

人类 II 型单纯疱疹病毒(吴株)发育过程中的形态学特点

陈敏海 姚学军 吴建国 梁浩麟 陈保平

(湖北医学院病毒研究所, 武汉)

用透射电镜对人类 II 型单纯疱疹病毒(吴株) HSV-2 (W) 感染的兔肾细胞和豚鼠胚细胞进行了观察。对 HSV-2 在感染细胞内发育的某些形态特点作了描述和动力学解释。1. 病毒以吞饮方式进入细胞。2. 病毒在吞饮泡内脱衣, 当吞饮泡壁消失时, 则在胞浆内进行, 处于脱衣过程中的病毒颗粒不同于新形成的病毒, 而呈现明显的退变现象, 即整个颗粒肿胀, 包膜和核壳体逐渐微粒化, 形成不定形团块。3. 大量核壳体的形成见于核内: 首先出现由大小 20 nm 左右的致密颗粒及空心颗粒组成的积累物, 对积累物及其周围物质共同形成核壳体的过渡形态进行了描述。4. 包膜装配不仅由核膜内层以出芽方式完成, 而且还可由双层内质网膜和双层高尔基膜进行包围。5. 病毒以细胞溶解方式释放。

关键词 II 型单纯疱疹病毒

II 型单纯疱疹病毒(HSV-2)是一类广为传播的病毒, 除引起急性和潜伏感染之外, 还与肿瘤的发生有关^[1]。关于 HSV 的发育形态学特点, 洪涛和楚雍烈等^[2-4]和丁明孝等^[5]曾进行过报道, 洪涛等人提出了单纯疱疹病毒形态发生的多样化方式, 对包膜的装配和病毒在胞质内的复制提出了新概念。Watson^[6]和 Tooze^[7]曾就 30 年来国外有关 HSV 发育的形态进行了综述。从中可以看出有关 HSV 的发育形态学的描述还存在很多不一致的地方, 需要进一步研究。

我们采用人类 II 型单纯疱疹病毒吴株(HSV-2W)诱发小鼠宫颈癌成功之后^[8], 又对它的形态发育进行了研究, 现将结果报告如下。

材料和方法

(一) 病毒和细胞

按常规方法^[9]制备原代兔肾单层细胞和豚鼠胚原代单层细胞, 营养液为 0.5% 水解乳蛋

白-199 培养液, 含 10% 小牛血清, 青霉素、链霉素各 100 单位/ml。维持液除不加小牛血清外, 与营养液同。

人类 II 型单纯疱疹病毒(吴株)(HSV-2W)系由阴道分离, 曾按有关方法^[10]多次进行鉴定, 感染系数为 2PFU/细胞。

将病毒接种的培养物分不同时间(1、2、4、6、8、12 和 21 小时)从 37℃ 温箱取出, 将贴壁细胞刮下, 低速离心, 去上清液, 沉淀物经固定制作电镜标本。

(二) 电镜标本的制作

按常规方法将材料经 2.5% 戊二醛(0.1M 磷酸缓冲液, pH 7.4)和 1% 锇酸(巴比妥醋酸缓冲液, pH 7.4)双重固定, 分级酒精脱水, 环氧树脂 618# 包埋, 超薄切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色。

结果和讨论

(一) 吸附、吞饮和脱衣

1. 吸附: 从病毒感染后 1—21 小时的

本文于 1984 年 3 月 27 日收到。

标本中均可发现吸附于细胞表面的病毒颗粒,有包膜者占多数,无包膜者占少数。在晚期吸附的颗粒中有少数包膜破裂或整个颗粒膨胀(图版 I-1、2)。包膜或壳膜与细胞膜之间无融合现象,但有时在包膜与细胞膜之间有微丝相连。并在病毒吸附处常见胞质膜内陷,同时电子密度增加(图版 I-1、2)。引起电子密度增加的物质可能与细胞膜受体有关。

一般认为只有有包膜的病毒颗粒才具有感染性,经脂溶剂处理将包膜破坏后,病毒即失去了感染性。但据 Spring^[10] 及 Roizman^[11] 等报告,感染不需具备完整的包膜,核壳体只要有一部分包膜就足以使它吸附于细胞。我们的观察结果支持这一论点。此外,尚可见到无包膜颗粒被吞饮的现象。

2. 吞饮: 在感染早期,病毒吞饮现象非常活跃,不论在 HSV-2W 感染的兔肾细胞还是在感染的豚鼠胚胎细胞上,均可见到这种现象。在吞饮开始,由细胞内陷(图版 I-1、2),病毒颗粒随着被吞饮,并出现在胞质内的吞饮泡中(图版 I-2)。吞饮泡中的颗粒数目多少不等,有包膜或无包膜中均可见到,属退行性改变,与新形成的颗粒不同。

关于病毒进入细胞的方式有不同的报道, Hummeler 等^[12]认为需通过细胞吞饮作用和病毒包膜与细胞膜融合两种方式。而 Morgan 等^[13]只见到膜融合方式; Dales^[14]只见到细胞吞饮方式。我们观察支持后一种观点。

3. 脱衣: 在感染早期的胞质基质和吞饮泡内的病毒颗粒显示不同程度的退变图象,被认为是有包膜病毒进入细胞后的脱衣现象。如图 2 所示,在吞饮泡内病毒颗粒的包膜和核壳体同时膨胀,然后,包膜和核壳体松散、解体,形成细粒状无定形物

质。与新形成的有包膜病毒颗粒相比,此种在细胞内进行脱衣的病毒颗粒具有明显的退行性改变。

在以上引用的所有文献中均未对病毒进入细胞后的脱衣(脱包膜和壳膜)的形态学进行描述。本文的描述对了解 HSV 的脱衣过程提供了形态学证据。

(二) 病毒在细胞核内的繁殖

1. 新的颗粒积集物的出现: 在病毒感染早期的细胞核中,毫无例外地可以发现一种新的颗粒积集物(图版 I-3、4)。积集物内的颗粒直径约为 20 nm, 高电子密度,有时有一电子透明中心,相当于洪涛等描述的小环状结构。颗粒间还有许多较细小的电子密度较低的颗粒和絮状物。根据这种颗粒的形态、大小和排列方式,易与染色质和核仁中的颗粒相区别。在颗粒状积集物内部或其附近,常可见到病毒核壳体的存在。当病毒核壳体增多时,积集物内的颗粒相应减少。因此,这种颗粒积集物的出现,与病毒核壳体的发生有一定的因果关系。

2. 核壳体的形成: 在同一个细胞内,从形态学方面观察,核壳体的装配时间有先后,可见到一些过渡形态。在颗粒积集物的附近,除了已形成的核壳体外,还有由颗粒组成的稍大于核壳体的小球体,后者的颗粒逐渐呈同心圆排列,随后内圆颗粒集中而形成核心,由小变大,外圆的颗粒相互融合而形成壳膜(图版 I-3、4)。

关于单纯疱疹病毒核壳体的发育过程, Nii^[15] 和丁明孝^[5]都将静止的不同发育阶段作了动力学的解释。不同的是: Nii 的示意图表示核壳体的原始阶段由同心的两条半月形的线条逐渐合拢而形成同心圆,内圆逐渐变为实心,由小变大。我们的观察与 Nii 稍有不同,同心圆由颗粒排列而成。根据丁明孝的相片排列,说明核壳体的形成开始是一个圆,即壳膜,无核心,

随后在壳膜内出现颗粒, 同心圆和致密核心。关于核壳体形成系由空心核心向致密核心的过渡, 我们的观察与上述两作者的描述一致, 但关于核衣壳形成的早期形态则各人所见有所不同。这可能与使用的病毒株和细胞系不同有关。

另外, 我们还见到一种少有的核壳体结构。如图版 I-5 所示, 壳膜已经形成, 但核心物质呈条索状。有些条索还与壳膜外的条索连续, 有的条索由核心伸出象蝌蚪的尾巴。这些畸形核心的形成可能与当初组成核心的物质分布有关, 部分物质明显地由于壳膜的分界而留在它的外面。这种现象在 Nii^[15] 的文章中也有报道, 但他未作解释。致于无核心的壳体的形成, 我们所见与文献报道相同, 可能由于在形成核壳体的前体物质中无核酸——蛋白复合体, 所以不形成致密核心, 但是它们可以装配包膜。

我们还观察到胞质内的核壳体, 但未见到洪涛描述的 HSV 在细胞质内发育的全过程, 可能与使用的 HSV-细胞系不同有关。

(三) 核壳体的包膜装配

一般认为核壳体的包膜是由核膜内层装配。我们除观察到由核膜装配包膜外, 还经常观察到在胞质内由内质网装配包膜的现象(图版 I-6)。此时, 内质网膜断裂成小管, 在核壳体的附近呈半月状, 将其包围合拢形成完整的一层包膜。这一现象与楚雍烈的描述相同。偶尔也见到在胞浆内由高尔基扁平囊膜装配包膜的现象(图版 I-

7), 此时扁平囊膜围绕核壳体旋转, 合拢形成包膜。

我们虽然在感染的细胞质中观察到许多核壳体, 并观察到它们在胞质中进行包膜装配。但是这些核壳体来自核内或在胞质内产生这还不清楚。

(四) 病毒的释放

在感染晚期, 见到大量成熟的病毒颗粒与细胞碎片同时存在(图版 I-8), 说明病毒随细胞的崩解而大量释放至细胞外液。经常在崩解的细胞核内见到大量的未能及时装配包膜的核壳体。

参 考 文 献

- [1] Nahmias, A. J. and B. Norrild: in "Oncogenic Herpesviruses", Vol. II. ed. F. Rapp, CRC Press, Inc. p. 25, 1980.
- [2] 洪涛等: 微生物学报, 22: 175, 1982.
- [3] 楚雍烈等: 微生物学报, 23: 280, 1983.
- [4] 楚雍烈等: 中华微生物学和免疫学杂志, 3: 178, 1983.
- [5] 丁明孝等: 病毒学集刊, 2: 43, 1982.
- [6] Watson, D. H.: in "The Herpesviruses" ed. A. S. Kaplan, Academic Press, p. 133, 1973.
- [7] Tooze, J.: The Molecular Biology of Tumor Viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 470, 1973.
- [8] 陈敏海等: 实验生物学报, 13: 273, 1980.
- [9] Hsiung, G. D.: Diagnostic Virology. Yale University Press, p. 245, p. 198, 1982.
- [10] Spring, S. B. and B. Roizman: J. Virol., 2: 979, 1968.
- [11] Roizman, B. et al.: Symp. Viral Defectiveness, 28: 1890, 1969.
- [12] Hummeler, K. et al.: J. Virol., 4: 67, 1969.
- [13] Morgan, W. et al.: J. Virol., 2: 507, 1968.
- [14] Dales, S. and H. Silverberg: Virology, 37: 475, 1969.
- [15] Nii, S.: in "Herpesvirus" ed. Shiota, H. et al., Excerpta Medica, p. 3, 1982.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS DURING REPLICATION OF HUMAN HSV-2 (WU)

Chen Minhui Yao Xuejun Wu Jianguo

Liang Haolin Chen Baopin

(Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan)

Development of HSV-2 (Wu) in cells of baby rabbit kidney and of guinea pig embryo was observed in electron microscope. Some morphological characteristics were described and a dynamic interpretation of the static images was made. The results are summarized as followings. 1. The viruses entered the cells by pinocytosis. 2. Uncoating of viruses with swelling of virion and then with disintegrating of envelope and capsid occurred in the vesicles or in cytoplasm while the membrane of vesicles was disappeared. In the same time, the core of virus particles also encountered swelling and disintegrating. The feature of virus in uncoating was distinctly different from that of newly formed vi-

ron. 3. Successive appearance showing the development of nucleocapsides from individual globular material with fine grains through a shape of two concentric rings composed of dotted line in nuclei and a nucleocapsid with a small core on to a nucleocapsid with a somewhat large core of high density. 4. Apart from nuclear membrane, the envelopment of naked particles often from granular endoplasmic reticulum and occasionally from Golgi membrane could be found. 5. The viruses were released by cell lysis.

Key word

HSV-2

图 版 说 明

1—8. HSV-2(Wu) 感染的 BRK 细胞: 1. 病毒颗粒吸附于细胞表面, 在与膜接触处, 膜的厚度和密度增大 ($\times 25,000$)。2. 位于吞饮泡内的病毒颗粒处于不同的脱衣阶段 (即退变阶段) ($\times 30,000$)。3. 胞核内颗粒聚集物的出现, 核壳体形成的初期阶段 (\uparrow) 和核壳体 ($\times 60,000$)。4. 胞核内颗粒聚集物中可见小环状结构, 核壳体的早期阶段 (\uparrow) ($\times 60,000$)。5. 异常的核壳体 ($\times 100,000$)。6. 位于胞质内的核壳体由内质网包裹而形成包膜 (\uparrow) ($\times 50,000$)。7. 在胞质中, 核壳体由高尔基复合体膜旋转包裹, 而获得包膜 ($\times 65,000$)。8. 由细胞溶解而释放大量的病毒颗粒 ($\times 40,000$)。

1—8. BRK cells infected with HSV-2 (Wu): 1. Cell membrane thickening at the points of contact with virus particles. 2. The consecutive changes of uncoating of virus particles in pinocytotic vesicles. 3. The newly formed grained aggregation and the sequence of developing of capsids. 4. Some small circular structures among the grains of aggregation and the precursors (\uparrow) of capsid. 5. The abnormal capsids. 6. The envelopment of capsids from the endoplasmic reticulum. 7. The envelopment of capsids from Golgi membrane. 8. Virus release after cell disintegration.