. Med.*, 110: 643-656, 1959.

- [3] Watson, D. H.: *Virology*, **24**: 523—538, 1964.
- [4] Nii, S.: *Biken. J.*, **14**: 177—190, 1971.
- [5] Fenner, F. and D. O. White: *Medical Virology*, (by Fenner, F. J. et al.), 2nd. ed. Academic Press, New York, 1976, pp. 297—305.
- [6] Roizman, B. and D. Furlong: *Comprehensive Virology*, (by Fraenkelconrat, H. et al.), Vol. 3. Plenum Press, New York, 1974, pp. 229—382.
- [7] Watson, D. H.: *The Herpesviruses*, (by Kaplan, A. S.) Academic Press, New York, 1973, pp. 133—216.
- [8] Joklik, W. K. et al.: *Zinsser Microbiology*, (by Joklik, W. K.), 16th edition, Appleton-century-crofts, New York, 1976, pp. 828—848.
- [9] Schwartz, J. and Roizman, B.: *J. Virol.*, **4**: 879—889, 1969.
- [10] Smith, J. D. et al.: *J. Virol.*, **12**: 919—930, 1973.
- [11] Smith, J. D. et al.: *J. Virol.*, **26**: 102—109, 1978.
- [12] 中国医学科学院流行病学研究所编:《常见病毒病检验技术》,第1版,科学出版社,北京,1978年,第66—75页。
- [13] 洪涛等:《生物医学超微结构与电镜技术》(洪涛主编),第1版,科学出版社,北京,1980年,第113—173页。
- [14] Moss, B. et al.: *Nature (Lond.)*, **224**: 1280, 1969.
- [15] Granados, R. R. et al.: *Virology*, **40**: 230—243, 1970.
- [16] Darlington, R. W. et al.: *Prog. Med. Virol.*, **11**: 16, 1969.
- [17] Fenner, F. and D. O. White: *Medical Virology*, (by Fenner, F. J. et al.), 2nd. ed., Academic Press, New York, 1976, pp. 47—66.
- [18] Giese, A. C. et al.: *Cell Physiology*, (by Giese, A. C.), 5th ed., Philadelphia Saunders, Co., 1979, pp. 192—194.
- [19] Ashwell, M. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **39**: 251—283, 1970.

MULTIPLE MODE OF HERPES SIMPLEX VIRUS MORPHOGENESIS

I. CYTOPLASMIC MORPHO-ORIGINATION OF THE HSV AS OBSERVED BY ELECTRON MICROSCOPY

Hong Tao Chu Yonglie Wang Jiannan Zhou Jingyi

*(Department of Virus Morphology, Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences,
Beijing)*

A systematic investigation was carried out on morphogenesis of HSV by means of electron microscopy.

An unusual morphogenesis of HSV, in terms of intracytoplasmic assembly of herpes virions, concurrently with the well known conventional mode of morphogenesis, has been repeatedly observed by electron microscopy. The process of morphogenesis of HSV *in situ* in the cytoplasm of infected cells was as follows: 1) In the early stage, there were always some remarkable changes in cell organells. In the granulated early matrix some dense homogenous spots could also be seen and this has been identified as viral matrix

by immunoferritin Electron Microscopy. 2) Numerous electron dense spots, varying in shape and density, appeared in the matrix. They were designated as "leopard spots" since their density and pattern of dispersion looked like leopard spots. 3) Once the leopard spots were formed, their density increased progressively, becoming electron opaque cores with a diameter around 50 nm. 4) The cores were afterward enclosed by capsid-like structures, some being incomplete, some complete, resembling the nucleocapsids formed in the nucleus. 5) A further envelopment of the nucleocapsids, being assembled in the cytoplasm, was also observed.