

单纯疱疹病毒形态发育的多样化方式

II. 单纯疱疹病毒的囊裹发育

楚雍烈* 洪涛

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

对单纯疱疹病毒(HSV)在八种感染系统中的囊裹发育方式通过电镜观察进行了比较。就 HSV 在多种不同感染系统中共同存在的囊裹发育现象进行了描述, 对其发育方式作了归纳和总结。发现 HSV 感染细胞中出现的均质致密体形态学改变与 HSV 的形态发育关系密切。提出了 HSV 囊裹发育过程中可能具备方式多样、位置广泛有利于快速发育为原则等特点。并对 HSV 囊裹发育方式多样化的物质基础进行了初步讨论。

单纯疱疹病毒(HSV)的形态发育包括两个阶段: (1) 病毒核壳体的装配, (2) 囊裹发育(Envelopment): 即核壳体获得囊膜发育为成熟病毒颗粒的过程。到目前为止, 在 HSV 囊裹发育的位置和方式上仍有许多不同意见^[1,2]。我们观察到 HSV 可能具有两种形态发生方式^[3], 同时也注意到其囊裹发育方式也并非单一。近些年来, 对疱疹病毒的研究日渐增多, 有必要深入了解 HSV 形态发育这一基础问题。本实验旨在通过对 HSV 多种感染系统的比较观察, 找出 HSV 囊裹发育的固有特点和规律性的共同表现。

材料和方法

(一) 病毒

1. HSV-1 13 株¹⁾、mP¹⁾ 株, 实验室传代株。在原代乳兔肾(BRK)和 HeLa 细胞上传代适应、培养, 当 50% 单层细胞产生病变(CPE⁺⁺)时收获, 快速冻融三次, 病毒液贮于 -40℃ 冰箱。滴度: 13 株为 10^{6.3} TCID₅₀, mP 株为 10^{4.0} TCID₅₀。

2. HSV-1 T₁ 株²⁾滴度为 10^{6.3} TCID₅₀, 树 75 株³⁾滴度为 10^{7.0} TCID₅₀。均系患者病损处分离的

野毒株。病毒液制备、保存方法同上。

(二) 细胞

1. BRK 细胞: 按原代细胞制备常规操作^[3], 细胞长成良好单层时备用。

2. HeLa、Hep-2、Vero 传代细胞株: HeLa 细胞为本室传代株, Hep-2、Vero 由 Roizman (美)教授提供。三种细胞均常规培养传代^[3], 细胞长成单层备用。

(三) 病毒感染细胞

1. 八种感染系统(表 1), 其中含有三种比较内容: (1) 同一毒株感染不同细胞之间, (2) 多种毒株感染同一细胞之间, (3) 不同毒株感染不同细胞之间。通过比较以便找出 HSV 形态发育的规律性表现。

2. 感染过程: 在各感染系统中, 均以 10,000 TCID₅₀ 病毒量进行接种, 37℃ 吸附一小时后, 用 Hank's 液洗三次, 加 Eagle 维持液 37℃ 常规孵育^[3], 逐日观察病变。感染后 4—8 小时, 光学镜下看不到 CPE; 感染后 24 小时, 约 50% 细胞呈现 CPE; 感染后 48—72 小时, 整个单层细胞均有 CPE。各感染系统均设正常细胞对照。

本文于 1981 年 11 月 1 日收到。

* 现在西安医学院病毒研究室。

¹⁾ 由美国芝加哥大学 Roizman 教授赠送。

²⁾ 由本所肿瘤室提供。

³⁾ 由北京市眼科研究所提供。

表 1 HSV 感染细胞系统

Table 1 Different cell systems infected with HSV-1

病毒 Virus	细胞 Cell	BRK	HeLa	Hep-2	Vero
13 株 Strain 13		+	+	+	+
mp		+	+		
T ₃		+			
75 Shu75		+			

+ 示感染该细胞株

Showing the cell system infected with HSV-1

(四) 电镜标本制备

各感染系统的样品均按常规处理^[4], 与前文的操作程序相同^[5]。电镜标本在 JEM-100B、H-600 电镜下观察照相。

结 果

对各感染系统的不同阶段标本作了反复观察, HSV 感染细胞的核内、胞质中均有裸体核壳体的存在, 它们囊裹发育的方式在各系统中虽有表现程度上的差异, 但下述几点是共同存在的。

(一) 细胞核内核壳体的囊裹发育

细胞核内装配的核壳体在核膜内层以出芽方式获得囊膜, 它们经过: (1) 贴近: 核壳体靠近核膜内层后, 核膜内层局部厚度增加, 结构模糊, 电子密度较高, 并出现弧形凹面。(2) 囊裹: 随核壳体外凸, 改变了的核膜内层由弧形、新月形逐渐形成带蒂的囊状结构。(3) 脱落: 整个核壳体被包裹后, 就游离于核周间隙, 成为有囊膜的病毒颗粒 (图版 I-1)。有时, 核内可见到核壳体在核膜凹进核内的内层核膜上出芽发育 (图版 I-2)。

(二) 细胞质内核壳体的囊裹发育

细胞质内核壳体获得囊膜的方式有: (1) 在胞质空泡壁上向空泡内出芽发育 (图版 I-3), (2) 在粗面内质网壁上出芽发育 (图

版 I-4), 这两种出芽发育过程和核膜内层出芽过程相似。(3) 其他少见现象, 在近核膜的胞质区, 核壳体为小管状的膜性结构包裹。

(三) 与 HSV 形态发育有关的均质致密体

在 HSV 感染的细胞中, 常见到一些特殊的形态结构: 均质致密体 (DB)。它们的电子密度高, 质地均匀, 为直径约 200—500nm 不等的椭圆形球体。在 HSV 感染细胞的许多地方均可呈现, 核周间隙和胞质空泡中的 DB 似有一光滑界膜 (图版 I-5—7)。

值得注意的是, 胞质空泡中的 DB 内部有以下形态学改变: (1) 核心样结构的形成: DB 中心部形成直径约 50nm 左右的致密斑点, 有的可同时含 2—3 个不等。其大小、形状和电子密度与病毒核心相似 (图版 I-7); (2) 病毒核壳体的形成: DB 内的核样物周围出现六边形的核壳, 形成典型的 HSV 核壳体 (图版 I-7), (3) 当 DB 内出现 1—2 个核壳体后, 周围透亮带加宽, 形成具较厚囊膜的病毒颗粒。有必要指出, 在细胞间隙中, 亦可见到 DB 的上述各种形态 (图版 I-8)。

讨 论

(一) HSV 囊裹发育的方式和特点

一般认为, HSV 的核壳体主要在核膜内层出芽获得囊膜^[6-8], 对于核壳体能否在别的部位, 以其他方式获得囊膜尚有争论。虽然一些学者提到过其他方式^[9-12], 但由于多只采用单一感染系统, 所以一般仅从形态学上给予描述而没有满意的解释, 有人认为可能和实验所用病毒株及细胞种类的不同有关^[13]。本实验采用多种病毒株和细胞株组成的不同感染系统, 结果显示 HSV 有其固有的囊裹发育方式, 在

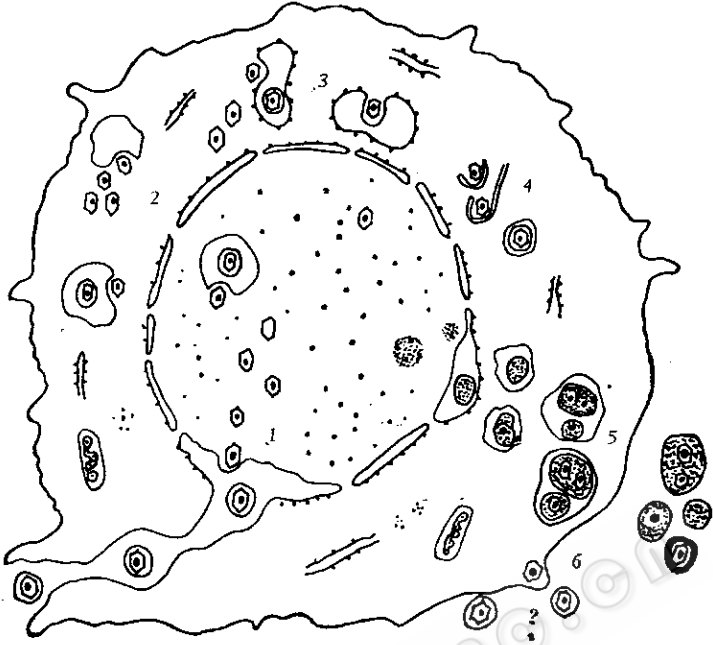


图1 单纯疱疹病毒囊裹发育的各种现象

Fig. 1 Envelopment of herpes simplex virus

- | | |
|------------|--|
| 1. 核膜内层出芽 | Budding through inner nuclear membrane |
| 2. 胞质空泡出芽 | Budding in situ of cytoplasmic vacuoles |
| 3. 内质网膜出芽 | Budding within rER |
| 4. 小管样结构包裹 | Envelopment through tiny tubular structure |
| 5. 致密球体内发育 | Envelopment within the dense bodies |
| 6. 细胞膜处出芽 | Budding through cytoplasmic membrane |

各感染系统中普遍存在(图1)。

图1中 HSV 囊裹发育的方式可归纳如下:

1. 出芽发育: 按其出芽发育的位置可分为(1)核膜内层,包括本实验所见到的在凹向核内的内层核膜上出芽发育。(2)细胞质空泡壁上,(3)粗面内质网,(4)其他细胞膜系统上,所谓“小管状膜性包绕”现象。由于它们出现在细胞核附近,依其形态表现可能有两种可能,一是 HSV 感染后的核膜呈现增殖状态^[1],增生的核膜延伸突入胞质,胞质中的核壳体在上边发育;另一是与其他学者所描述的现象类似^[10,13]即高尔基氏体扁平囊包绕核壳体。无论是哪种可能,二者都是细胞的膜性结构。我

们认为这种“包绕”,实际上是 HSV 核壳体在细胞膜系统上出芽发育。

2. 其他可能方式:(1)均质致密体可能与 HSV 发育有关。本实验发现 DB 可在 HSV 感染细胞中多处呈现,分布在核内、核周间隙、细胞质空泡和细胞间隙中,而且它们的内部形态变化与 HSV 形态发育关系又非常密切。曾有学者提到过感染细胞中有 DB 出现^[14,15],Nii 还指出 DB 可在核膜内层出芽并具有 HSV 的抗原性^[14]。但他们没发现 DB 与 HSV 形态发育的关系,也未就其作用进行讨论。我们依据大量观察的结果,并考虑到 HSV 颗粒多形性的特点,认为 DB 有可能与 HSV 厚囊膜型毒粒的发育有关,此发育方

式值得进一步研究。(2) 细胞膜出芽方式^[9,10]。本实验虽常看到细胞膜附近有许多已具囊膜的病毒,但并未观察到 HSV 核壳体从细胞膜向外发育的典型形态。现已证实 HSV 感染细胞膜上含有 HSV 膜抗原成份^[16],所以这种方式虽然可能存在,但不会是主要方式。

综上所述,HSV 核壳体囊裹发育可能具有以下特点: 1. 方式多样、位置广泛。2. 以出芽发育为主,并和宿主细胞的膜系统关系密切。3. 不同位置的核壳体在其邻近的膜系统上获得囊膜,似以有利于发育为原则。4. HSV 似有其固有的一些囊裹发育方式,在不同感染系统中虽有表现程度上的差别,但无本质上的不同。需要指出的是,这些特点不但显示出 HSV 形态发育的复杂性,而且有利于它进行快速、大量的繁殖。

(二) HSV 囊裹发育的基础

囊膜是 HSV 成熟病毒不可缺少的组成部分,它与 HSV 的感染性、抗原性和稳定性直接有关^[6],囊膜的获得在 HSV 形态发育过程中亦占有重要位置。HSV 的囊膜属生物膜,由病毒特异的糖蛋白和宿主细胞膜成份共同构成^[2,16]。HSV 感染细胞后,细胞的大分子合成被抑制,但脂类合成仍在进行^[2],它和此时大量合成的病毒糖蛋白都结合到细胞膜系统上,结果(1)宿主细胞膜系统增殖,(2)由于掺入了病毒抗原成份膜系统被改造。这就是 HSV 核壳体能在多处发育、与细胞的膜性系统关系密切的物质基础。显然,由于增殖和被改造的缘故,膜性结构的表面积大大增加,这对 HSV 核壳体快速、大量的发育极为有利。

本文所观察到的 HSV 囊裹发育的多种方式和前文报道的 HSV 同时具有核内、胞质内两种形态发生方式^[5]一起显示出 HSV 形态发育方式的多样化特点。这一问题的深入研究,将对揭示 HSV 的本质,加深了解 HSV 的致病、致癌机理,对于 HSV 和细胞相互作用的研究都具有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Watson, D. H.: *The Herpesviruses* (ed. by Kaplan, A. S.), Academic Press, New York, 1973, pp. 133—216.
- [2] Roizman, B. and D. Furlong: *Comprehensive Virology* (ed. by Freankel-conrat, H. et al.), Vol. 3, Plenum Press, New York, 1974, pp. 229—382.
- [3] 中国医学科学院流行病学研究所:《常见病毒病检验技术》,第一版,科学出版社,北京,1978,第66—75页。
- [4] 洪涛主编:《生物医学超微结构与电镜技术》,第一版,科学出版社,北京,1980,第103—211页。
- [5] 洪涛等:《微生物学报》,22(2): 175, 1982.
- [6] Morgan, C. et al.: *J. Exp. Med.*, 110: 643—656, 1959.
- [7] Nii, S. et al.: *J. Virol.*, 2: 517—536, 1968.
- [8] Dailington, R. W. et al.: *J. Virol.*, 2: 43—55, 1968.
- [9] Epstein, M. A.: *J. Cell Biol.* 12: 589—597, 1962.
- [10] Siminoff, P. et al.: *Exp. Cell Res.*, 44: 241—255, 1966.
- [11] Schwartz, J. et al.: *J. Virol.*, 4: 879—889, 1969.
- [12] Smith, J. D. et al.: *J. Virol.*, 26: 102—109, 1978.
- [13] Nii, S.: *Biken. J.*, 14: 325—348, 1971.
- [14] Nii, S. et al.: *Biken. J.*, 19: 53—61, 1976.
- [15] Atkinson, M. A. et al.: *J. Gen. Virol.*, 40: 103—119, 1978.
- [16] Blough, H. A. et al.: *Cell Membranes and Viral Envelopes* (ed. by Blough, H. A.), Vol. 2, Academic Press, London, 1980, pp. 709—745.

MULTIPLE MODE OF MORPHOGENESIS OF HERPES SIMPLEX VIRUS

II. ENVELOPMENT OF HERPES SIMPLEX VIRUS

Chu Yonglie* Hung Tao

(Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

The envelopment of HSV in several cell systems has been studied by electron microscopy. The same mode of envelopment was observed in different cell systems. It is principally budding through cellular membrane systems, such as inner nuclear membrane, the membrane of rER and the membrane of the cytoplasmic vacuoles, etc. The characters of the envelopment of HSV, such as multiple mode of envelopment. enveloping of HSV nucleocapsid in different place on neighboring membrane system were descri-

bed.

Some homogeneous dense bodies (DB) were found in the nucleus, in the perinuclear space, in the cytoplasmic vacuoles and intercellular space of infected cells. Their morphologic changes may be related to morphogenesis of HSV.

A multiple mode of envelopment of HSV which favours the rapid replication of the virus, and the material basis of the envelopment of HSV were also discussed.

*Xian Medical College, Xian.