

## 从实验性单纯疱疹病毒 2 型感染的 Hartley 豚鼠中 分离出潜伏的内源性豚鼠疱疹样病毒

郑志明

(湖北医学院病毒研究所, 武汉)

1969 年 Hsiung 等报告从 Strain 2 豚鼠中分离出豚鼠疱疹样病毒 (GPHLV)<sup>[1]</sup>。随后研究证明, GPHLV 可以和豚鼠逆转病毒<sup>[2]</sup>、豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV)<sup>[3]</sup> 在同一豚鼠体内同时混合感染, 出现协同作用<sup>[4]</sup>或干扰现象<sup>[5]</sup>。但有关 GPHLV 和单纯疱疹病毒 (HSV) 感染同一豚鼠的研究尚未见报道。本文报告了一株内源性 GPHLV 和实验性 HSV 2 型 (HSV-2) 在一只豚鼠中的混合感染和病毒的分离鉴定。分离的内源性 GPHLV 通过生物学、生物化学、免疫学方法和间接免疫铁蛋白电子显微镜技术得到证实。

### 材料和方法

#### (一) 病毒分离

在重约 250g 的雌性 Hartley 豚鼠阴道接种 HSV-2 1868 株<sup>[6]</sup>后, 心脏放血处死动物。取出肺、脾、脊髓、腰神经节和骶神经节, 剪碎后, 接种豚鼠胚成纤维细胞 (GPE)<sup>[7]</sup>。37℃ 孵箱吸附 1 小时后, 加含 2% 小牛血清的 Eagle 培养维持液, 置 37℃ 培养。每二天检查细胞病变 (CPE) 一次, 连续观察 5 周。

#### (二) 病毒大小、生长特征和理化鉴定

1. 病毒大小采用超滤法测定<sup>[8]</sup>。

2. 宿主范围测定: 将病毒悬液分别接种 GPE、鸡胚细胞 (CE)、人胚肺 MRC-5 细胞、恒河猴肾 (RhMK) 和兔肾 (RK) 细胞, 每二天检测一次 CPE, 以此确定病毒的细胞生长谱。

3. 对脂溶剂敏感性测定见文献<sup>[6]</sup>。

4. 病毒核酸型鉴定采用 BrdU 法<sup>[9]</sup>。

#### (三) 病毒包涵体检查

按文献方法<sup>[10]</sup>进行。

#### (四) 血清学鉴定

血清学鉴定用标准血清如下: 兔抗豚鼠 × 病毒 (GPXV) 血清由 Bia, F. J. 博士 (美国 Yale 大学医学院) 赠送; 兔抗 GPHLV 血清和豚鼠抗

GPCMV 血清系免疫动物获得; 兔抗 HSV-1 (Mac-Intyre 株) 和 HSV-2 (MS 株) 血清均为商品获得。在进行以下血清学鉴定时, 同时采用 GPHLV LK40 作为标准参考株<sup>[11]</sup>。

1. 中和试验: 空斑减数中和试验和 CPE 抑制中和试验在 GPE 细胞中进行<sup>[12]</sup>。血清补体依赖性中和抗体检测法见文献<sup>[7]</sup>。

2. 间接免疫铁蛋白电子显微镜技术: 待 6 孔 Costar 细胞培养板中的 GPE 细胞形成单层后, 接种待检病毒。当 50% 细胞出现 CPE 时, 弃除培养板孔中的维持液, 用 PBS 洗涤细胞单层一次, 加 4% 多聚甲醛 PBS 液 4℃ 固定 20—30 分钟。  
① 在第一个 6 孔 Costar 培养板中, 加 1:20 稀释的兔抗 HSV-2 血清, 每孔 0.5ml; ② 在第二个培养板中, 加 1:20 稀释的兔抗 GPHLV 血清, 每孔 0.5ml; ③ 在第三个培养板中加 1:20 稀释的豚鼠抗 GPCMV 血清, 每孔 0.5ml; ④ 第四个培养板每孔加 0.5ml PBS 作为对照。所有四个培养板均置 37℃ 60 分钟后, 每孔用 5ml PBS 洗 3 次。在第一个和第二个培养板每孔中加 0.5ml 1:10 稀释的铁蛋白标记的羊抗兔 IgG (购自 Cappel Laboratories), 第三个培养板每孔中加 0.5ml 1:10 稀释的铁蛋白标记的兔抗豚鼠 IgG, 第四个培养板的 3 孔加铁蛋白标记的羊抗兔 IgG, 另 3 孔加铁蛋白标记的兔抗豚鼠 IgG。所有培养板均置 37℃ 60 分钟后, 每孔加 5ml PBS 洗 3 次。弃去 PBS, 每孔加 2ml 2% 戊二醛 4℃ 固定 1 小时。用橡皮刮刮下细胞, 分别收集在 15ml 离心管中, 1500rpm 离心 15 分钟, 弃上清液, 换 PBS 液置 4℃ 过夜。次日, 沉淀物用四氧化钼 S-collidine 缓冲液进行后固定。然后, 以环氧树脂包埋, 超薄切片用醋酸

本文于 1984 年 6 月 28 日收到。

此项研究工作系作者在美国耶鲁大学医学院进修期间完成。C. K. Y, Fong 博士协助电镜检查, 特此致谢。

铀和柠檬酸铅染色, 置 Philips EM300 型电子显微镜下观察<sup>[8]</sup>。

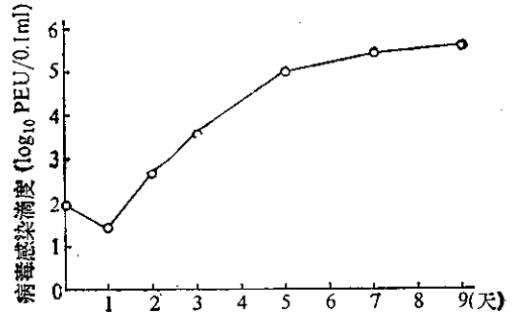
## 结 果

### (一) 内源性豚鼠病毒和潜伏性 HSV-2 的分离

在豚鼠阴道内感染 HSV-2 1868 株后 74 天处死的 4 只患不同程度生殖器疱疹的豚鼠中, 仅从 393 号和 394 号豚鼠的骶神经节和 394 号豚鼠的腰神经节回收到所接种的 HSV-2。同时, 还在 394 号豚鼠肺和脾脏中分离出一株不同于 HSV-2 CPE 的病毒, 其特征性 CPE 见图 1。

(二) 从 394 号豚鼠肺、脾分离出的病毒特征  
该病毒可通过孔径 300nm 的滤膜, 但不能通过孔径 100nm 的滤膜。因而病毒大小介于 100—300nm 之间。病毒对乙酰和 BrdU 敏感, 表明是一种有囊膜的 DNA 病毒。该病毒不能在鸡胚尿囊腔和绒毛尿囊膜上生长, 也不能在 MRC-5、RhMK 和 CE 细胞中生长, 只能在 GPE 和 RK 细胞中产生 CPE, 繁殖缓慢(图 2), 并在 GPE 细胞核内形成大

而易见的嗜酸性包涵体(图 3)。HSV-2 可在上述五种细胞中迅速产生 CPE, 并在鸡胚绒毛尿囊膜上形成乳白色斑。这两种病毒特征的主要区别见表 1。



CPE - - + ++ +++ ++++ +++++ ++++++

图 2 394GPHLV 在 GPE 细胞中的生长曲线

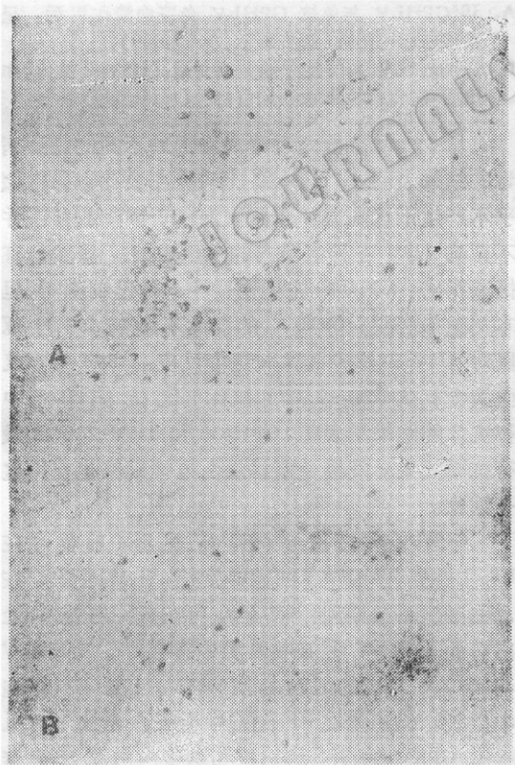


图 1 394 GPHLV 在 GPE 细胞中诱导的 CPE (×60)

- A. 接种病毒后 4 天出现的 CPE。
- B. 未感染病毒的细胞对照。

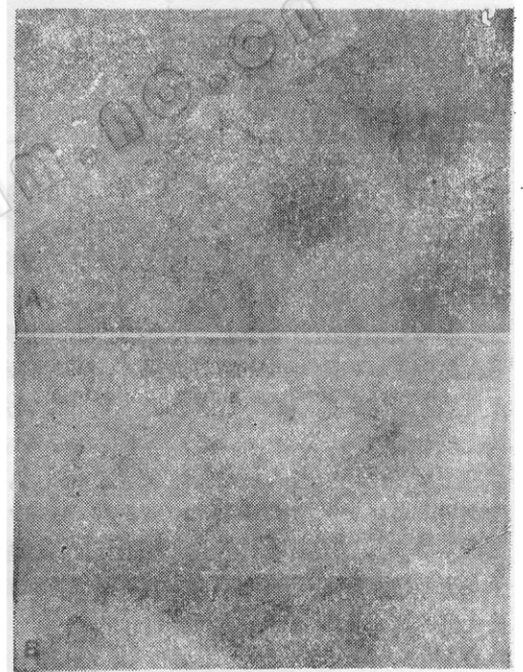


图 3 394GPHLV 在 GPE 细胞中诱导的核内包涵体(×1,000)

- A. 感染病毒后第四天的核内 Cowdry A 型包涵体(箭头所示)。
- B. 未感染病毒的细胞对照。

### (三) 血清学鉴定

该病毒可被特异性兔抗 GPHLV 血清中和, 而不被兔抗 HSV-1 和 HSV-2 血清、兔抗 GPXV 血清、豚鼠抗 GPCMV 血清和 394 号豚鼠血清所中

表 1 394GPHLV 与 HSV-2 1868 株的主要区别

项 目	394GPHLV	HSV-2 1868 株
宿主范围	细胞培养谱窄	细胞培养谱广
在 GPE 细胞中的 CPE 特点	2—3 天出现 CPE, CPE 发展缓慢, 细胞肿胀, 变圆	1—2 天出现 CPE, CPE 发展迅速, 细胞肿胀, 变圆
在 GPE 细胞中的空斑形成特点	小, 感染后 5 天直径约 1.0 mm	大, 感染后 3 天直径约 3.5 mm
包涵体	嗜酸性, 核内, 较大而易见, 周围有一宽大晕轮	嗜酸性, 核内, 较小而难见, 周围有一不太清晰的晕轮
血清中和试验		
抗 HSV 免疫血清	不中和	中和
抗 GPCMV 免疫血清	不中和	不中和
抗 GPHLV 免疫血清	中和	不中和
抗 GPXV 免疫血清	不中和	不中和
394 号豚鼠血清	不中和	中和

和。但 394 号豚鼠血清可中和 HSV-2, 其血清补体依赖性中和抗体滴度达 1:80。该动物在接种 HSV-2 前的抗 HSV-2 补体依赖性中和抗体滴度低于 1:10。

间接免疫铁蛋白电子显微镜观察表明, 该病毒呈典型的疱疹病毒形态。与兔抗 GPHLV 抗体反应后, 病毒颗粒表面可结合铁蛋白标记的羊抗兔免疫球蛋白 IgG。因而, 电镜下可见病毒颗粒周围有很多小而致密的铁蛋白颗粒附着(图 4)。该病毒与兔抗 HSV-1 和 HSV-2、豚鼠抗 GPCMV、兔抗 GPXV 血清反应后则不出现上述特征。其结果与标准参考株 GPHLV LK40 的中和试验和间接免疫铁蛋白电镜观察结果完全相同。

## 讨 论

从实验性感染 HSV-2 的 394 号 Hartley 豚鼠肺、脾中分离出的病毒经上述鉴定证实是一株 GPHLV (暂称为 394GPHLV)。该病毒不存在于豚鼠神经组织, 反之, 阴道接种的 HSV-2 亦不可从豚鼠肺、脾组织中分离出来。不同病毒在同一动物不同器官组织中的分布不同, 可能是由于 HSV-2 的潜伏感染主要是嗜神经性的, 而 GPHLV 的潜伏感染主要是嗜内脏性的缘故。

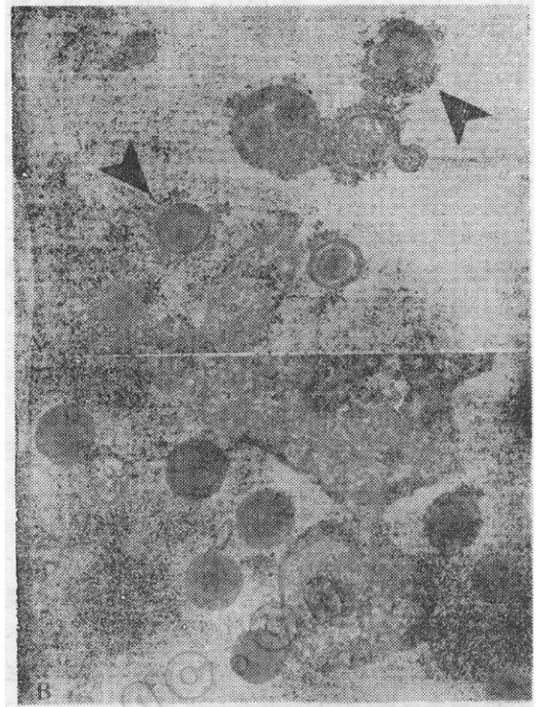


图 4 394GPHLV 的间接免疫铁蛋白的电镜观察

- A. 394GPHLV 与兔抗 GPHLV 免疫血清作用后, 呈铁蛋白标记阳性(箭头所示,  $\times 48,000$ );  
B. 394GPHLV 与非特异性免疫血清 (HSV-2 抗体) 作用后, 病毒颗粒不被铁蛋白标记 ( $\times 60,000$ )

从 394 号豚鼠同时分离出两种不同的疱疹病毒的结果表明, GPHLV 和 HSV-2 在该动物体内似乎不产生干扰现象。豚鼠体内 GPHLV 的存在并不影响 HSV 在神经节内的潜伏感染。虽然曾有报道指出, GPHLV 主要潜伏在 B 淋巴细胞<sup>[9]</sup>, 但本文结果表明, GPHLV 的潜伏不影响 394 号豚鼠对 HSV-2 感染的体液免疫反应。394 号豚鼠血清含有抗 HSV-2 中和抗体而无抗 GPHLV 中和抗体的结果还表明, GPHLV 和 HSV-2 之间没有抗原关系。间接免疫铁蛋白电镜观察也支持这一结论。

GPHLV 很容易与 GPCMV 区别, 前者可在 RK 和豚鼠肾 (GPK) 细胞中生长, 后者则否。在动物潜伏感染期间, GPHLV 可在多种内脏中检出, 而 GPCMV 只在唾液腺中存在<sup>[10]</sup>。GPHLV 与 GPXV 特征的区别在于 GPXV 可在 GPK 细胞中生长, 但不能在 RK 细胞中生长。电镜下可见感染 GPXV 的 GPE 细胞核和胞浆内出现管状聚集物, 而 GPHLV 感染的细胞则不出现这种形态。再者, GPHLV、GPCMV 和 GPXV 的 DNA 具有

完全不同的密度梯度和不同的内切酶图谱<sup>[11]</sup>。此外,血清学中和试验可将这三种病毒进一步区别。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Hsiung, G. D. and L. S. Kaplow: *J. Virol.*, **3**: 355--357, 1969.
- [ 2 ] Hsiung, G. D. and A. H. McTigue: *Cancer Res.*, **36**: 674--677, 1976.
- [ 3 ] Bia, F. J. et al.: *J. Infect. Dis.*, **140**: 914--920, 1979.
- [ 4 ] Zheng, Z. M. et al.: *Antiviral Res.*, **3**: 275--283, 1983.
- [ 5 ] Zheng, Z. M. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **17**: 396--399, 1983.
- [ 6 ] Hsiung, G. D.: *Diagnostic Virology*, 3th ed., Yale University Press, New Haven, P. 77, 56, 1982.
- [ 7 ] Zheng, Z. M. and G. D. Hsiung: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **177**: 332--336, 1984.
- [ 8 ] Zheng, Z. M. et al.: *Intervirology*, **23**: 44--50, 1985.
- [ 9 ] Griffith, B. P. and G. D. Hsiung: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **162**: 202--206, 1979.
- [ 10 ] Tenser, R. B. and G. D. Hsiung: *Infect. Immun.*, **13**: 934--940, 1976.
- [ 11 ] Bia, F. J. et al.: *J. Virol.*, **36**: 245--253, 1980.

JOURNALS.IM.AC.CN