

## 牛传染性鼻气管炎病毒的形态结构及其在细胞内发生的研究

翟中和 丁明孝

(北京大学生物系, 北京)

李 汉 秋

(北京市农业科学院畜牧兽医研究所, 北京)

仰惠芬 李昌琳 封启民

张瑞珍 杨冰清

(农业部动物检疫所)

用负染法和超薄切片法研究了我国首次分离的 IBR 病毒的形态结构及其在犊牛肾细胞内发育的基本过程。病毒直径为 160—230nm, 成熟病毒由直径为 50—60nm 的核心、直径为 100—110nm 的衣壳和囊膜三部分构成。在负染的样品中, 可以观察到呈三重对称和二重对称的核壳体及其衣粒的构型, 从而推算出病毒衣壳由 162 个衣粒构成。该病毒具有典型疱疹病毒科的发育与成熟方式。此外, 它可能与鸭瘟病毒一样, 还具有一条细胞质内的发生途径。

一株未知的病毒系从国外进口的发病奶牛鼻腔中分离出来, 经病理学、血清学、形态学和病毒理化特性的研究, 确定该病毒为牛传染性鼻气管炎病毒 (以下简称 IBR 病毒)。IBR 病毒属于疱疹病毒科, 是牛的一种急性呼吸道传染病——牛传染性鼻气管炎的病原体。该病于 1955 年首先发现于美国, 其分布渐趋世界性, 但是在我国过去尚未发现该病流行, 国内也未见到有关 IBR 病毒电镜研究的报道。我们通过电子显微镜超薄切片和病毒提纯负染技术, 对我国首次分离的 IBR 病毒的形态结构及其在细胞内的发生进行了研究, 以对该株病毒的鉴定进一步提供依据, 并对 IBR 病毒的特点与其它疱疹病毒类做了些比较分析。有关 IBR 病毒的形态与发生在国外已有少量报道<sup>[1-9]</sup>, 但仅做一般描述, 本文

报道较深入一步的研究结果。

### 材料与方法

1. 病毒: 病毒由农业部动物检疫所等单位从进口的 125 号奶牛鼻腔中分离出来的 IBR<sub>125-BK</sub> 毒株, 并适应于牛肾原代细胞, 滴度稳定在  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/0.1ml。

2. 细胞: 培养 IBR 病毒所用的细胞为犊牛肾原代细胞与次代细胞。原代细胞培养在含 10% 犊牛血清与 10% MEM 液的乳汉液中, pH 为 6.8—7.0。次代细胞培养在含 10% 犊牛血清与 40% MEM 液的乳汉液中, pH 为 7.2。接毒后的细胞维持液是只含有 3% 犊牛血清的乳汉液, pH 为 7.2—7.4。

3. 病毒的浓缩、提纯与负染色: 将病毒接种于长成良好单层的犊牛肾细胞上, 待细胞病变达

本文于 1981 年 11 月 26 日收到。

90% 以上时,将培养瓶放入  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱冻结,然后取出置室温融化,如此反复冻融 2 次后,将悬液于 3500 转/分离心 15 分钟,再经孔径为 450nm 的微孔滤膜过滤后,于 140,000g 离心 60 分钟,将沉淀悬浮于少量 Hank's 液中,再经低速离心,取上清病毒悬液滴在敷有 Formvar 膜的载网上,并用 2% 的磷钨酸 (pH7) 进行负染色。

4. 超薄制片法: 当细胞病变达 50—70% 时,先后用戊二醛 (1.25%) 和锇酸 (1%) 的 Hank's 液固定,经丙酮脱水,双氧树脂 "618" 包埋,切片指示厚度为 500—600 Å,最后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,负染样品和超薄切片样品均于 JEM-6C、Philips EM-400 电子显微镜下进行观察。

## 结 果

### (一) 病毒的形态

在多数细胞的细胞质空泡中和细胞外空间,常常可以观察到大量成熟的病毒粒子。成熟的 IBR 病毒呈圆形或卵圆形,直径 160—230nm,在超薄切片的样品和负染的样品中,可以看出病毒粒子均由核心、衣壳和囊膜三部分组成 (图版 I-1-2)。

病毒的核心: 核心直径 50—60nm,由电子致密的近似圆形的区域间杂着少量的电子透明区所组成 (图版 I-2),这可能是由于核蛋白盘绕折叠的结果。核心并不象鸭瘟病毒、伪狂犬病毒那样充满整个衣壳,而更类似于单纯疱疹病毒,核心与衣壳之间,存在着 20—30nm 的电子透明区,在切片样品中尤为明显。在负染的样品中,由于核心包裹在衣壳中,因而仅仅能勾勒出整个核壳体的轮廓。

衣壳: 衣壳的直径为 100—110nm,但由于观察的角度不同,衣壳的形态有所不同 (图版 I-1)。最常见的形态是呈六角形 (三重对称)。每个边长约为 55nm,由间距为 7nm 并规则排列的 5 个衣粒组成 (图版 I-1 箭号),衣粒呈棱柱状,高约 13nm,

直径 10nm,中心有一直径为 3—4nm 的电子致密区。从纵向看去,衣粒也是多边形的,可以看出有的呈五边形 (图版 I-1 左上)。有时,可以观察到二重对称的衣壳 (图版 I-1),甚至还可以辨认出在衣壳表面,由衣粒组成的三角形小平面。

在切片样品中,衣壳常常呈六角形或不大规则的圆形 (图版 I-2)。

囊膜: 不同的病毒粒子,其囊膜的形状、大小及其完整程度各不相同,但切片样品比负染样品囊膜的形态规则一些,囊膜的外径为 160—230nm,其厚度从 10nm 到 15nm 不等,有时可以清楚地看到囊膜小体 (图版 I-2)。

在囊膜与衣壳之间由二个明显的区域: 厚度较均一的电子透明区和厚度不一的电子致密区所组成 (图版 I-1、2)。电子透明区在切片和负染样品中都很清楚,只是在负染样品中这个区域被磷钨酸所浸透,显得不透明。此外,在负染的样品中,电子致密区很容易分辨,但在切片样品中,这一区域难以与囊膜区分。

### (二) 病毒的发育过程

在 70% 以上的宿主细胞内,均可以观察到处于不同发育阶段的病毒粒子。病毒是从核内开始发育的 (图版 I-3),可以见到与病毒形态发生密切相关的毒浆结构和各种形态的核壳体,核壳体的形态与我们在鸭瘟病毒等疱疹病毒中所观察到的类似<sup>[3]</sup>,包括空心衣壳,内壁附有颗粒状结构的核壳体,同心圆状的核壳体和具有电子致密核心的核壳体,同样也是后者为数最少,这些可能就是处于不同装配阶段的核壳体,有的也可能是装配的“副产品”,所不同的是第二种核壳体的内壁仅仅附有 4 个颗粒状结构,因而核壳体内部呈十字形的电子透明区。

装配好的核壳体穿过核膜,披上一层

囊膜而发育成成熟的病毒粒子。在我们的样品中,同时也观察到另一条获得囊膜的途径:即细胞质内的核壳体在向细胞质空泡出芽的过程中获得囊膜(图版 I-4)。这一过程包括:核壳体与空泡膜接触,接触处膜局部增厚;空泡膜内陷,整个空泡呈弯月状,最后形成成熟病毒释放到细胞质空泡中,而在细胞质空泡外,从未观察到游离的有囊膜的病毒。病毒的释放可能是通过一条与空泡和细胞质膜相沟通的特殊通道(图版 II 上图)。我们多次观察到细胞质内含有病毒粒子的不规则的管道,也观察到某些管道与细胞质膜相通,但在超薄片上难以显示通道的构型与整个释放过程。

在 IBR 病毒发育中,一个很有趣的现象是在细胞质内可观察到核壳体(图版 I-4 左图)。这类核壳体与核内的核壳体大小、形态基本一致,但种类较少,仅有空心的和具有致密核心的核壳体,形态比较趋于一致,在分布上比较集中,而且是在其周围电子致密的基质中,还可以看到处于不同装配阶段的核壳体,它们可能与核内核壳体有不同的装配途径,然而从未见到核内核壳体向细胞质中转移的过程。

在 IBR 病毒的核壳体中,有一种内部电子透明度极高的核壳体(图版 I-4)。它既区别于空心的衣壳,又不同于其它几种核壳体,这在其它疱疹病毒中未曾观察到,也未曾见到有关报道。这种核壳体存在于细胞核中,而更多地见于细胞质中。目前尚不清楚是由于样品制备过程所造成的,还是确实存在这种核壳体。

### (三) 宿主细胞的超微病变

随着 IBR 病毒的感染,宿主细胞也发生相应的变化(图版 I-3, 图版 II),例如染色质趋边化;核内毒浆结构的出现;细胞质空泡化;膜的增生与融合;线粒体也出现浓

缩、肿胀等变化。但核膜变化不明显而且有的线粒体在感染晚期尚保持精细结构。

细胞质中大量微丝结构的出现是宿主细胞病变的显著变化(图版 II)。有些微丝走向与细胞膜平行,而有些则与细胞膜垂直。微丝在细胞质内分散分布,有的微丝与线粒体外膜或核膜相连,甚至穿过核膜外膜而与核膜内膜相连;有的微丝与细胞膜相连并穿过胞膜伸向胞膜表面,而使膜的界线模糊不清,在这类膜表面,常常存在大量成熟病毒粒子,有的还直接与微丝连接,说明微丝结构与病毒释放有密切关系。

## 讨 论

我们所观察的该株 IBR 病毒近似球形,大小为 160—230nm,这与 Bindrich 等人报道的 150nm—225nm<sup>[1]</sup> 和 Knoke 等报道的 130—180nm<sup>[2]</sup> 基本一致。衣壳的直径为 100—110nm,这与 Watoach 等报道的 108.5nm<sup>[3]</sup> 和 Armstrong 等报道的 115nm<sup>[4]</sup> 大体相同。根据所观察到的二重对称、三重对称等形态的衣壳,可以推测病毒衣壳为正二十面体,并从公式  $10 \cdot (n-1)^2 + 2$  可以算出衣粒的总数为 162 个<sup>[5]</sup>。这与 Watoach 等报道的“衣壳由 162 个衣粒组成,按 5:3:2 对称方式排列”<sup>[3]</sup> 相符。除了病毒的大小、形态外,病毒的发育过程,细胞核内及细胞质中核壳体的形态特征,病毒成熟途径和释放方式等也都与有关 IBR 病毒的报道基本相似<sup>[4,6-8]</sup>,这又为该株病毒的鉴定,进一步提供了证据。

同许多疱疹病毒一样,IBR 病毒感染的细胞质中,常常可以观察到已装配好的核壳体,同时也存在一条病毒在细胞质内成熟的途径<sup>[6]</sup>。有人在研究豚鼠疱疹病毒时<sup>[10]</sup>,推测它们可能来源于破损的细胞核,这种推测难以解释 IBR 病毒细胞质内核

壳体的来源。首先,我们从未观察到这种转移过程;其次,据 Zee 等的报道<sup>[8]</sup>,在 IBR 病毒感染 4 小时时,首先观察到核内的核壳体,但紧接着在感染 6 小时后,细胞质内也出现了核壳体,在感染早期,核膜结构完整,核壳体由胞核向胞质转移的过程中不可能不披上囊膜。再从细胞质中核壳体的形态特征,特别是细胞质电子致密的基质中处于不同装配阶段的核壳体来看,我们在鸭瘟病毒中(一种疱疹病毒)已证实有一条细胞质内的发生途径<sup>[11]</sup>,那末在 IBR 病毒中是否也同样存在着这样一条途径呢?这是个很有意义的问题。

病毒常常诱导宿主细胞产生微丝结构,但 IBR 病毒诱导产生的微丝数量之多尤为突出,微丝的一端不仅与核膜、线粒体等相连,有的还与细胞膜相连甚至伸到细胞膜外,在其周围常常可以见到大量的成

熟病毒。IBR 病毒诱导微丝结构产生机制及其生理功能尚待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Bindrich, H.: *Arch. Exp. Vet. Med.*, 14: 656—675, 1960.
- [2] Knoeke, K. W. et al.: *Zbl. Bact. I(orig)*, 181: 429—439, 1961.
- [3] Watrach, A. M. et al.: *Arch. Ges. Virusforsch.*, 18: 1—7, 1966.
- [4] Armstrong, J. A. et al.: *Virology*, 14: 276—285, 1961.
- [5] Horne, R. W. et al.: *Virology*, 15: 348—373, 1961.
- [6] Gratzek, J. B. et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 27: 1573—1582, 1966.
- [7] Jasty, V. et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 32: 1945—1953, 1971.
- [8] Zee, Y. C. et al.: *J. Gen. Virol.*, 17: 333—336, 1972.
- [9] 丁明孝、翟中和: 病毒学集刊, 2: 43—51, 1982.
- [10] Fong, C. K. Y. et al.: *Virology*, 52: 468—477, 1973.
- [11] 翟中和、丁明孝: 中国科学, 2: 121—129, 1982.

## STUDIES ON FINE STRUCTURE AND MORPHOGENESIS OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS VIRUS

Zhai Zhonghe Ding Mingxiao

(Department of Biology, Peking University, Beijing)

Li Hanqiu

(Research Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Peking Academy of Agricultural Science, Beijing)

Yang Huifen Li Changlin Feng Oimin

Zhang Ruizhen Yang Bingqing

(Institute of Animal Quarantine, Ministry of Agriculture)

The ultrastructure and morphogenesis of infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) growing in bovine kidney culture cells were studied with electron microscope. The strain of IBRV studied was isolated from an imported cow and its morphology and morphogenesis has not been studied in China before that.

The virion was typically spherical in shape 160—230 nm in diameter. Its nucleocapsid was made up of a core 50—60 nm and a capsid 100—110 nm in diameter. The capsomeres with hollow prisms  $13 \times 10$  nm in diameter can be seen in negatively stained preparations.

The morphogenesis of IBRV was simi-

lar to other herpesviruses. Probably IBRV virus.  
has a cytoplasmic assembly like duck plague

## 图 版 说 明

### 图 版 I

1. 纯化的 IBRV 负染色电镜图片。病毒囊膜、核壳体及衣粒的结构清晰可见。衣粒长约 13nm, 直径约 10nm, 中心有一直径为 3—4nm 的电子致密区。常常可以观察到病毒核壳体呈三重对称(箭头)或二重对称(左上图  $\times 194,000$ ), ( $\times 170,000$ )。
2. IBRV 超薄切片的电镜图片。病毒大小为 160—230nm, 层次分明。它由直径为 50—60nm 的核心, 直径为 100—110nm 的衣壳和囊膜组成。囊膜与衣壳之间有一层电子透明区和一层电子致密区( $\times 96,000$ )。  
左上图为 IBRV 的放大图片( $\times 187,000$ )。
3. IBRV 感染 24 小时的宿主细胞。在细胞核内, 可见到病毒的毒浆结构 (VP) 以及处于不同发育阶段的病毒核壳体( $\times 30,000$ )。
4. 左: 在 IBRV 感染的宿主细胞的细胞质中, 常常可以见到具有不同形态的核壳体大量聚集在一起( $\times 45,000$ )。右: 图中 1—4 表示细胞质内核壳体成熟过程的各阶段: 它们在向细胞质空泡中出芽的过程中, 获得囊膜发育成为成熟的病毒。一种内部电子透明的核壳体, 有时也以同样的方式获得囊膜(箭头)( $\times 34,000$ )。

### 图 版 II

大量病毒向细胞外释放。此时在细胞质中, 可观察到很多微丝结构。有些微丝伸到质膜外, 甚至与病毒相连。有时还可以见到一些含有成熟病毒的特殊通道(上图)( $\times 39,000$ )。

### Plate I

1. Negatively stained specimen showing that the envelope, nucleocapsid and capsomeres of purified IBRV can be seen clearly. The capsomer is about 13nm long and 10nm in diameter. There is a electron dense area measuring 3—4nm of diameter in the center of the capsomer. Usually the nucleocapsids can be observed on threefold (arrow) or twofold (inset  $\times 194,000$ ) axes of rotational symmetry.
2. Sectioning micrograph. The intact virus has a diameter of 160—230nm. It is made up of viral core measuring 50—60nm in diameter, nucleocapsid measuring 100—110nm in diameter and envelope. There are electron transparent layer and an electron dense one between the envelope and the nucleocapsid.  
Inset: A virus at higher magnification.
3. In the cells at 24 hrs after infection with IBRV there are viroplasts (VP) and a lot of nucleocapsids at different stages of development in the nucleus (N).
4. left: A large amount of variform nucleocapsids frequently gathered in the cytoplasm of host cell infected with IBRV. right: The maturation of virus in cytoplasm: stages 1, 2, 3 and 4 show the processes that the nucleocapsids are budding through the vesicular membranes and then become mature viruses in vesicles. A nucleocapsid with electron transparent inside can also acquire its envelope in the same manner (arrow).

### Plate II

Viruses are released from the host cell. Lots of microfilaments can be observed in cytoplasm. Some of them reached out of the plasmic membrane and even connected with the released viruses. Sometimes specific channels containing mature viruses can also be seen (inset).