

单纯疱疹病毒 II 型紫外线照射后的生物学特性

赏诗樟

(湖北医学院细胞生物学研究室, 武汉)

单纯疱疹病毒 II 型吴株 (HSV-2W) 经圆盘式紫外灯(平均剂量 39.9 尔格/mm²/秒)照射 2 分钟, 接种感染原代兔肾单层细胞, 其 TCID₅₀ 和 PFU 值, 分别由照射前的 10^{-3.3}/0.1ml 和 1.6 × 10⁵/ml 变为 10^{-4.7}/0.1 ml 和 3.0 × 10⁵/ml, 其 CPE 也由照射前的“重度”或“中度”减为“轻度”, 但仍有多核巨细胞形成。电镜下感染细胞内见有少量线粒体肿胀变性和内质网扩张等改变, 在细胞间隙内和细胞质的变性细胞器之间和溶酶体内, 均有少量完整的病毒颗粒, 而胞核内均未见子代核壳体的形成。照射 4 分钟, 则测不出 TCID₅₀, 也不形成空斑, 而感染后的大白鼠胚肺细胞尚可继续传代, 电镜下所见病毒颗粒同前, 但细胞器的损伤均不严重, 且微丝含量明显增加。照射后 6 分钟已见不到 CPE, 细胞质内也未见到病毒颗粒, 但免疫酶标记法证实仍存在少量的病毒特异性抗原。由此说明, HSV-2W 的 PFU 值为 10⁵/ml 时, 经上述剂量紫外线照射 4—6 分钟, 可使该培养细胞的增殖性感染转变为非增殖性感染。

近来, 单纯疱疹病毒 II 型 (HSV-2) 与宫颈癌的病因学关系, 已引起国内外的重视^[1-6], 它可引起体外培养细胞恶性转化和动物癌症^[1-4, 7-11]。为了减少该病毒增殖性感染所引起的细胞死亡, 有助于感染细胞的转化, 国外采用紫外线照射灭活法^[1, 7, 8, 10-12]。但对紫外线照射后该病毒生物学特性的改变, 则报道很少, 而照射后该病毒的增殖和感染细胞超微结构的电镜观察, 尚未见报道。为此对我国 HSV-2 吴株进行了紫外线照射, 观察照射后该病毒的某些生物学特性的改变, 以便为细胞转化研究提供依据。

材料和方法

(一) 细胞和培养液

常规制备原代兔肾 (PRK) 单层细胞, 使用 199 培养液, 内含小牛血清 10%、青霉素 100 单位/ml 和链霉素 100 μg/ml。

(二) 病毒

1. 毒株: HSV-2 吴株 (HSV-2W) 系由武汉大学病毒系分离, 本院病毒室鉴定。病毒先经 PRK 细胞传代两次, 在 10⁻² 稀释度时的 TCID₅₀ 值

为 10^{-4.7}/0.1 ml, 其 PFU 值为 3.6 × 10⁶/ml (甲基纤维素法), 以此作为病毒储存液, 存于 -40℃ 备用。

2. 紫外线照射: 取 8 个直径 90 mm 的平皿, 分别加入上述病毒悬液 10 ml, 其厚度约 0.2 cm。除一个平皿作对照外, 其余均置特制的圆盘式紫外灯下 54.5 cm 处, 平均剂量 39.9 尔格/mm²/秒, 照射时间分别为 2、4、6、8、10、12 和 14 分钟。

(三) 病毒感染性和生物学特性的观察

1. TCID₅₀ 测定: 按 Hsiung^[13] 所述常规方法, 用稀释度为 10⁻²—10⁻⁴ 的 HSV-2W 感染 PRK 单层细胞, 观察活体细胞病变。

2. PFU 测定: 将上述病毒悬液接种 PRK 单层细胞(感染比例近于 1 PFU/细胞), 用浓缩两倍的 199 培养液等量稀释的 1% 甲基纤维素溶液, 代替琼脂-中性红作覆盖层, 其它均按 Hsiung^[13]

本文于 1981 年 10 月 16 日收到。

本工作承陈敏海教授指导, 特此致谢。

作者现调浙江省杭州市浙江人民卫生实验院。

TCID₅₀ tissue culture infecting dose₅₀ 半数组织培养感染量

PFU plaque forming unit 形成空斑单位

CPE cytopathic effect 细胞病变效应

方法操作。培养瓶以纯甲醇固定,1%结晶紫染色,显微镜下计空斑数,按 Dulbecco^[14] 方法计算 PFU 值。

3. 半薄片感染细胞病变的观察:使用正常细胞组、对照病毒组、照射 2 分钟组、照射 4 分钟组和照射 6 分钟组的电镜取材标本,经 LKB 超薄切片机制成半超薄切片,厚度 0.5 μ m, H-E 染色,显微镜观察。

4. 感染细胞病毒特异性抗原的检查:正常细胞组、对照病毒组、照射 2、4 和 6 分钟组细胞培养两周后,收集细胞,用 pH 7.4、0.01 M 的磷酸盐缓冲液离心洗涤 3 次,将沉淀细胞制成悬液和干燥涂片,按免疫酶标记(间接)法^[15]处理,第一血清为兔抗人 HSV-2W 抗体,第二血清为羊抗兔 HSV-2W 抗体辣根过氧化物酶标记结合物,其稀释度为 1:5,底物为盐酸联苯胺和亚硝基铁氰化钠,显微镜观察。

其它对照组:①对照 I 组:不加反应底物。②对照 II 组:不加 HSV-2W 抗体酶标记结合物。③对照 III 组:改用 HSV-1 和 HSV-2W 均为阴性的同种抗血清。④对照 IV 组:使用 HSV-2W 抗体酶标记物前,增用大量未标记的同种 HSV-2W 抗血清作阻断予处理。⑤对照 V 组:用 HSV-1 (单纯疱疹病毒 I 型)同种抗血清标记物代替 HSV-2W 抗血清标记物。⑥对照 VI 组:使用大量感染 HSV-2W 的新鲜 PRK 细胞。

5. 感染细胞传代生长的观察:将上述病毒悬液(除照射 12 分钟组和照射 14 分钟组外)与 199 培养液等量稀释,接种原代大白鼠胚肺单层细胞,间隔 4—6 天常规胰酶法传代,显微镜观察。

6. 电镜观察:取材分组原则同上,并增加紫外线照射 1 分钟病毒感染细胞组(照射 1 分钟组)。接种病毒方法与 TCID₅₀ 测定的相同,接种后先将全部培养瓶同时置 4℃ 冰箱内,使病毒吸附 1 小时,再转入 37℃ 温箱培育。培育第 12、24、48 和 72 小时按常规方法^[14]取材,用戊二醛和锇酸双重固定,环氧树脂 618 包埋,LKB-5 型超薄切片机制片,醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色,国产 DXB-2 型透射电镜观察。

结 果

(一) TCID₅₀ 测定和细胞病变(CPE)

活体观察

1. 正常细胞组:未见病毒所致的 CPE,自发变性的细胞出现很少(图版 I-1)。

2. 对照病毒组:接种后第 1 天出现少量病变细胞,第 3 天更明显,平均每视野内病变细胞数量约占单层细胞总数的 1/2—3/4 (+ + + +)。病变主要表现为细胞肿胀增大,变圆,常含有空泡,细胞互相聚集,典型者可聚集成葡萄状外观(图版 I-2)。

对照(未经紫外线照射) HSV-2W 的 TCID₅₀ 值为 10^{-3.3}/0.1 ml (注:因病毒悬液系储存后使用,致使效价比初始试验时降低)。

3. 照射 2 分钟组:所见 CPE 同前,但病变出现比前组缓慢,程度减轻,第 3 天病变细胞数量减为单层细胞总数的 1/4 (+),此时 TCID₅₀ 为 10^{-2.3}/0.1 ml。

4. 照射 4 分钟组:在所有稀释度范围内已测不出 TCID₅₀,仅在未稀释的储存病毒悬液有个别病变细胞。

5. 照射 6 分钟组至照射 14 分钟组:均未见明显病变,细胞形态与正常细胞组相似。

(二) PFU 测定

1. 正常细胞组:未见空斑形成。单层细胞形态多数为多边形上皮样细胞,呈灶性分布,染色较浅,而成纤维样细胞则呈长梭形或不规则形,染色较深(图版 I-3)。

2. 对照病毒组:培养瓶壁散布很多大小不一的病变细胞脱落空斑区,其形态多呈椭圆或圆形,或不规则形,空斑内残存少量细胞碎片或个别细胞,空斑周围四壁聚有残存未脱壁的圆形病变细胞(图版 I-4)。

3. 瓶的空斑计数平均值为 331.3 个/瓶,用 Dulbecco 公式计算获得对照病毒组的 PFU 值为 1.6 × 10⁵/ml (注:病毒效价比初始试验时降低的原因同前)。

3. 照射 2 分钟组:空斑形态与上组相

似(图版 I-5)。空斑数量很少,平均空斑数为 6 个/瓶,相应的 PFU 值为 $3 \times 10^3/\text{ml}$ 。

4. 照射 4 分钟组至照射 14 分钟组: 均未见空斑,其细胞染色形态与正常细胞组相似。

(三) 半薄切片感染细胞病变观察

1. 正常细胞组: 细胞大多呈长梭形,未见肿胀、变形、聚集和巨细胞形成等细胞病变(图版 I-6)。

2. 对照病毒组: 除少数正常细胞外,较多细胞明显肿胀,变为圆形、椭圆形或长方形。胞核明显膨胀,核染色质在核膜下轻度“边集”,核膜增厚。有时胞质含有少量圆形小空泡,还有少数肿胀变性增大的多核巨细胞(图版 I-7)。

3. 照射 2 分钟组: 病变所见同上,但变性细胞数量减少。也有少数多核巨细胞(图版 I-8)。

4. 照射 4 分钟组: 多数细胞形态结构正常,肿胀变性细胞仍然存在,但数量比前两组更少。

5. 照射 6 分钟组: 细胞形态正常,未见明显病变。

(四) 感染细胞病毒特异性抗原检查

1. 正常细胞组、对照 I 组至对照 V 组: HSV-2W 抗原检查均呈阴性反应。

2. 对照 VI 组: 上述抗原检查呈明显阳性反应(++)。在阳性反应细胞质内,可见数量较多而大小不一的圆形颗粒,着蓝黑色,颗粒常有不同程度聚集,胞核呈阴性反应(图版 I-9)。

3. 对照病毒组、照射 2、4 和 6 分钟组: 各组感染细胞均呈上述抗原阳性反应,仅阳性颗粒和阳性细胞数量有些差异,如对照病毒组为“++”,其它 3 组均为“+”(图版 I-10)。

(五) 感染细胞传代生长的观察

对照病毒组因有明显病变,细胞脱失

严重,未能传代。照射 2 分钟组仅传代 2 次,后亦因出现明显病变而不能继续下传。其余各组(正常大鼠胚肺细胞组及照射 4 分钟组至照射 10 分钟组)传至 4 代,未见明显病变。

(六) 电镜观察

1. 正常细胞组: 未见明显病变。细胞内微丝含量很少,细胞表面有少量微绒毛。

2. 对照病毒组: 培育 12 小时和 48 小时的标本内,少量感染细胞肿胀变形,呈椭圆形或圆形,内含少量变性肿胀和退变的线粒体及扩张的内质网。随着感染时间的延长,病变渐趋加重。胞核肿胀变大成椭圆或圆形,核染色质在核膜下轻度“边集”。细胞间隙及胞质内可见少量完整的病毒颗粒。

感染病毒后培育 72 小时的细胞内,线粒体肿胀变性更为明显,多数内质网池呈不规则形扩张。有些细胞的核染色质分布尚均匀,有些则在核膜下轻度“边集”。胞核内有大量 HSV-2W 核壳体,在核周围间隙内可见已装配囊膜的病毒颗粒(图版 I-11),胞质和细胞间隙内也有完整的病毒颗粒(图版 I-12)。核壳体在胞核内多数分散于核浆中,偶尔见于核仁的基质成分之中(图版 I-13)。完整的核壳体由壳体蛋白质及其围绕的核酸蛋白核心所组成,也有少数无核心的核壳体。核心多为圆球形,电子密度较高,它的中央有时见有电子密度较低的蛋白成分(图版 I-11)。病毒囊膜的装配见于胞核内外接近核膜的区域,它是由核膜向核内和核外的褶皱所形成(图版 I-11、12)。这些结果与文献报道基本一致。

3. 感染紫外线照射的病毒各组

(1) CPE 观察: 在照射 1 分钟组,有些感染细胞呈明显变性,包括线粒体肿胀,嵴的溶解,内质网扩张等。照射 2 分钟组

和照射 4 分钟组,多数细胞的病变均不严重,除少数线粒体肿胀和内质网扩张外,其它细胞器及胞核均无明显病变(图版 I-14、15)。在照射 1 分钟组、2 分钟组(培育 12 小时)和 4 分钟组(培育 48 小时以上)感染细胞内,细胞膜下胞质区内的微丝含量明显增多(图版 I-16)。而照射 6 分钟组,则未见病变。

(2) 病毒颗粒:照射 1、2、4 分钟组的感染细胞胞质中,病毒颗粒数量均较少,这与对照病毒组相比,无明显差别。在照射 1 分钟组培育 12 小时的标本中,可见细胞间隙(图版 I-17)和胞质内有少量完整的病毒颗粒,后者散布于变性的线粒体和扩张的内质网之间,也见于溶酶体中(图版 I-18)。照射 2 分钟组感染细胞(培育 72 小时)的胞质中,也有完整的病毒颗粒(图版 I-19),但在胞核内则未见核壳体。照射 4 分钟组细胞的观察结果,与上述基本相同。而在照射 6 分钟组,则无论胞质或胞核内均未见病毒颗粒。

讨 论

一般认为^[1,6,7],HSV-2 感染细胞的 CPE,主要表现细胞肿胀变圆,胞核肿胀,染色质于核膜下积聚,使胞核呈“中空”状;胞核内出现包涵体;病变细胞可互相聚集,呈葡萄状典型病变,多通过细胞融合,形成巨大的多核巨细胞。本实验用 HSV-2W 感染 PRK 培养细胞的细胞病变结果,与上述基本相同。

HSV-2 在细胞内的增殖已有报道^[1]。我们仅在 HSV-2W 感染后 72 小时的超薄切片中,见到胞核内出现大量核壳体,而在胞质和细胞间隙中均未见到较多病毒颗粒,这种现象可能表示病毒指数性生长期的开始,表明这一生长期比已报道的长^[1],可能与使用的毒株不同,或与本试验接种

的病毒浓度较低(感染量近于 1 PFU/细胞)有关。据报道,若要在电镜下见到较多数量的病毒颗粒,病毒接种量以 1000/细胞为宜^[1]。HSV 感染后胞核的核仁可渐趋消失^[1],但本试验的结果表明,HSV-2W 感染细胞内的核仁有的并不消失,且在核仁的基质成分(无定形部)内可见到核壳体(图版 I-13),这是过去没有报道的,其意义尚难推测。另外,在紫外线照射不同时间后 HSV-2W 感染细胞切片中,均未见胞核内出现子代核壳体,仅在照射 1、2、4 分钟组,见到胞质内有少数完整的病毒颗粒,从培养时间(仅 12 小时)看,它们属于穿入后停留于胞质中的病毒颗粒,而非新形成的子代成熟病毒颗粒,表明在上述时间的照射,并不影响病毒的穿入,这与 Mayamoto 等^[16]所述相似。

HSV-2W 经紫外线(39.9 尔格/mm²/秒)照射 4—6 分钟感染 PRK 细胞,已不见明显 CPE 和空斑,胞核内又未见形成子代核壳体,表明病毒已不再增殖。但感染细胞内有少量病毒特异性抗原存在,微丝含量明显增多,感染大白鼠胚肺细胞能够继续传代,表明这一照射条件可使培养细胞的增殖性感染转变为非增殖性感染,可能有利于细胞体外转化研究。本试验照射时间与 Duff 等^[7]和 Rapp 等^[8]照射 6 分钟和 8 分钟或 10 分钟(42 或 46 尔格/mm²/秒)相比稍有差异,这可能与选用的毒株和照射剂量等不同有关。本实验选用的照射条件,能否提高 HSV-2W 对外培养细胞的恶性转化率和动物诱癌率,还有待于进一步实验作最后判断。

参 考 文 献

- [1] Kaplan, A. S.: *The Herpesviruses*, Acad. Press, New York and London, 1973, pp. 27—34, 94—161.
- [2] Rapp, F. and R. Duff: *Cancer Res.*, **33**:

- 1527—1534, 1973.
- [3] 陈敏海等: 中华肿瘤杂志, 2(4): 259—262, 1980。
- [4] 陈敏海等: 实验生物学报, 13(3): 273—276, 1980。
- [5] 向近敏: 湖北医学院学报, 2(1): 1—7, 1981。
- [6] 蒋文俊、陈敏海: 湖北医学院学报, 2(2, 增刊): 1—9, 1981。
- [7] Duff, R. and F. Rapp: *Nature*, 233: 48—50, 1971.
- [8] Rapp, F. and N. Turner: *Arch. Virol.*, 56 (1—2): 77—87, 1978.
- [9] Duff, R. and F. Rapp: *J. Virol.*, 15(3): 490—496, 1975.
- [10] Duff, R. and F. Rapp: *ibid.*, 8: 469—477, 1971.
- [11] Wentz, W. B. et al.: in "International Conference on Human Herpesviruses", The Woodruff Medical Center, Emory University, Atlanta, Georgia, 1980, pp. 90.
- [12] Ogino, T. and F. Rapp: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139: 783—786, 1972.
- [13] Hsiung, G. D.: *Diagnostic Virology* (An Illustrated Handbook), Revised and Enlarged Edition, New Haven and London, Yale University Press, 1973, pp. 21—25, 127—137.
- [14] Анджапаридзе, О. Г. и др.: Культура Ткани в Вирусологических Исследованиях, Мидиз Москва, 1962, стр. 173—195.
- [15] 刘知惠等: 湖北医学院学报, 1(3): 1—3, 1980。
- [16] 洪涛主编: 《生物医学超微结构与电子显微镜技术》, 科学出版社, 北京, 1980, 第111—152, 320—321, 337—376, 521—530页。
- [17] Kruse, P. F. and M. K. Patterson: *Tissue Culture: Methods and Applications*, Acad. Press, New York and London, 1973, pp 507—558, 653—658.
- [18] Miyamoto, K. and C. Morgan: *J. Virol.*, 8: 910—918, 1971.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF TYPE 2 HERPES SIMPLEX VIRUS IRRADIATED BY ULTRAVIOLET LIGHT

Shang Shizhang

(Laboratory of Cell Biology, Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan)

The strain Wu of type 2 herpes simplex virus (HSV-2W) was irradiated with a coil lamp of ultraviolet light at an average dose of 39.9 ergs/sec/mm² for different time and then inoculated into monolayer cultures of rabbit kidney cells. The changes of some biological properties of HSV-2W were studied.

When HSV-2W was irradiated for 2 min, its TCID₅₀/0.1 ml and PFU/ml changed respectively from 10^{-3.3} to 10^{-2.3} and from 1.6 × 10⁵ to 3.0 × 10³. But the multinuclear cells still existed. A few swollen and degenerating mitochondria were found in the cells infected by the virus, in the electron microscope. The virus particles were recognized in the intercellular spaces, cytoplasm and lysosomes. The formation of the nucleocapsids could not be found in the nucleus while a lot of them existed in the nucleus of

cells infected with the unirradiated HSV-2W.

The number of TCID₅₀/0.1 ml and PFU/ml of the virus was zero at irradiation of 4 min. Additionally, the monolayer of rat embryo lung cells infected with the virus irradiated for 4 min seemed to become more easily to be passaged in vitro than those infected with the unirradiated virus. Only a few virus particles could be recognized inside and outside the infected rabbit kidney cells, in the electron microscope, but the nucleocapsids were never observed in the nuclei of the cells. The number of the organelles in the cells was diminished and the amount of the microfilaments was increased.

When the virus was irradiated for 6 min, no CPE and virus particles could be found in the cytoplasm. But a few granules of the virus-specific antigen were still demon-

strated by the immunoperoxidase technique.

The data suggested that the irradiation of HSV-2W (10^5 PFU/ml) by ultraviolet light an average dose of 39.9 ergs/sec/mm² for 4—6 min could partially inactivate the

virus and lead to a change of the propagation infection into the non-propagation infection in the monolayer cultures of the rabbit kidney cells.

图 版 说 明

1. 正常 PRK 单层细胞 (72 小时, 288 \times)。 2. 对照病毒组感染的 PRK 细胞 (72 小时, 120 \times)。
3. 正常 PRK 单层细胞 (96 小时, 结晶紫染色, 384 \times)。 4. 对照病毒组感染的 PRK 细胞 (96 小时, 同上染色, 70 \times)。 5. 照射 2 分钟组感染的 PRK 细胞, 箭头示空斑 (96 小时, 同上染色, 198 \times)。
6. 半薄切片的正常 PRK 细胞 (72 小时, H-E 染色, 64 \times)。 7. 对照病毒组半薄切片的 PRK 细胞, 左下方有一个双核巨细胞 (72 小时, 同上染色, 68 \times)。 8. 照射 2 分钟组半薄切片的 PRK 细胞 (72 小时, 同上染色, 68 \times)。 9. 对照病毒大量感染的新鲜 PRK 细胞 (对照 VI 组, 72 小时, HSV-2W 免疫酶标法染色, 510 \times)。 10. 照射 4 分钟组感染的 PRK 细胞 (2 周, 同上染色, 380 \times)。
11. 对照病毒组感染 PRK 细胞的电镜照片 (72 小时, 28,570 \times)。 12. 对照病毒组感染 PRK 细胞的电镜照片, 箭头示正在装配囊膜的病毒颗粒 (72 小时, 28,750 \times)。 13. 对照病毒组感染 PRK 细胞胞核的电镜照片, 细箭头示核内散布的病毒核壳体, 粗箭头示核仁基质 (无定形部) 中的核壳体 (72 小时, 16,430 \times)。 14. 照射 2 分钟组感染 PRK 细胞的电镜照片 (72 小时, 8,250 \times)。 15. 照射 4 分钟组感染 PRK 细胞的电镜照片, 箭头示核孔区 (72 小时, 8,280 \times)。 16. 照射 4 分钟组感染 PRK 细胞的电镜照片, 箭头示微丝束 (48 小时, 8,820 \times)。 17. 照射 1 分钟组感染 PRK 细胞的电镜照片, 箭头示病毒颗粒 (12 小时, 18,000 \times)。 18. 照射 1 分钟组感染 PRK 细胞的电镜照片, 箭头示胞质 (上) 或溶酶体 (下) 内的病毒颗粒 (12 小时, 4,600 \times)。 19. 照射 2 分钟组感染 PRK 细胞的电镜照片, 箭头示病毒颗粒 (72 小时, 20,990 \times)。

1. Normal primary monolayer culture of baby kidney cells (PRK) grown for 72 h.
2. PRK cell culture was infected with HSV-2W and grew for 72h after inoculation. Some clusters of degenerated cells appeared to be grape shape.
3. No plaque was found in normal PRK cell culture grown for 96h and stained with crystal-violet.
4. Some plaques induced by the virus in PRK cell culture infected with HSV-2W and grown for 96h after inoculation were shown.
5. The plaques also were shown in PRK cell culture infected with HSV-2W, UV-irradiated for 2 min and grown for 96h after inoculation by crystal-violet staining.
6. No. cytopathic effect was shown in semi-thin-section of normal PRK cell culture grown for 72 h and stained with hematoxylin-eosin.
7. Cytopathic effect was shown in semi-thin-section of PRK cell culture infected with HSV-2W and grown for 72 h after inoculation. The section was stained with hematoxylin-eosin. A binucleated giant cell was shown by arrow.
8. Cytopathic effect was shown in semi-thin-section of PRK cell culture infected with HSV-2W, UV-irradiated for 2 min and grown for 72 h after inoculation. The section was stained with hematoxylin-eosin.
9. Many dark blue granules in cytoplasm of the antigen-positive cells were shown in PRK cell culture infected with HSV-2W and grown for 72 h after inoculation. HSV-2W was stained by immunoperoxidase method.
10. Some antigen-positive cells were shown in PRK cell culture infected with HSV-2W UV-irradiated for 4 min and grown for 2 weeks after inoculation. HSV-2W was stained by immunoperoxidase method.
11. Electron micrograph of PRK cell from 72 h culture infected with HSV-2W. The intranuclear nucleocapsids and a cluster of enveloped virus particles in the dilated cisterna limited by the inner nuclear membrane were shown.

12. Electron micrograph of PRK cell from 72 h culture infected with HSV-2W. The nucleocapsids appeared in the nucleus and the assembly of virus envelop with the plasma membrane in cytoplasm was carried out near the nucleus.

13. Electron micrograph of PRK cell from 72 h culture infected with HSV-2W. The intranuclear nucleocapsids were shown. The arrow indicates a nucleocapsid in the matrix (pars amorpha; non-granular portion) of the nucleolus.

14. Electron micrograph of PRK cell infected with HSV-2W UV-irradiated for 2 min. There was no significant change. No virus particle could be found.

15. Electron micrograph of PRK cell from 72 h culture infected with HSV-2W, UV-irradiated for 4 min. There was no significant change in cellular ultrastructure. No virus particle could be found.

16. Electron micrograph of PRK cell from 48 h infected with HSV-2W, UV-irradiated for 4 min. The arrow indicates a number of microfilaments appearing in the area of cytoplasm under cell membrane.

17. Electron micrograph of PRK cell from 12 h culture infected with HSV-2W, UV-irradiated for 1 min. The marked CPE with degeneration of mitochondrion was shown and the number of microfilaments in the cell and virus particles outside the cell were increased. The arrow indicates virus particles.

18. Electron micrograph of PRK cell from 12 h culture infected with HSV-2W, UV-irradiated for 1 min. More obvious CPE with degenerating mitochondria and expanding ER appeared. The virus particles were indicated.

19. Electron micrograph of PRK cell from 72 h culture infected with HSV-2W, UV-irradiated for 2 min. There was no obvious CPE although some virus particles could be found in the cytoplasm.